

ESPERMIOHISTOGENESIS EN *NETA CHILENSIS* (WALKER) (DIPTERA: BRACHYCERA)

Spermiogenesis in *Neta chilensis* (Walker) (Diptera: Brachycera)

EUGENIA A. REYES*, MANUEL E. ALMONACID*, IVONNE HERMOSILLA* Y ANDRES O. ANGULO**

RESUMEN

Se analizan los elementos estructurales que participan en la espermiohistogénesis de *Neta chilensis* (Walker) (Diptera: Brachycera). Se observa durante este proceso las transformaciones que ocurren en las espermátidas y que se inician con la formación de una vesícula acrosomal, dentro de la cual es posible distinguir un material heterogéneo y que en la espermátida tardía llega a ser morfológicamente diferente. Al final del proceso se forma un acrosoma cónico como resultado de fuerzas morfogenéticas intrínsecas al acrosoma.

Simultáneamente, el núcleo experimenta una gradual elongación con formación de masas cromatínicas cada vez más densas y que culmina con la organización de cordones tortuosos y compactos. En el tercio posterior de la cabeza del espermatozoide se inserta el flagelo; el axonema tiene el patrón microtubular convencional de 9 + 2.

Por otro lado, las mitocondrias forman en la espermátida joven el cuerpo mitocondrial ("nebenkern"), el cual se transforma posteriormente en dos derivados mitocondriales, los que migran hacia el flagelo en formación.

Keywords: Spermiogenesis. Diptera Brachycera. Neotropics.

ABSTRACT

The ultrastructural elements participating in the spermiogenesis of *Neta chilensis* (Walker) (Diptera: Brachycera) are presented. In early spermiogenesis, an acrosomal vesicle is formed with a heterogeneous material filling its interior; later, the vesicle becomes morphologically distinct. The final acrosome has a conical shape as a result of morphogenetic forces within the acrosomal vesicle.

Simultaneously, a gradual elongation of the nucleus takes place and masses of increasing packed chromatin are formed, all of which culminates with the formation of tortuous and compact cords. The flagellum is inserted in the third posterior of the spermatozoon head. The axoneme has the conventional 9 + 2 microtubular pattern.

On the other hand, the mitochondria of the early spermatid form the "nebenkern", from which two mitochondrial derivatives are later formed which migrate to the forming flagellum.

INTRODUCCION

Neta chilensis (Walker) es un díptero de la Familia Calliphoridae autóctono del cono sur del continente americano, de gran tamaño, solitario, con dimorfismo sexual acentuado. Los machos son notoriamente más grandes que las hembras, alcanzando un largo aproximado de 16 a 18 milímetros (Reyes y Almonacid, 1984).

*Depto. de Biología Molecular.

**Depto. de Zoología, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales, Universidad de Concepción, Casilla 2407, Concepción, Chile, S.A.

La presente investigación forma parte del Proyecto N° 2.08.94 de la Dirección de Investigación, Universidad de Concepción.

Los cambios ultraestructurales durante la espermiogénesis en dípteros han sido estudiados en varias especies, destacando el gran número de trabajos realizados en *Drosophila melanogaster* (Cooper, 1950; Shoup, 1967; Bairati and Perotti, 1970; Stanley *et al.*, 1972; Tokuyasa, 1974; Wilkinson *et al.*, 1974; Habliston *et al.*, 1977), los cuales permiten hoy en día tener un conocimiento avanzado de los procesos de diferenciación de las células germinales en estos insectos. Considerando la amplia distribución de *N. chilensis* y el escaso estudio que se ha realizado en este díptero, se ha continuado investigando este organismo en nuestro laboratorio. Ha parecido interesante examinar la espermiogénesis con el objetivo de caracterizar los procesos diferenciativos generales en relación a: acrosoma, núcleo, mitocondrias y axonema.

