

ESPERMATOGENESIS EN LA RANA CHILENA *CAUDIVERBERA CAUDIVERBERA* (LINNE, 1758) (ANURA, LEPTODACTYLIDAE)*

Spermatogenesis in the Chilean Frog *Caudiverbera caudiverbera* (Linne, 1758) (Anura, Leptodactylidae)

IVONNE HERMOSILLA B.**; ANGELICA URBINA P. y JUAN C. CABRERA P.

RESUMEN

Se analiza a la microscopía de luz la espermatogénesis en *C. caudiverbera*, caracterizando los diferentes elementos celulares desde las células germinales primordiales (CGP) a espermatozoides. Las CGP asociadas a células foliculares, aparecen como las células de mayor tamaño (18-30 μm) y de núcleo altamente lobulado. Estados como espermatogonias I y II; espermatoцитos primarios y secundarios y espermátidas tempranas se encierran en una organización cística constituida por una membrana fibrosa que mantiene en su interior a grupos de células sincronizadas en cuanto a proliferación y diferenciación. Las espermátidas tardías abandonan el cisto y se embeben en las células de Sertoli donde finalizan su transformación a espermatozoides, éstos liberados al lumen tubular presentan una cabeza alargada de 80 μm y un flagelo de aproximadamente 200 μm .

ABSTRACT

The different cellular elements from primordial germ cells (PGC) to spermatozoa, during spermatogenesis in *C. caudiverbera* where characterized by light microscopy studies.

The PGC, associated to follicular cells, are the mayor in size (18-30 μm) and present a highly lobulated nucleus. Spermatogonio I and II, primary and secondary spermatocytes and early spermatids are seen inside a cystic organization surrounded by a fibrous membrane. The cystic cells are synchronized in proliferation and differentiation. The late spermatids leave the cysts and entering in close relationships with the Sertoli cells become spermatozoa, they are released into the tubular lumen. The sperm has an elongated head 80 μm and a flagelulum 200 μm of length.

Keywords: Anura. Leptodactylidae. Spermiogenesis. Histology.

*Proyecto 20.31.03 Dirección de Investigación. Universidad de Concepción.

**Laboratorio Biología del Desarrollo. Depto. de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales. Casilla 2407, Universidad de Concepción, Chile.

INTRODUCCION

Aspectos de la dinámica espermatogénica en anfibios han sido estudiados en varios grupos de anuros y urodelos. (Lofts, 1974). Trabajos utilizando especies distribuidas en territorio chileno no han merecido atención en este sentido, exceptuando dos realizados en *Bufo spinulosus* Wiegmann (Bustos, 1963; Bustos y Cubillos, 1967). En el primero se define el origen de las membranas celulares en cortes ultrafinos, considerando las etapas tempranas de la espermatogénesis; en el segundo trabajo, los autores establecen la dinámica particular exhibida por elementos germinales tempranos durante su ciclo celular. Estos estudios permiten resolver problemas en torno a la cinética y diferenciación de elementos espermatogénicos muy precisos dentro de la espermatogénesis. Análisis de esta naturaleza como aquellos que caracterizan variaciones estacionales normales o bajo condiciones alteradas requieren de la definición histológica que permite reconocer la heterogeneidad celular de la población espermatogénica. Por otro lado especies como nuestra rana chilena, ofrece una excelente oportunidad para aumentar información no sólo en su biología sino en resolver algunas controversias específicas en torno a la espermatogénesis en Anura (Poirier y Spink, 1971; Reed y Stanley, 1972; Lofts, 1974). La presente comunicación describe las características histológicas del testículo y sus elementos germinales en *C. caudiverbera*, desde los estados de células germinales primordiales (CGP) hasta el espermatozoide liberado al lumen tubular, utilizando la microscopía de luz.

MATERIALES Y METODOS

Machos maduros de *C. caudiverbera* recolectados durante la época de primavera en regiones cercanas a Concepción (36°45'S; 72°25'W), Chile, y posteriormente, mantenidos en piletas al aire libre en condiciones cercanas a las naturales en cuanto a alimentación, fotoperíodo y temperatura, fueron anestesiados por hipotermia y éter.

Disecados los testículos, éstos fueron fijados en Bouin deshidratados y aclarados en alcohol y dioxano, infiltrados en parafina y cortados a 7 μ m. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina de Mayer y contrarrestados en floxina. Todos los testículos fueron procesados íntegros, es decir, incluyendo totalmente la región craneal, medial y caudal. Observaciones de espermatozoides maduros se obtuvieron realizando fragmentación de trozos de testículos y suspensión de las células en Ringer de anfibios pH 7.2, posteriormente, centrifugados y resuspendidos varias veces para teñirlos utilizando como colorante una solución Leifson modificada.

