

Génesis del acrosoma en la espermatogénesis de Murex brandaris

M. J. Amor

Departament de Bioquímica i Fisiologia. Unitat de Biologia
 Cel.lular. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona.
 Av. Diagonal 645. 08028 Barcelona.

Abstract

Acromosomal formation in Murex brandaris spermatogenesis

Murex brandaris has two kinds of spermatogenetic lines named typical or eupirine line, and atypical or apyrene line.

Both, present acrosomal formations made from the Golgi complexe. At the beginning of the typical spermatogenesis, the Golgi complexe, highly secretory, appears in the neighbourhood of the centriole and the chondriome. It makes the proacrosomal body in the early stages of the spermiogenesis, and at the end of it, the proacrosomal body rises to the top of the nucelus to form the nature sperm acrosoma.

In the atypical line, Golgi complexe seems to make two kinds of granules at the same time: some highly electrodense granules, and a pseudocarosomal body, placed at the top of the atypical sperm.

Introducción

Murex brandaris, Gasterópodo marino, presenta dos tipos de líneas germinales masculinas: la línea típica que siguiendo los pasos comunes a todo proceso espermatogénico, da lugar a espermatozoides fecundantes, llamados también eupirenos, y la línea atípica, que tras una serie de complicados procesos, todavía no dilucidados, origina un tipo de células anucleadas cuya funcionalidad se halla aún en discusión, llamados espermatozoides apirenos.

Ambos tipos celulares, presentan formaciones acrosómicas, cuya génesis será objeto de estudio en el presente trabajo.

La génesis del acrosoma a partir del complejo de Golgi, es ampliamente aceptada en casi todas las especies estudiadas en la escala zoológica (BACCETTI AFZELIUS, 1976).

Esta relación ha sido estudiada en los espermatozoides eupirenos de los Gasterópodos por STEPHAN (1903b), SCHITZ (1920),

LONGO et al (1967), WALKER (1969), ROUSSET GALANGAU (1969), BACCATTI AFZELIUS (1976), JONG BRINKENTAL (1977), BUCKLAND NICKS et al (1973,1976,1983), y su formación es el resultado de la fusión de las vesículas golgianas en la cara trans de los dictiosomas, teniendo por tanto el complejo Golgi, su máxima actividad en la espermiogénesis.

Inicialmente, el complejo de Golgi, se localiza en la región pericentriolar, originando un gránulo: el proacrosoma, que posteriormente migra hacia el ápice nuclear, junto con el complejo de Golgi, para dar lugar al acrosoma (ROUSSET GALANGAU, en Columbella rustica y Murex trunculus, BUCKLAND NICKS et al, 1976,1983, en Littorina sitkana y Fusitriton oregonensis).

En algunos casos, al culminar la formación del acrosoma, el complejo de Golgi emigra junto con un cuerpo multivesicular, la pieza media, donde parece ser exocitado. (BUCKLAND NICKS et al, 1983).

El acrosoma resultante, en la mayoría de las especies estudiadas, presenta forma de sombrero o casquete, y el espacio comprendido entre la membrana plasmática y la membrana acrosómica, suele hallarse ocupado por un material amorfo cuya naturaleza y origen está en discusión. (BUCKLAND NICKS et al 1983).

En la línea atípica, se observa un gran desarrollo de los dictiosomas en las primeras fases de la espermatogénesis, así como la formación de un pseudoacrosoma, que carece de hialuronidasa (FAIN MAUREL, 1966) y parece tener origen golgiano (TUZEL, GALANGAU, DUPOUY, 1967, HEALY, 1981).

Por otro lado, YASUZUMI et al (1958,1960,1967,1974), y BUCKLAND NICKS et al (1982) asignan al complejo de Golgi un importante papel en la formación de unos gránulos electrodenso del espermatozoide maduro a partir de cariomeritos degenerados.

MATERIALES Y METODOS

Extraído por disección el testículo de ejemplares de Murex brandaris procedentes de la costa mediterránea, se ha procedido de la siguiente manera:

A- Técnica standard

1- Microscopía óptica: Extensiones fijadas con metanol o alcohol acético (9-1), han sido sometidas a la técnica del PAS, siendo otras procesadas con la técnica Diff-Quick.

Fragmentos de gónada fijados con formol, e incluidos en parafina, han sido teñidos rutinariamente con la técnica hematoxilina-eosina

2- Microscopia electrónica: Fragmentos de gónada de 1mm^2 han sido prefijados con gluteraldehído-paraformaldehído tamponado con solución Sörensen, o bien con gluteraldehído al 2.5% tamponado con agua de mar, ajustando en ambos casos el PH a 7.2-7.4, oscilando el tiempo de fijación entre 1.5-2 horas, todo ello realizado a 4°C.

Tras un lavado con el tampón utilizado, se ha realizado una postfijación con tetróxido de osmio al 1-2% en solución tampón, y procediendo seguidamente a la deshidratación con acetona, a fin de proceder a incluir en plástico, utilizando en este caso la resina de Spurr

En algunas técnicas específicas, se ha omitido la postfijación ósmica.