MATERIALES Y METODO

Testículos de machos adultos de *N. chilensis* (Walker) mantenidos en laboratorio (Reyes y Almonacid, 1984) fueron disecados y preparados para microscopía electrónica. Pequeñas muestras tratadas para microscopía de transmisión (TEM), fueron fijadas en glutaraldehído al 2,5% en buffer fosfato 0,025 M (pH 7,4) y luego en tetróxido de osmio al 1% en buffer fosfato 0,1 M (pH 7,4) para incluir posteriormente en Epon-Araldita. Los cortes de 400Å de espesor fueron doblemente teñidos en acetato de uranilo y citrato de plomo para finalmente ser observados en un microscopio electrónico Philips EM 200.

Para microscopía electrónica de barrido (SEM), luego de la postfijación en tetróxido de osmio, las muestras fueron deshidratadas en una serie de acetonas de concentración creciente, sometidas a secado en punto crítico (CO₂) y cubiertas con una capa de oro en un metalizador Edwards S150. La observación se realizó en un microscopio electrónico Siemens Etec Autoscan U-1.

RESULTADOS

1. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE LOS TESTÍCULOS

Los testículos de *N. chilensis* son estructuras

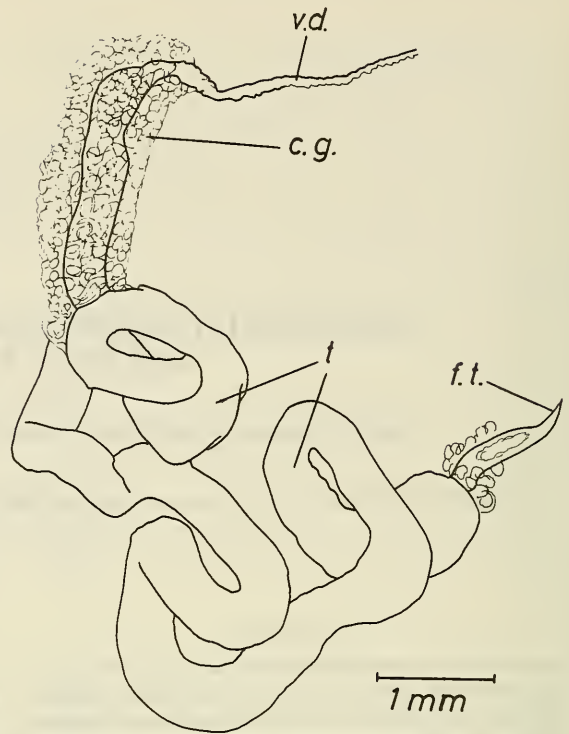


Fig. 1. Morfología del testículo de *N. chilensis*
ft = filamento terminal; t = testículo;
cg = cuerpo grasoso; vd = vaso deferente.

tubulares y uniformes en todo su diámetro (Fig. 1). Comienzan con un corto filamento terminal de 0,86 mm de largo, subcónico alargado; luego el largo tubo testicular (de 16,0 mm de longitud y 0,51 mm de diámetro) se enrolla desordenadamente sobre sí mismo sin llegar a formar un ovillo o masa compacta. En su porción terminal se encuentra cubierto por tejido graso (cuerpo graso). A continuación se encuentra el vaso deferente, el cual es relativamente corto (1,85 mm de largo) y que se va atenuando en su diámetro, el que se hace cada vez menor a medida que se acerca al extremo por donde se conecta al otro vaso deferente.

Los cortes realizados a lo largo del testículo evidencian una madurez progresiva en sentido antero-posterior, apareciendo la organización típica de los túbulos seminíferos, en los cuales se disponen los cistos espermatogénicos (Fig. 2) limitados por una sola capa de células

de Sertoli. Las células germinales dentro de un cisto se desarrollan sincrónicamente. En los túbulos es posible identificar todos los estados de la espermatogénesis.

2. ASPECTOS MORFOLÓGICOS Y CITOLÓGICOS DE LA ESPERMIOHISTOGÉNESIS

La espermátida temprana y la espermátida tardía de *N. chilensis* tienen características generales semejantes a las de la mayoría de los insectos en cuanto a la diferenciación del acrosoma, mitocondrias, núcleo y flagelo.