RESULTADOS

El macho de *C. caudiverbera* presenta los testículos permanentemente ubicados en la cavidad abdominal del cuerpo, éstos corresponden a dos estructuras ovoides rodeados por una cubierta elástica y fibrosa, la túnica albugínea. Se encuentran conectados al mesonefros por un corto mesorquio a través del cual pasan los vasos eferentes.

En la gónada externamente se puede diferenciar 3 regiones: la craneal, ubicada anteriormente y conectada con los cuerpos grasos, la medial y posteriormente la región caudal (Fig. 1).

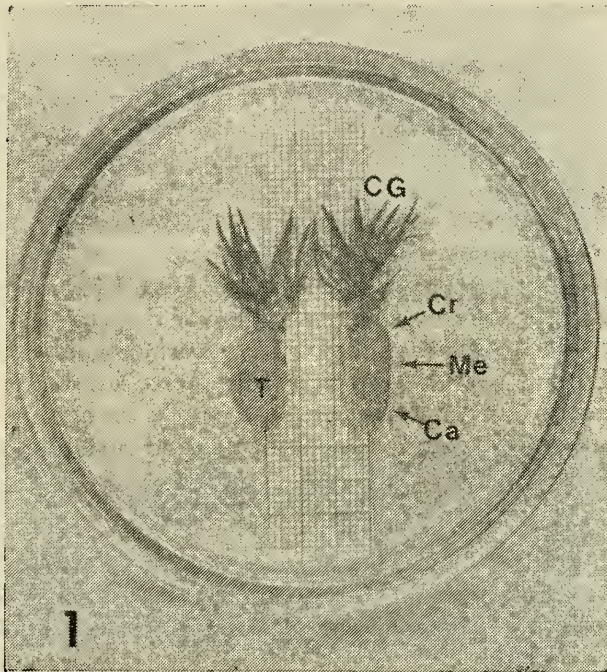


Fig. 1.- Testículo (T) y Cuerpos Grasos (CG). Regiones Craneal (Cr), Medial (Me) y Caudal (Ca).

Al cortar transversalmente la gónada quedan expuestos los túbulos seminíferos, delimitados por una delgada pared de tejido conectivo (Fig. 2). No se detecta diferencia histológica en los elementos seminíferos de las tres zonas testiculares.

En el interior de los túbulos se encuentran las células germinales, ya sea constituyendo elementos aislados o agrupaciones de células. Los agregados celulares pueden estar encerrados en una cápsula membranosa conteniendo las células germinales en un mismo estado de maduración, organización ésta denominada cisto, o embebidas en manojos en el citoplasma de una célula de Sértoli. Además, en el lúmen tubular es común detectar las células más maduras del proceso espermatogénico (Fig. 3).

CELULAS GERMINALES PRIMORDIALES (CGP)

Son células aisladas ubicadas siempre en la periferia del túbulo (Fig. 4 y 5) perfectamente detectables por su gran tamaño (18 μm – 30 μm), y su núcleo altamente lobulado muy poco denso frente a la hematoxilina, uno o dos nucleolos bastante basófilos y conspicuos pueden aparecer en los cortes. El citoplasma granular muestra una densidad similar a la del nucleoplasma frente a la floxina.

Cada una de estas células se encuentra rodeada por una o más células foliculares de menor tamaño y con un núcleo alargado densamente teñido con la hematoxilina (Fig. 4 y 5).

ESPERMATOGONIAS

Estas células constituyen grupos sincronizados de espermatogonias I o de espermatogonias II. Ambos agregados celulares se encierran en una pared de células foliculares cuyos núcleos reaccionan fuertemente a la hematoxilina; esta disposición de células foliculares en torno a las células germinales conforma el cisto, cuyo tamaño alcanza aproximadamente los 20–35 μm . Las espermatogonias I son agregaciones celulares pequeñas (2 ó más células) con un núcleo basófilo de gran indentación (Fig. 5 y 6) donde la cromatina muestra pequeñas áreas condensadas; los nucleolos densamente teñidos son perfectamente detectados; el citoplasma permanece con gran densidad granular. Las espermatogonias II son células que dentro del cisto, aparecen en mayor número, su núcleo oval no es mayor que el de las espermatogonias I y tanto la cromatina densa como los nucleolos definen el carácter espermatogonial de estas células (Fig 6 y 7).