Tras la observación de cortes semifinos teñidos con azul de metileno 1%-borax, se ha seleccionado la zona piramidar, y con ultramicrotomo REICHERT-OMU se han obtenido cortes ultrafinos de unos 300 Å de grosor. El contrastado habitual de dichos cortes ha sido con acetato de uranilo seguido de citrato de plomo.

B- Técnicas específicas. En ambos casos se utiliza rejilla de oro.

1- Detección de carbohidratos. Técnica de Thiéry (1967)
Para esta técnica, se utilizan bloques sin osmificar. Tras la obtención de cortes, se someten a 2-3 pasos de ácido periódico acuoso al 1% durante 20-25 minutos. Tras una serie de lavados con agua destilada, que culmina en un prolongado baño de los cortes en la misma, se procede a la flotación de los cortes en tiocarbhidracina 0.2%, ácido acético 20%, durante 30-45 minutos, o bien en tiosemicarbácida al 1%, ácido acético 10% durante 30-45 minutos.

A continuación se hacen varios pasos de los cortes por

ácido acético a diferentes concentraciones y diferentes tiempos, para acabar con la flotación de los mismos en proteinato de plata al 1% durante 30 minutos en completa oscuridad, lavándolos finalmente con agua destilada.

2- Detección de ADN. Técnica de Erenpreisa (1981).

Los cortes se tratan con ClH 5N a temperatura ambiente, de 40 a 45 minutos, tras un lavado posterior con agua destilada, se someten a la acción del acetato de uranilo al 2% acuoso, a PH 4'2, disuelto el día anterior y filtrado antes de ser utilizado a 37º en cámara húmeda durante 30 minutos.

Las observaciones en todos los casos, se han efectuado en un microscopio PHILIPS 200, o PHILIPS 301 del Servicio de Microscopía electrónica de la Universidad de Barcelona.

Resultados y Discusión

En la línea típica el complejo de Golgi acusa cambios notorios entre la fase de espermatogonias y espermatocitos de primer orden.

En las espermatogonias el complejo de Golgi aparece formado únicamente por dictiosomas ligeramente curvados, inmersos en un citoplasma altamente electrodensos debido a la gran riqueza de ribosomas, no llegándose a observar gran actividad secretora y poniéndose en evidencia su naturaleza glucídica con la técnica de THIERY.

En los espermatocitos de primer orden se observa un cambio bastante notable. En primer lugar, el complejo de Golgi aparece ubicado en las cercanías del punto donde el núcleo presenta una pequeña curvatura, encontrándose en general acompañado por unas 5 cisternas con gran actividad secretora, produciendo indistintamente vesículas claras o densas, una de las cuales se llena con las vesículas segregadas por los dictiosomas, formando un cuerpo multivesicular, posible precursor del acrosoma. (Fig. 1, 2, 3).

Debido a la corta duración de la fase de espermatocito de 2º orden, nos es imposible hacer una valoración pertinente de los cambios que se pueden producir en ella; por carecer de imágenes suficientes.

En la espermiogénesis es donde el complejo de Golgi sufrirá cambios más drásticos.

Inicialmente el complejo de Golgi aparece ubicado en las vecindades del centriolo y el condrioma, coincidiendo a su vez con el polo nuclear donde se presenta una mayor condensación de cromatina (Fig. 4).

Está formado por 1-2 dictiosomas que comprenden un número muy variable de cisternas curvadas. El cuerpo multivesicular formado en la fase anterior, aparece ahora altamente electrodensó, posiblemente por la fusión de las vesículas internas preexistentes, y presenta forma de herradura, rodeado por una doble membrana (Fig 5).

Este cuerpo, aparece unido a otra vesícula mas pequeña, que se carga asimismo de material electrodensó, ocupando la parte abierta de la "herradura". Esta unión da lugar al proacrosoma donde la "herradura sería el proacrosoma propiamente dicho, y la vesícula pequeña, el precursor del perforatorium. (Fig 6-7).

Una vez formado, este complejo proacrosómico, junto con el complejo de Golgi, migra hacia el ápice nuclear, iniciándose allí la formación del acrosoma. Tales imágenes recuerdan las señaladas por ROUSSET GALANGAU (1969) en Columbella rustica y Murex trunculus y BUCKLAND NICKS et al (1976,1983) en Littoriana sitkana y Fusitron oregonensis. (Fig 8-9-10).

El acrosoma joven, tiene forma ovalada, que progresivamente se alarga para dar lugar a la morfología cónica del acrosoma del espermatozoide maduro, ayudado posiblemente por el complejo de Golgi que aún parece tener actividad, migrando posteriormente hacia la base nuclear, acompañado a veces de pequeñas cisternas multivesiculares. (Fig 10).

Como ya hemos indicado, el acrosoma presenta inicialmente forma ovalada, y en cortes transversales se observa una membrana bastante densa, que tanto exterior como interiormente, presenta superficie dentada. En su interior, aparece el esbozo del perforatorium, rodeado asimismo por una membrana. (Fig 11).

Como ya hemos señalado, el acrosoma del espermatozoide maduro, pierde la forma ovalada, adquiriendo ahora forma cónica.

La base de este cono, sin embargo, no parece ser circular, ya que en cortes transversales se presenta siempre elipsoidal, siendo su radio mayor de 0.25μ .