2.1. Acrosoma

Esta estructura inicia su diferenciación por separación de pequeñas vesículas del aparato de Golgi. Espermátidas tempranas muestran ya coalescencia de estas vesículas, las que gradualmente van constituyendo la vesícula proacrosómica, cuyo material interno electrodenso muestra pequeñas zonas translúcidas. Posteriormente, el material interno llega a ser más denso y compacto a través del complejo acrosomal (Fig. 3). A medida que esto sucede, el sistema acrosomal pasa a la siguiente fase, la fase del sombrero o capuchón definiendo la polaridad de la espermátida. Su extremo cefálico protruye causando la elongación del acrosoma que se observa cubierto por una doble membrana (Fig. 4). En la espermátida avanzada y en el espermatozoide adquiere forma cónica con un extremo anterior de gran densidad electrónica (Fig. 5).

2.2. Mitocondrias

En las espermátidas tempranas de muchos insectos las mitocondrias se agregan y forman un solo cuerpo llamado cuerpo mitocondrial o NEBENKERN (Pratt, 1970). En secciones de "nebenkern" vistas a la microscopía electrónica se observa que este cuerpo está formado de varias mitocondrias (Fig. 6).

El cuerpo mitocondrial se encuentra vecino al núcleo (de ahí su denominación). Un "nebenkern" recién formado es una anastomosis complicada de segmentos mitocondriales como bastoncitos que toman diferentes formas. Al finalizar la espermiogénesis se observa

que el "nebenkern" llega a ser bipartita por ruptura de los segmentos, para finalizar en dos derivados mitocondriales (Fig. 7), los cuales se alargan enormemente a lo largo del axonema. Una de las principales características en relación a estos derivados es la presencia en su interior de un material cristalizado probablemente de naturaleza proteica (cuerpos paracrystalinos) (Fig. 12).

2.3. Núcleo

En la espermátida temprana el núcleo es de gran tamaño y esférico, su cromatina es finamente granular y se tiñe en forma moderada (Figs. 3 y 4). Durante este estado se observa además un engrosamiento de la envoltura nuclear, que abarca aproximadamente la quinta parte de su superficie (Fig. 8). Con mayor aumento se observa que este engrosamiento no es continuo (Fig. 9).

A medida que transcurre la elongación espermática, la cromatina va formando masas más densas embebidas en el nucleoplasma claro; en gran medida se encuentra asociada a la envoltura nuclear (Fig. 4). En estados avanzados el nucleoplasma tiende a desaparecer, la cromatina constituye cordones abundantes y tortuosos que en los cortes aparecen longitudinales y/o transversales (Figs. 5 y 10).

El núcleo gradualmente conforma una estructura elongada que en su tercio posterior inserta la base del filamento axial (Fig. 5), permaneciendo estructuralmente bien asociado a las mitocondrias y al centriolo proximal (Fig. 11). Cortes realizados a este nivel muestran la presencia de microtúbulos en torno a la envoltura nuclear; esta vecindad de los microtúbulos al núcleo podría interpretarse como una participación en los procesos de la morfogénesis nuclear (Courtens, 1982). Además es posible observar en estos cortes dos escotaduras laterales que, carentes de microtúbulos, alojan a dos formaciones caracterizadas por membranas electroopacas que limitan a un material translúcido (Fig. 11).

2.4. Axonema

El filamento axial hace su aparición en una escotadura lateral del núcleo de la espermáti-