ESPERMATOCITOS

La maduración meiótica origina dos tipos celulares: los espermatocitos primarios y los espermatocitos secundarios. Los primeros son células con un núcleo esférico (10 μm – 12.5 μm) muy a fin con la hematoxilina, contiene un nucleoplasma más denso y grumoso a la microscopía fotónica (Fig. 7 y 8); propio de esta célula son los complejos sinaptonémicos vistos en cortes finos (Urbina, sin publicar). Los espermatocitos secundarios tienen un núcleo también esférico (8 μm – 10 μm). Mucho más denso y basófilo frente a la hematoxilina (Fig. 9). Característico de los cistos que contienen espermatocitos, es la aparición gradual de pequeñas vacuolas o espacios intercelulares que coalescen haciéndose más evidentes en los cistos de espermatocitos secundarios (Fig. 8). Los cistos conteniendo espermatocitos miden aproximadamente 40–60 μm de diámetro.

ESPERMATIDAS

Los espermatocitos secundarios al dividirse dan origen a las espermatidas. Estas células se mantienen dentro de la conformación cística en sus etapas iniciales de células pequeñas y esféricas, distribuidas periféricamente en el cisto al parecer por la formación de vacuolas mayores que llenan el espacio central (Fig. 8).

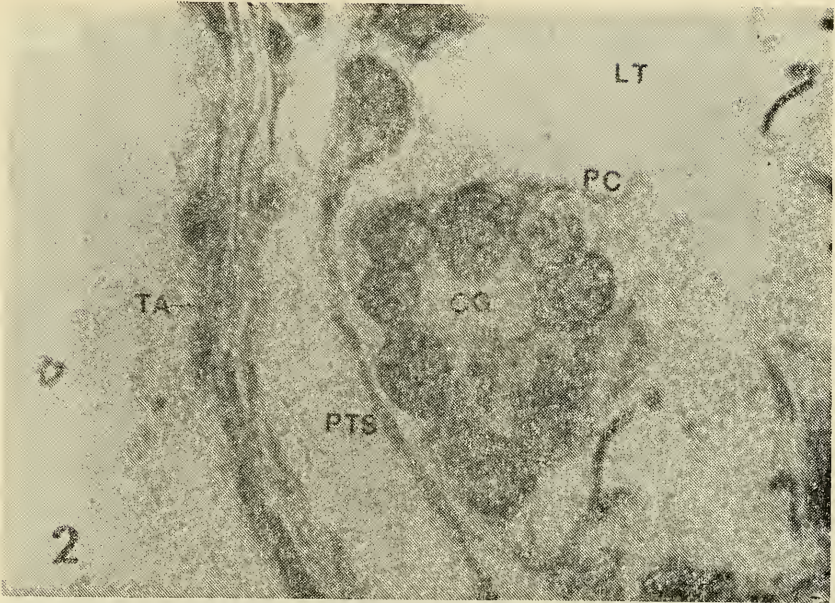


Fig. 2.- Corte de gónada masculina. Túnica Albugínea (TA). Pared Túbulos Seminíferos (PTS). Cisto (CG) y su pared (PC). Lúmen Tubular (LT). 315 X.

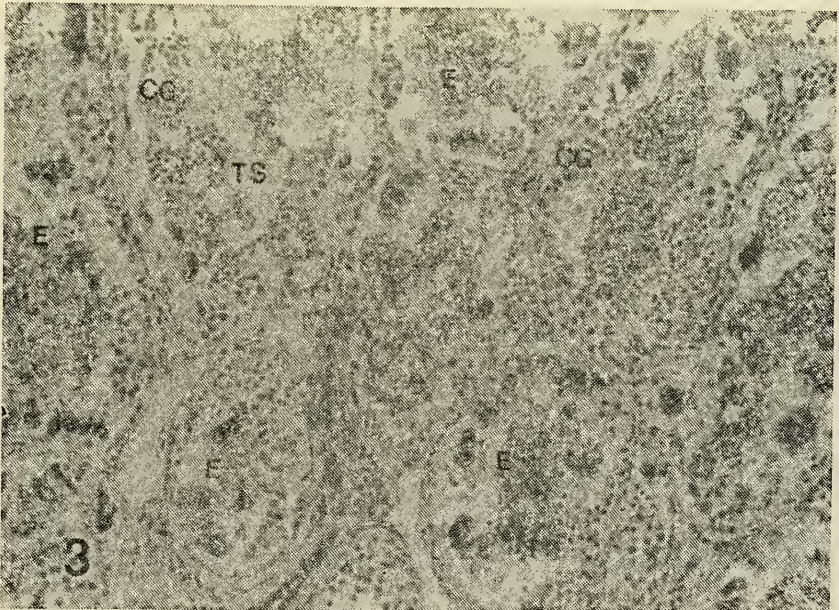


Fig. 3.- Vista general de los Túbulos Seminíferos (TS). Cistos Germinales (CG). Espermatozooides (E) en el lúmen tubular. 31.5 X.