En cortes longitudinales, el acrosoma forma un ángulo de unos $40-45^\circ$, donde el vértice del mismo representa la zona apical del acrosoma, mientras la zona opuesta representa el ápice nuclear.

Los lados de este ángulo están formados por una doble membrana que contiene una línea de material denso en su interior. Formando lo que sería la bisectriz de este ángulo, encontramos otra línea de material electrodense que puede interpretarse como el perforatium, y presenta siempre sección circular. Se aprecia así mismo entre el acrosoma y la membrana plasmática, otra franja electrodensa. (Fig 12a).

En cortes longitudinales, se observa la rugosidad de las membranas que recubren el acrosoma, y dicho aspecto se pone aún más de manifiesto en secciones transversales, y sobre todo, en secciones sagitales (Fig 12b, 13), donde se aprecian verdaderas "denticiones". Cada diente, aparentemente cuadrado, mide $0.08-0.09\mu$ de lado, dejando entre ellos un espacio de 0.01μ .

Mediante la técnica de THIERY se pone de manifiesto el componente glucídico de las membranas acrosómicas, y es notorio constatar que la superficie dentada se hace más patente con la técnica de ERENPREISA, específica para el DNA.

El complejo de Golgi finalmente desaparece totalmente, y solo en ocasiones puede conservarse en el espermatozoide joven una vesícula de secreción a nivel de la pieza media, que, como observa BUCKLAND NICKS et al (1983) en Fusitriton oregonensis podría ser exocitado, aun que carecemos de imágenes que lo confirmen.

En la línea atípica el complejo de Golgi aparece ubicado en las primeras fases, próximo al núcleo, representado por uno o más dictiosomas, formados a su vez por 4-5 cisternas arqueadas que producen vesículas de mayor o menor densidad.

Más adelante, adquiere morfología más redondeada situándose próximo a los núcleos en degeneración.

En el ápice del espermatozoide apireno maduro, aparece una cofia que podríamos considerar como un pseudoacrosoma, posiblemente de origen golgiano, debido a las vesículas que contiene en su interior, semejante a las descripciones referidas anteriormente por FAIN MAUREL (1966), TUZET-GALANGAU-DUPOUY, (1967) y HEALY (1981). (Fig 14,15,16).

En el interior del espermatozoide apireno maduro, aparecen asimismo unas vesículas PAS y THIERY positivas, que podrían tener origen golgiano, como indican YASUZUMI et al (1958,1960,1967,1974), y BUCKLAND NICKS et al (1982), debido al gran desarrollo y actividad que presenta el complejo de Golgi en estas últimas fases.

Bibliografía

- BACCETTI, B. - AFZELIUS, B.A. (1976). "The Biology of Sperm Cells" J. Karger, New York. pp: 1-118
- BUCKLAND NICKS, J:A. (1973). "The fine structure of the spermatozoon of Littorina (Gastropoda Prosobranchia) with special reference to sperm motility. Z. Zellforsch. 144: 11-29.
- BUCKLAND NICKS, J.A. - CHIA, F.S. (1976). Spermatogenesis of a marine snail Littorina sitkana. Cell Tiss. Res. 170 455-475.
- BUCKLAND NICKS, J.A.- WILLIAMS, D. - CHIA, F.S. - FONTAINE, A. (1983). Studies on the polymorphic spermatozoa of a marine snail. 11. Genesis of the euperine sperm. Gamete Res. 7: 19-37.
- ERENPREISA, J. (1981) Staining of DNA uranylacetate in hidrolised ultrathin sections. Acta Histochem. 68: 22-26
- FAIN MAUREL, M.A. (1966) Acauissions recents sur les spermatogeneses atypiques. Ann Biol. T.V, F. 11-12 pp: 513-564
- HEALY, J.M. - JAMIESON, B.G.G. (1981). An ultraestructural examination of developing and mature paraspermatozoa in Pirazus ebemina (Molusca, gastropoda, Potamididae). Zoomorphology, 98, 101-109
- JONG BRINK, M. - HOMMES, T.G. - KODDE, A. (1977). Seprmatogenesis and role of Sertoli cells in freshwater snail Biomphalaria glabrata. Cell. Tiss. Res. V. 181 n 1. pp:37-58