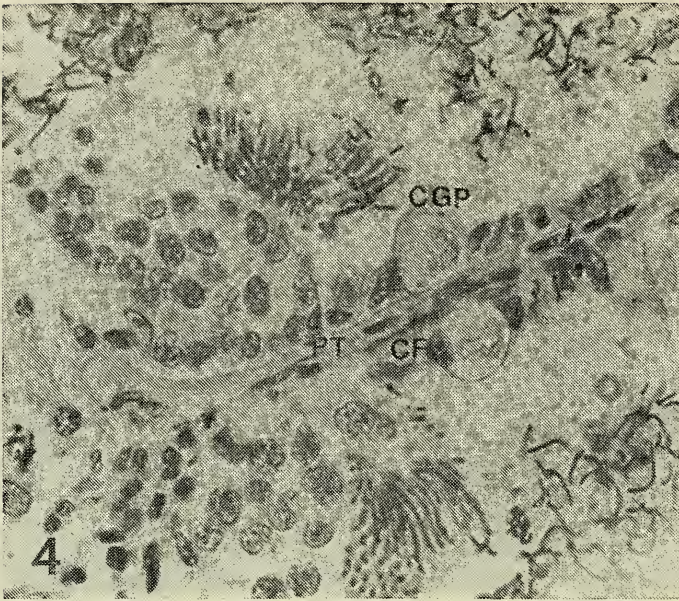


Fig. 4.- Corte a nivel de los elementos seminíferos. Células Germinales Primordiales (CGP) adosadas a la pared tubular (PT). Células Foliculares (CF) adosadas a las CGP. 126 X.

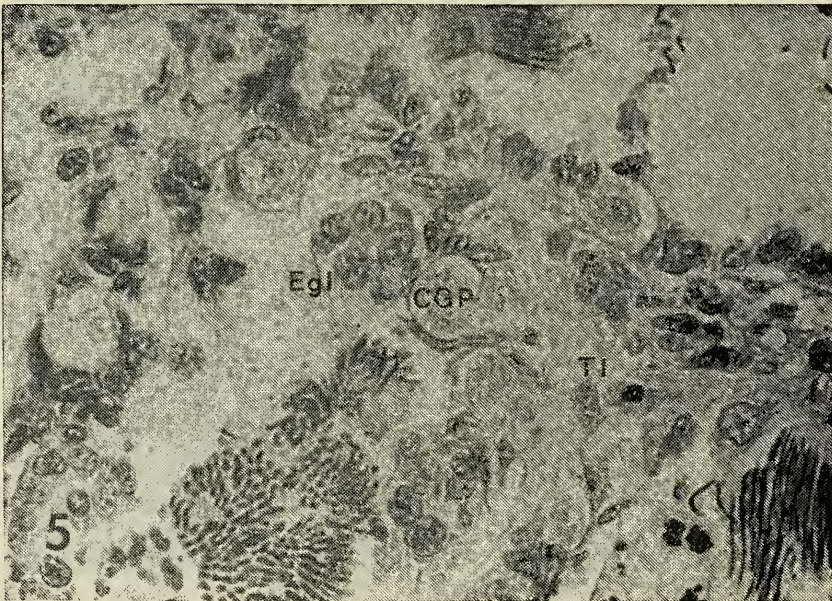


Fig. 5.- CGP y Cistos con Espermatogonias I (EgI). Tejedio Intersticial (TI) entre los túbulos seminíferos. 126 X.

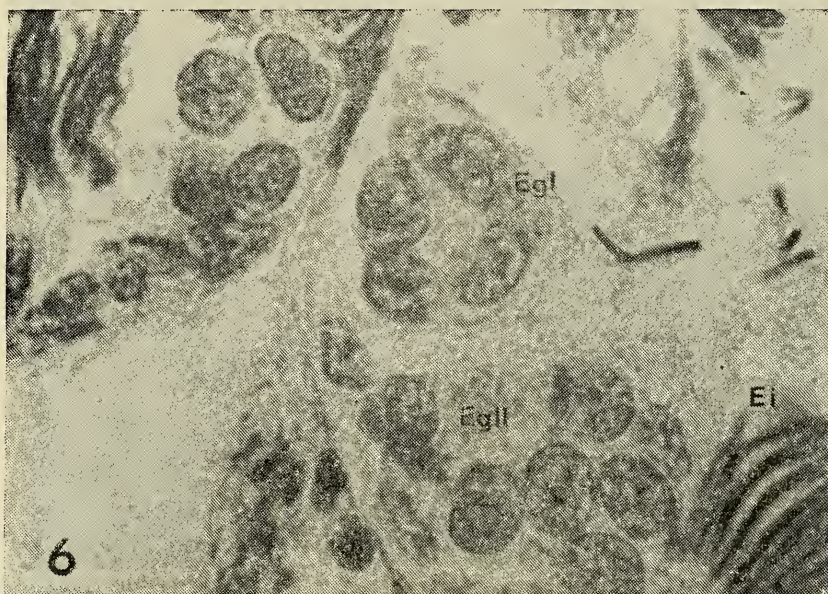


Fig. 6.- Cistos con Espermatogonias I (EgI) y cistos con Espermatogonias II (EgII). Espermatidas (Ei). 315 X.

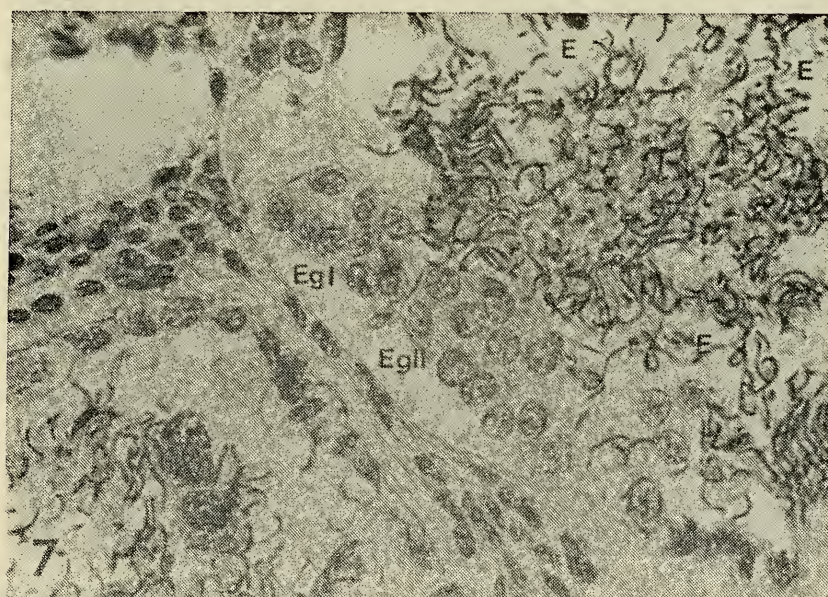


Fig. 7.- Cistos con Espermatogonias I (EgI) y Cistos con Espermatogonias II (EgII). Spermatozoides (E) en el lumen tubular. 126 X.

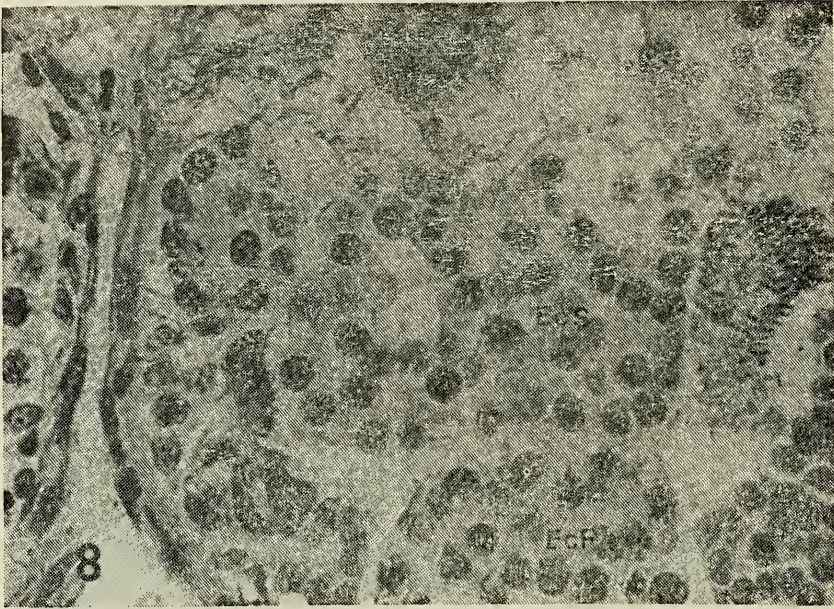


Fig. 8.- Cistos con Espermatocitos Primarios (EcP) y cistos con Espermatocitos Secundarios (EcS). 126 X.