- LONGO, F.J. - DORNFELD, E.J. (1967). The fine structure of spermatid differentiation in mussel Mytilus edulis. J. Ultrastruct. Res 20: 462-480.
- MEVES, F. (1903) Ueber oligopyrene und apyrene spermien und uber ihre Entechung nach Beobetchumjem der Poludina und Pygaera. Arch. f. milkr. Anat. LXI. (Ref. REINKE 1914).
- ROUSSET GALANGAU, V. (1969). Etude en microscopie electrique de la gametogenése de Milax gagates (Gastropode Pulmone Limedidae). Evolution des ultrastructures aucours de la spermatogenése chez differents types de Mollusques. Thése. Université Montpellier.
- SCHITZ, V. (1920). Sur la spermatogenese chez Murex trunculus (L), Aporrhais pes pelicani (L), Fusus sp. et Nassa reticulata. Arch. Zool. Exp. gener. T. 59: 477-508.
- SCHITZ. V. (1920) Sur la spermatogenése chez Ceritium vulgatum Brug, Turritella triplicata Brochi (mediterranea monterrosata) et Bittium reticulatum de Costa. Archives Zoologie expérimentale et generale 58: 489-520.
- STEPHAN, M.P. (1903). b. Le développement des spermies apyrenes de Murex brandaris. C.R. Biol. Paris vol. 55: 810-811
- THIERY, J.P. (1967). Ref LEWIS KNIGHT. "Staining methods for sectioned material". North Holland, 1977. pp:102
- WALKER, H.M. (1969). Some unusual features of the sperm of Nucella lapillus (L). Comparative spermatologi. Academia Nazionale Lincei. Reprint from Quaderno 137: 383-396.
- YASUZUMI, G. - TANAKA, H. (1958). Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy. VI. Researches on the spermatozoon dimorphism in a pond snail Cipangopaludina malleata. J. Biophys. Biochem. Cytol. v. 4. n 5. pp: 621-637.
- YASUZUMI, G. - ISHIDA, H. - NAKANO, S. - YAMAMOTO, H. (1960). Spermatogenese des animaux revelée par le microscope electronique. J. Ultrastruct. Res. 3: 484-494.
- YASUZUMI, G.- LEE, K.J. - FUKUJI, H. - YOSHIDA, M. (1967) Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy. Z. Zellforsch. 80: 353-369.
- YASUZUMI, G. (1974). Electron microscope studies on spermiogenesis in various animal species. Int. Rev. Cytol. 37: 53-119.

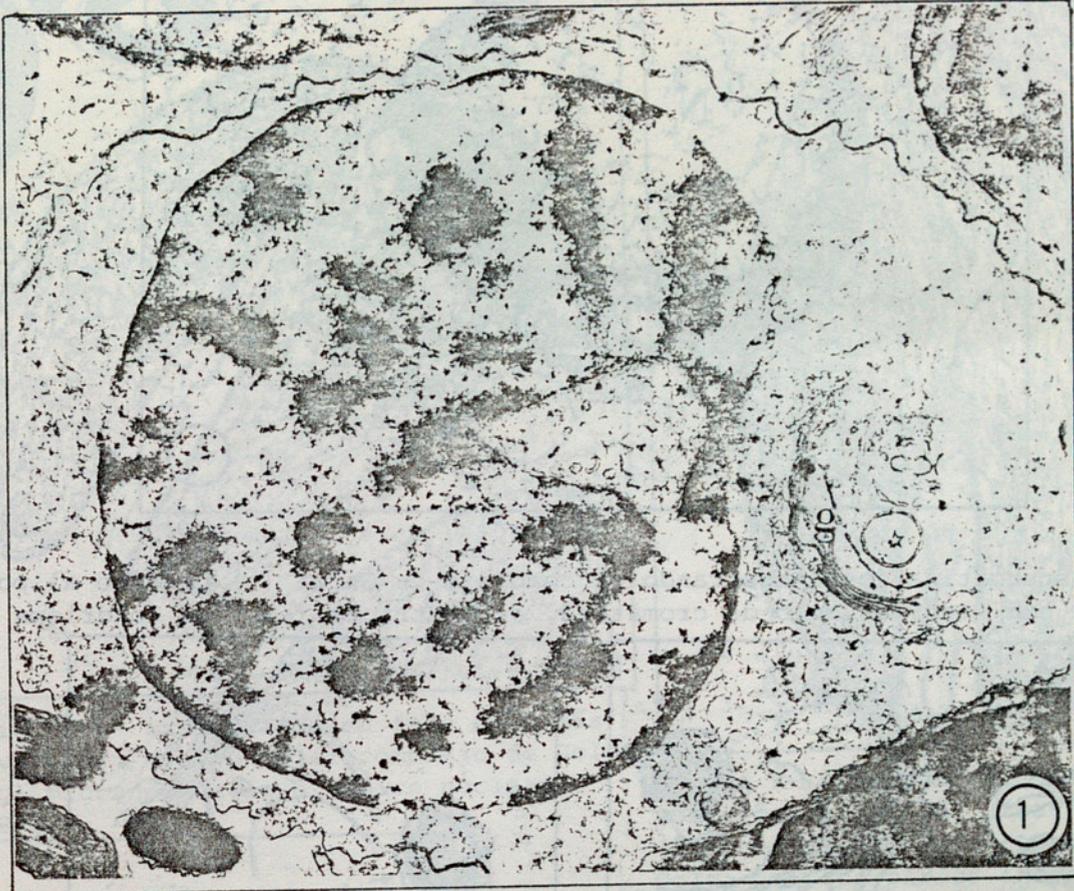
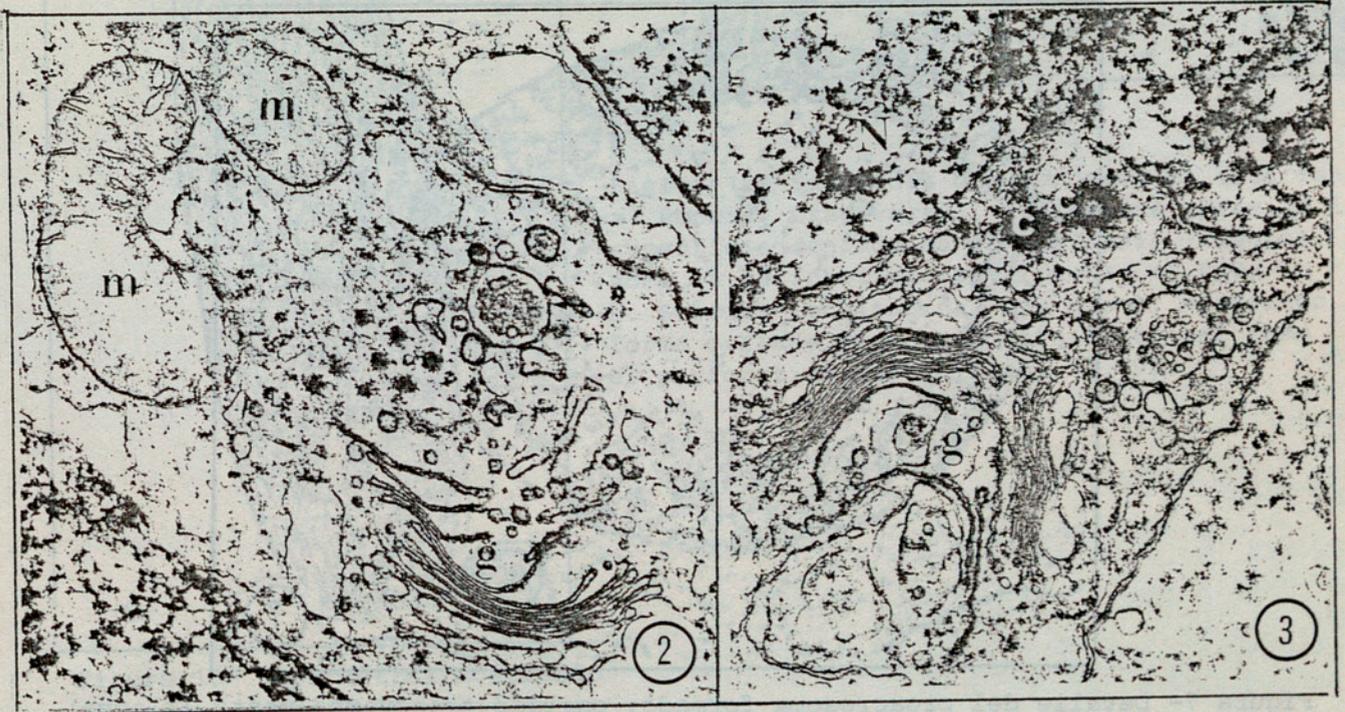