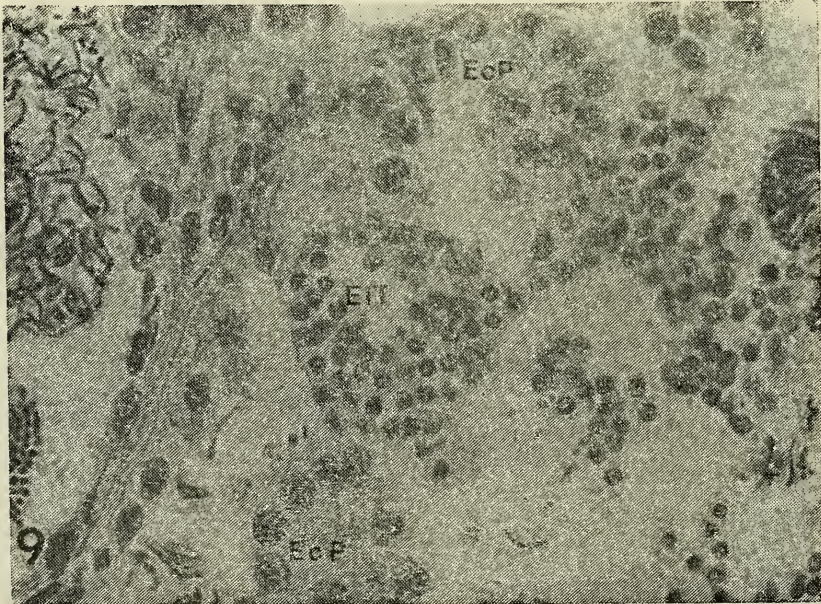


Fig. 9.- Cisto de Espermatidas Tempranas (EiT) con núcleo esférico. Cisto de Espermatocitos Primarios (EcP). 126 X.

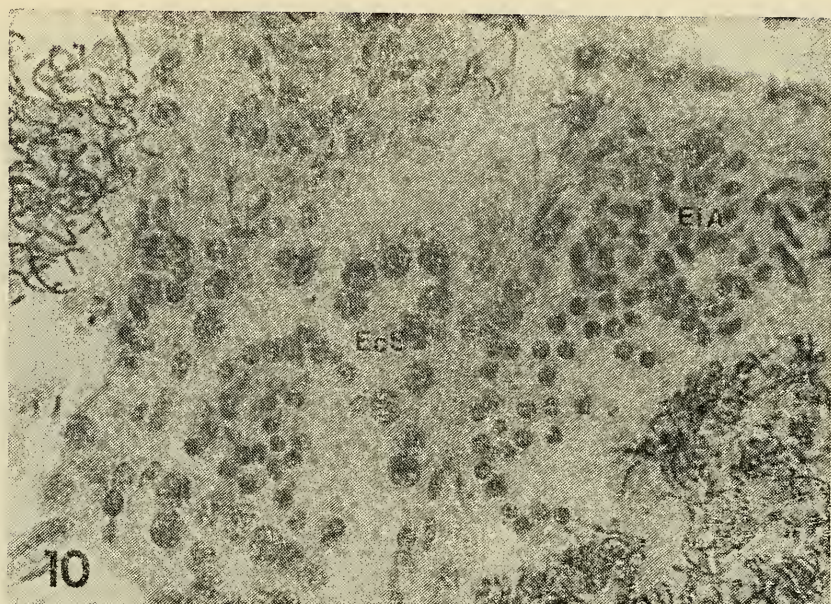


Fig. 10.- Cisto con Espermatidas Avanzadas (EiA) mostrando el núcleo ovalado. Cisto con Espermatocitos Secundarios (EcS). 126 X.



Fig. 11.- Espermatidas más avanzadas con su núcleo ya elongado (EimA). Espermatidas Tardías (EiTa), células de Sertoli (S), núcleo de la célula de Sertoli (N). 126 X.

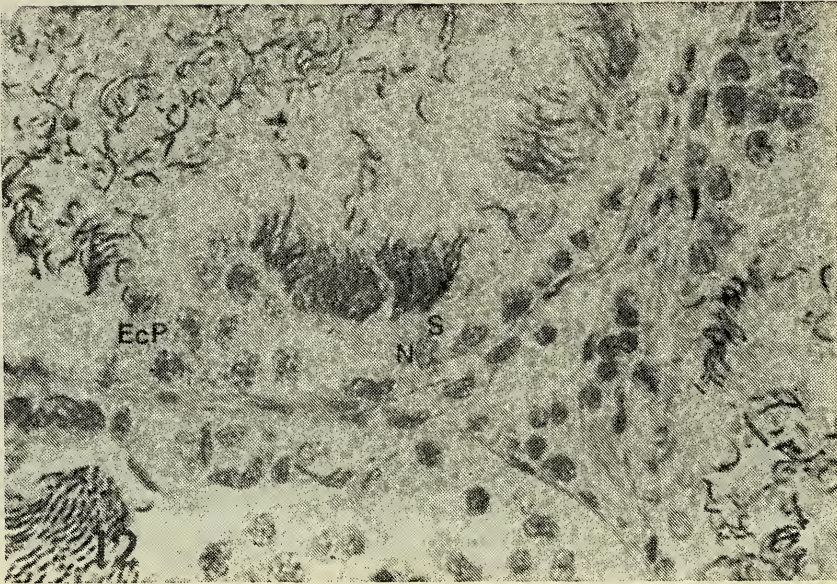


Fig. 12.- Célula de Sertoli (S) con núcleo (N) basal, cistos con Espermatocitos Primarios (EcP). 126 X.

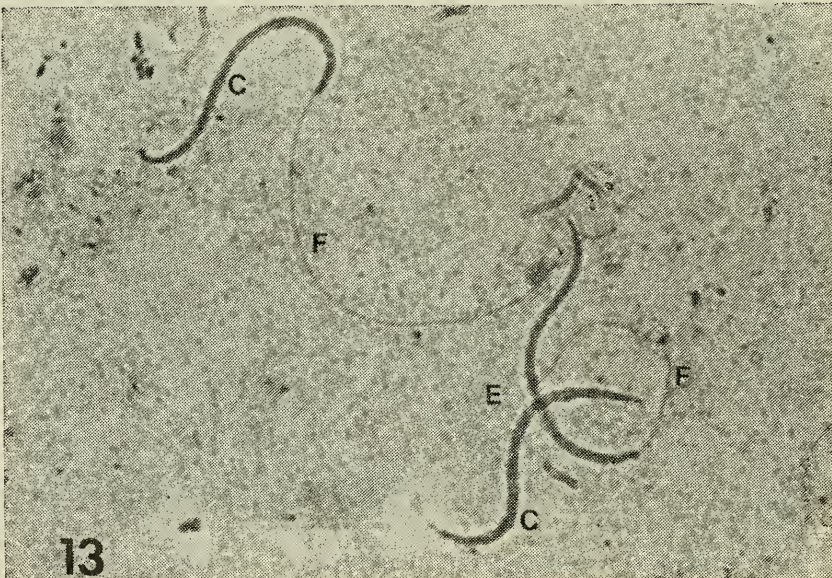


Fig. 13.- Espermatozoides (E) teñidos con solución Leifson; Cabeza (C); Flagelo (F). 400 X.

En las etapas posteriores de espermiogénesis el núcleo esférico aparece oval y luego elongado incrementando su afinidad por la hematoxilina. A mayor elongación nuclear incrementan los espacios o vacuolas intercelulares dejando al cisto prácticamente hueco (Fig. 9).

Cuando la elongación nuclear alcanza cierto nivel y las estructuras flagelares inician su diferenciación y crecimiento las paredes císticas que dan hacia el interior del túbulo se desintegran apareciendo las espermátidas tardías con los filamentos dirigidos hacia el lumen tubular y los núcleos alargados y en manojos embebidos en las células de Sertoli (Fig. 10 y 11). Las células de Sertoli adosadas a la pared tubular son células de gran tamaño; su núcleo oval y basal, es relativamente basófilo. Durante su interacción con la célula de Sertoli, el núcleo espermático se condensa extraordinariamente y el citoplasma de la célula gamética inicia su descarga para conformar en definitiva al espermio maduro.

ESPERMATOZOIDES

Cuando la maduración de las espermátidas dentro del túbulo llega a su fin, la asociación entre estas células y las células de Sertoli deja de existir. Las células germinales son así, definitivamente, liberadas al lumen tubular con características citológicas que permiten identificarlos como espermatozoides. En una suspensión tratada con solución Leifson se observa claramente, la cabeza elongada en la cual se insinúan dos curvaturas siendo de mayor amplitud la ubicada más cerca del flagelo (Fig. 12). El flagelo se extiende en una longitud que es, aproximadamente, dos a tres veces la de la cabeza que alcanza los 80 μ m.