Fig 1,2,3.- Tres detalles del complejo de Golgi (g) en los espermatocitos de primer orden, mostrando su localización próxima a la hendidura nuclear (Fig 1), al condrioma (m) (Fig 2), y al centriolo (c) (Fig 3), pudiéndose apreciar la formación de cisternas redondeadas (Fig 1 asterisco) que se llenan de vesículas formando cuerpos multivesiculares (Fig 2,3, flecha), así como la gran actividad secretora que presenta en esta fase. Fig 1: 15.466x. Fig 2: 34.066x. Fig 3: 46.383x.



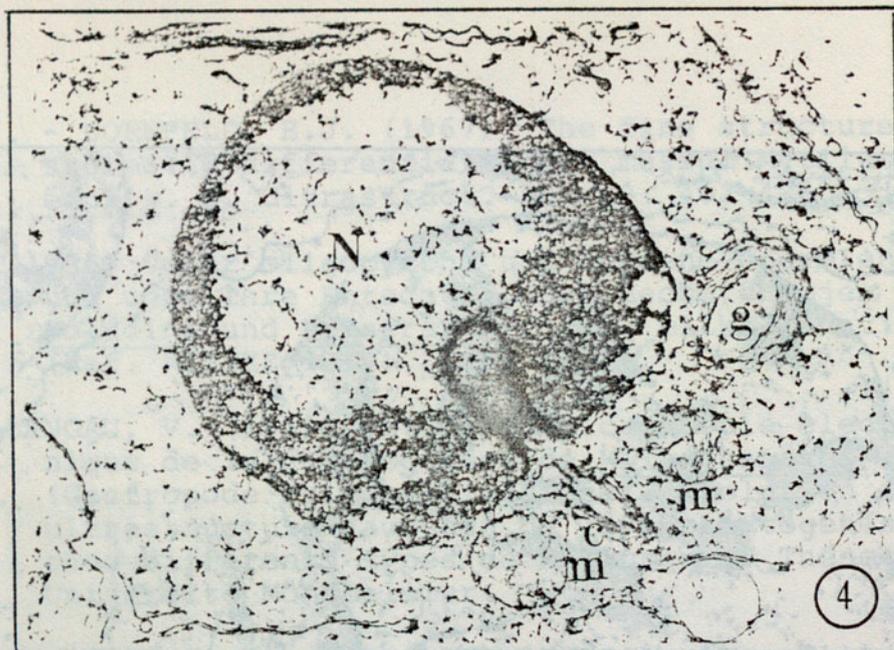
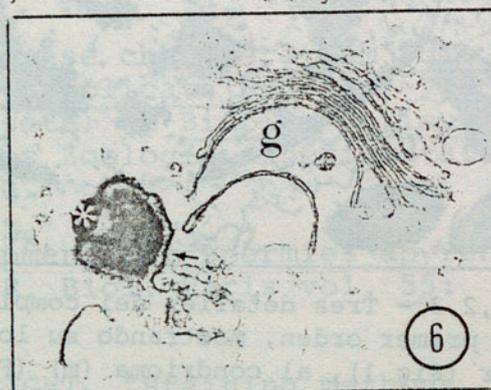
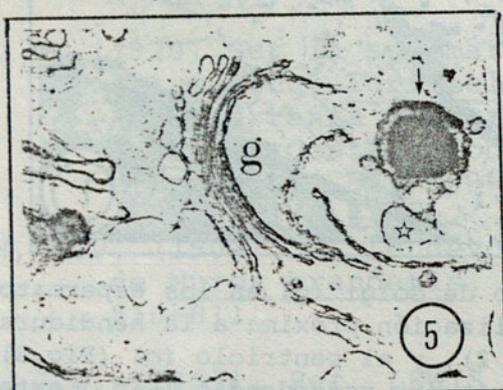