DISCUSION

El presente trabajo permite asegurar que la histología en los testículos de *C. caudiverbera* muestra el modelo típico de los anuros. Los testículos similares a los otros anfibios están rodeados por una túnica albugínea. Septos de tejido conectivo conforman la pared tubular; entre los túbulos se distribuye escasamente el tejido intersticial rico en tejido conectivo, células de Leydig y elementos sanguíneos (Fig. 3). Los túbulos seminíferos contienen las células germinales ya sea adosadas directa o indirectamente a la pared tubular. Las células más inmaduras o CGP son de fácil reconocimiento por su gran tamaño y su núcleo eosinófilo. Su íntima relación a las células foliculares que las rodean sugiere una interacción temprana entre éstas y los elementos germinales (Fig. 4 y 5). En el siguiente estado de maduración o espermatogonias el núcleo multilobulado de las CGP se hace más regular indicando su proximidad a la división celular (Al-Mukhtar y Webb, 1971); estas células constituyen grupos sincronizados y separados de otros estados por células foliculares que se disponen constituyendo la envoltura cística. Esta misma conformación folicular continuará en torno a los estados de espermatoцитos, donde ocurrirán procesos tan importantes como los meió-

ticos (Lofts, 1974), y en los estados de espermátidas tempranas, que muestran las etapas iniciales de la conformación diferencial de la célula espermática, con respecto a los cambios del núcleo o de la vesícula acrosomal y del flagelo (Monesi, 1972).

Finalmente, las espermátidas tardías pasan de la organización cística a incorporarse al citoplasma de una célula folicular que por procesos diferenciativos (Lofts, 1974), constituye la célula de Sertoli, muy conspicua dentro de los túbulos seminíferos, esta célula de núcleo basal mantiene a las espermátidas tardías en manojos embebidas en su citoplasma antes de ser liberadas definitivamente al lumen tubular (Fig. 10 y 11).

El origen de la línea germinal espermatogénica en *C. caudiverbera* a partir de las CGP y su continuidad a través de las espermatogonias, espermaticitos, espermátidas y espermatozoides, es la consecuencia lógica de los procesos de diferenciación celular de estas células. Observado la posición y distribución de estas células a través de la diferenciación, se ha encontrado que si bien las CGP se mantienen en las paredes tubulares y los espermatozoides en el lumen tubular, el resto de la estirpe germinal no sigue un orden de distribución que permita asimilarlo a la secuencia establecida para el caso de los mamíferos donde hay una distribución regular desde las paredes tubulares hacia el lumen de los túbulos, esto no parece ocurrir para la especie estudiada como también para otras especies de anfibios (Atherton, 1974; Lofts, 1974). Los estados intermedios entre CGP y espermatozoides, que se encierran en cistos donde las células sincrónicamente, sobrellevan cambios proliferativos meióticos y diferenciativos, parece indicar una compartimentalización necesaria en este tipo de testículo que mantiene siempre el lumen tubular con espermatozoides ya sea durante el tiempo de actividad sexual como lejos de éste. (Hermosilla, Cabrera y Urbina, sin publicar).

Las observaciones descritas en esta comunicación destacan a grandes rasgos los tipos celulares que se suceden en la espermatogénesis de *Caudiverbera*, ello servirá como referencia valiosa para iniciar el estudio de los cambios ultraestructurales de la espermatogénesis en esta especie, como también el análisis de la onda espermatogénica de la especie tanto en los meses de invierno como de verano.

BIBLIOGRAFIA

- Al-Mukhtar, K. y A. Webb, 1971. An ultrastructural study of primordial germ cells ovogonia and oocytes in *Xenopus laevis* J. Embryol. exp. Morph. 26(2): 195-217.
- Atherton, R. W., 1974. A Gradient Analysis of Spermatogenesis in the Toad *Bufo woodhousei*. Girard (1854). Herpetologica 30.3): 240-244.
- Bustos-Obregon, E., 1963. Origen de la membrana celular durante los estados tempranos de la espermatogénesis en Bufo. Biológica XXXIV: 25-36.
- Bustos, E. y M. Cubillos, 1967. Ciclo celular en la espermatogénesis de *Bufo spinulosus*. Wiegman. Estudio radioautográfico preliminar. Biológica XL: 62-71.
- Lofts, B., 1974. Reproduction. In Lofts, B. ed. Physiology of the Amphibia II. Academic Press. N. York. I-XI.: 107-218.
- Monesi, V., 1972. Spermatogenesis and the spermatozoo. In Austin, C. R. ed. Germ Cells and Fertilization. Cambridge at the University Press. I-VIII, : 46-84.
- Poirier, G. R. and G. C. Spink, 1971. The Ultrastructure of Testicular Spermatozoa in Two Species of *Rana*. J. Ultrastruct. Res. 36(3-4): 455-465.
- Reed, S., H. Stanley, 1972. Fine Structure of Spermatogenesis in the South African Clawed Toad *Xenopus daevis* Daudin. J. Ultrastruct. Res. 41(3-4): 277-295.