Figura 4- Espermátida joven mostrando el complejo de Golgi (g) próximo al polo nuclear (N) con mayor acúmulo de cromatina, al centriolo (c) y al condrioma (m). 16.675x



Figuras 5 y 6- Dos aspectos de la formación del proacrosoma. Inicialmente, una vesícula electrodensa (figura 5) se asocia a una vesícula clara (asterisco), que cargándose de material electrodenso forma un complejo que da lugar al proacrosoma. 24.200x y 31.869x, respectivamente.

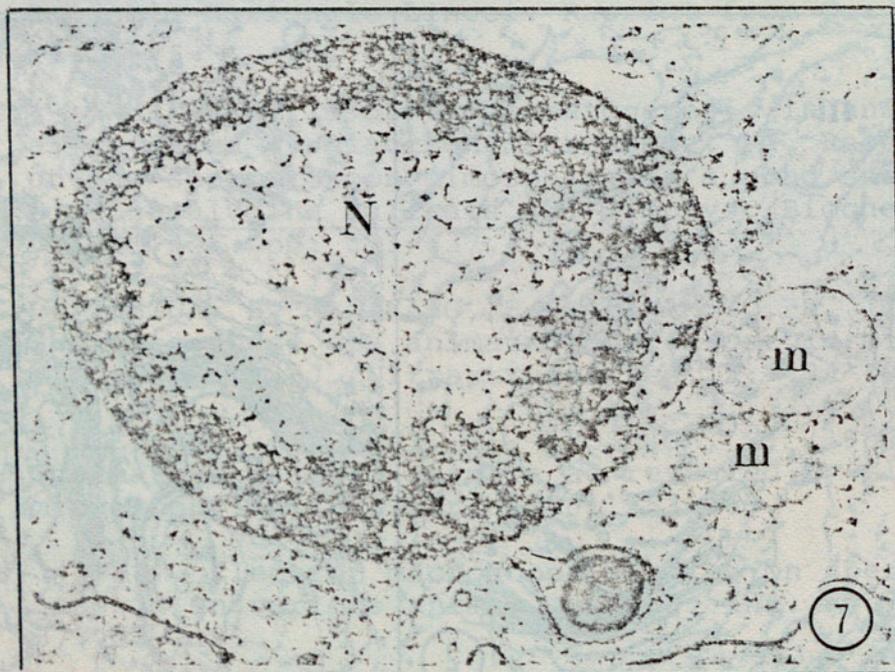


Figura 7- Detalle del proacrosoma formado, cortado transversalmente (flecha), próximo al condrioma (m) y al núcleo (N). Se puede apreciar un círculo interno que correspondería al futuro perforatorium. 28.600x

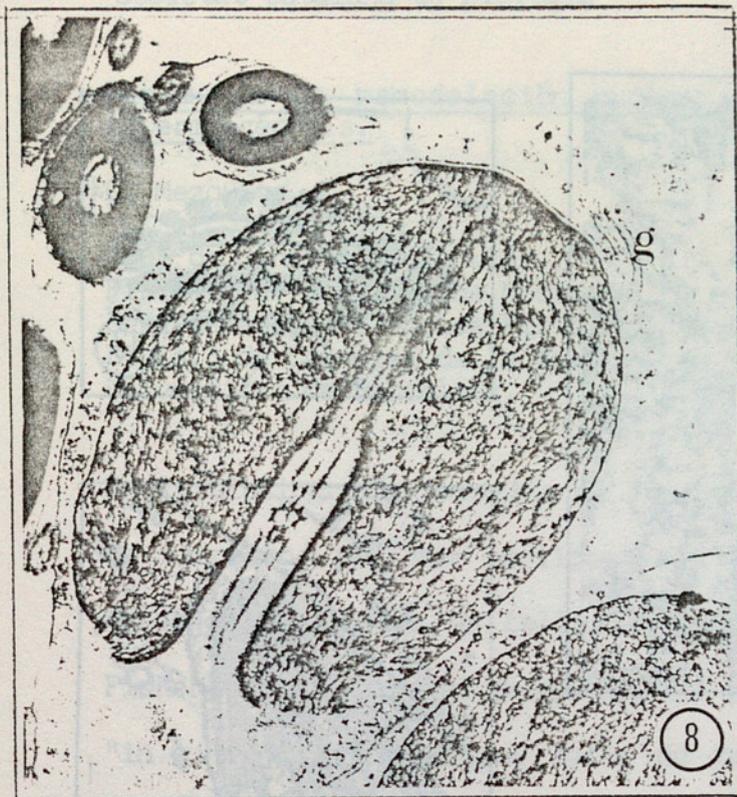


Figura 8- Espermatida en fase algo más avanzada, mostrando el complejo de Golgi (g) migrando hacia el ápice nuclear. 28.600x

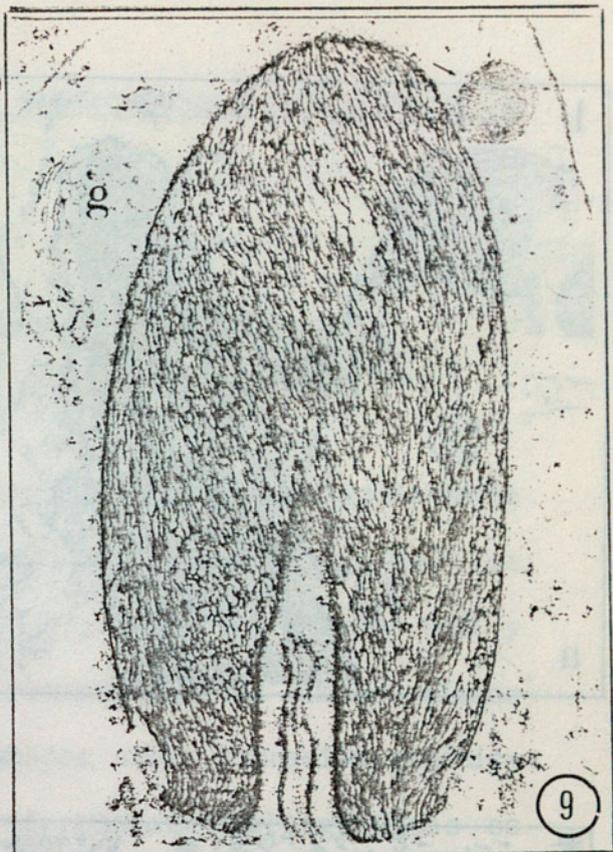


Figura 9- Espermatida mostrando la posición apical del proacrosoma (flecha) así como el complejo de Golgi (g) que parece iniciar su descenso. 32.400x

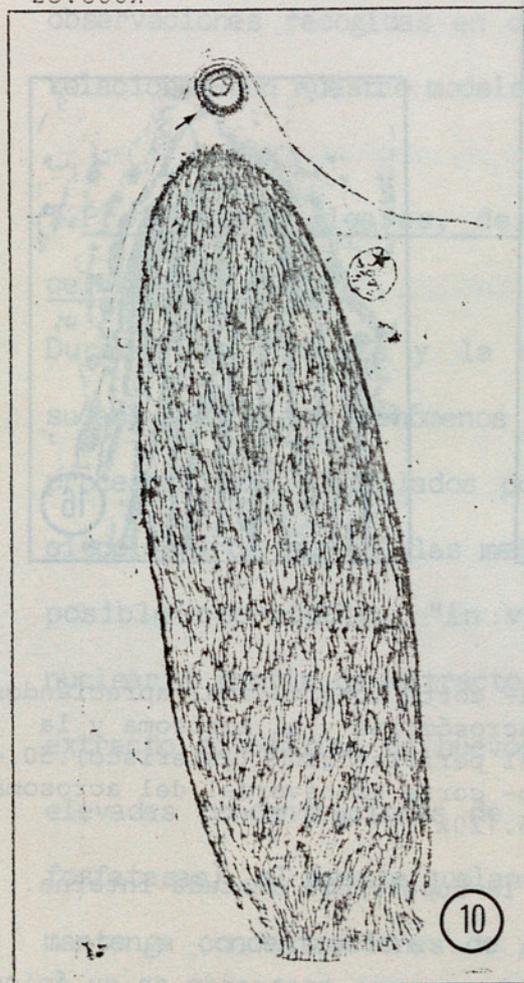


Figura 10- Espermatida mostrando el acrosoma recién formado en el ápice nuclear (flecha), así como un cuerpo multivesicular (asterisco) descendiendo hasta la base 17.300x

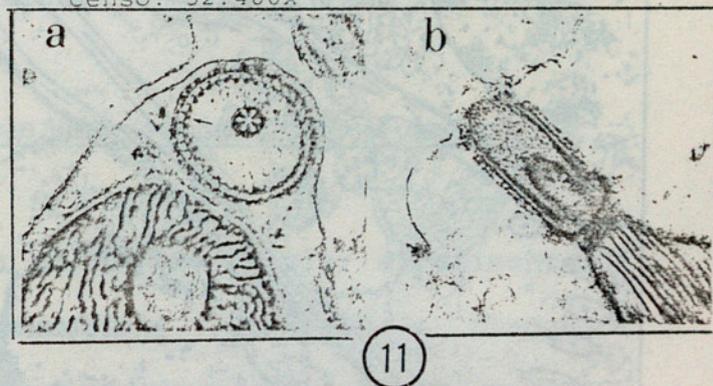


Figura 11- Secciones del acrosoma en esta fase: a. Sección transversal, pudiéndose apreciar la superficie dentada de su periferia (flecha), así como el perforatium (asterisco). 44.000x b. Sección longitudinal del mismo, mostrando la forma ovalada típica de esta fase, así como el perforatium (asterisco). 32.692x

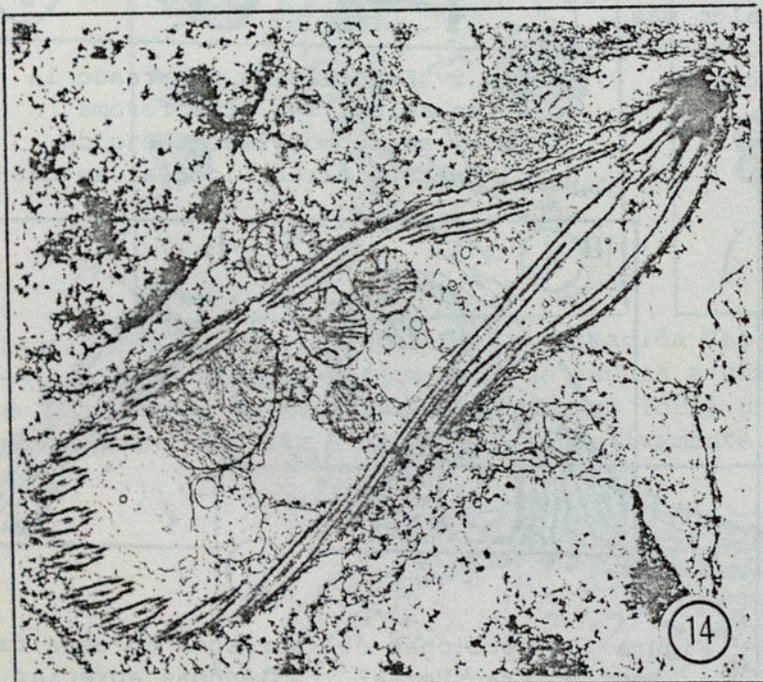
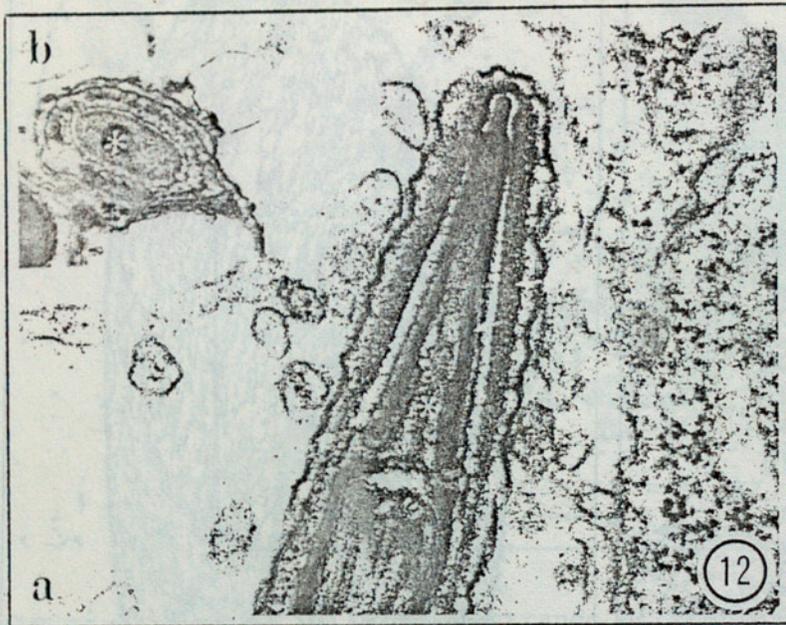


Figura 12- Acrosoma del espermatozoide maduro. a- corte longitudinal apreciándose dos líneas densas (flechas) entre las membrana acrosómicas y el acrosoma y la membrana plasmática, respectivamente, así como el perforatorium (asterisco). 50.444x
b- corte transversal del acrosoma donde se aprecia el perforatorium (asterisco) 15.120x

Figura 13- Corte sagital del acrosoma mostrando la superficie dentada interna. 30.800x

Figura 14- Corte longitudinal de un espermatozoide apireno mostrando en su ápice una estructura en forma de cofia (asterisco). 17.013 x.

Figura 15 y 16-Detalles del pseudoacrosoma del espermatozoide apireno observándose vesículas en su interior (flechas). 33600x y 44800x , respectivamente.