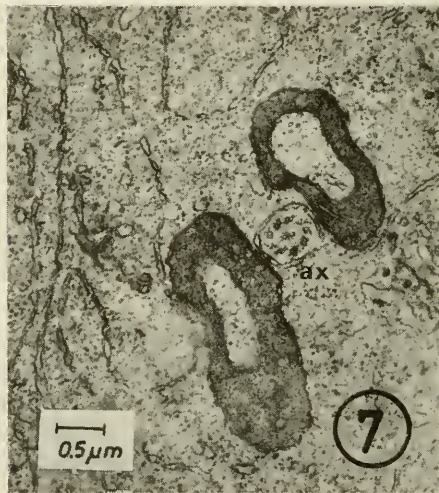
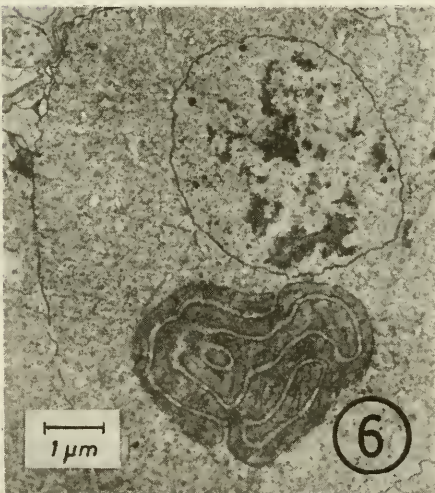
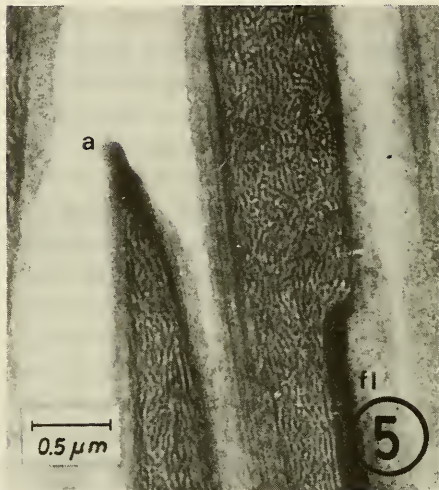
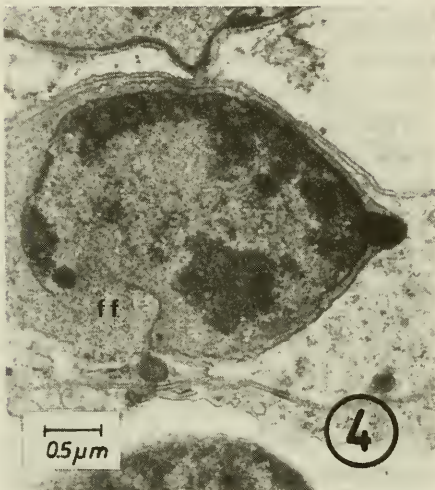
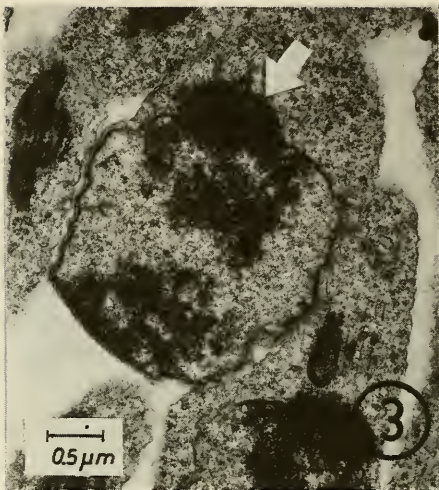
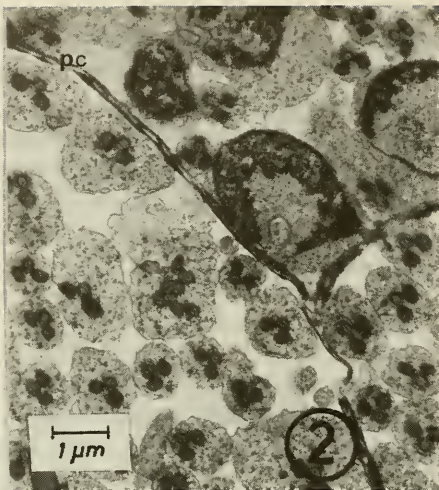


Fig. 2. Corte transversal por testículo. Cistos espermatogénicos.

pc = pared cística. 9400 X

Fig. 3. Espermátida temprana. Gránulo acrosómico (flecha)

20000 X

Fig. 4. Elongación inicial de la espermátida.

ff = fosa flagelar. 20000 X

Fig. 5. Corte longitudinal de la región cefálica del espermatozoide.

a = acrosoma; fl = flagelo. 33300 X

Fig. 6. Cuerpo mitocondrial ("nebenkern") de espermátida temprana.

12000 X

Fig. 7. Derivados mitocondriales rodeando al axonema (ax).

27200 X.

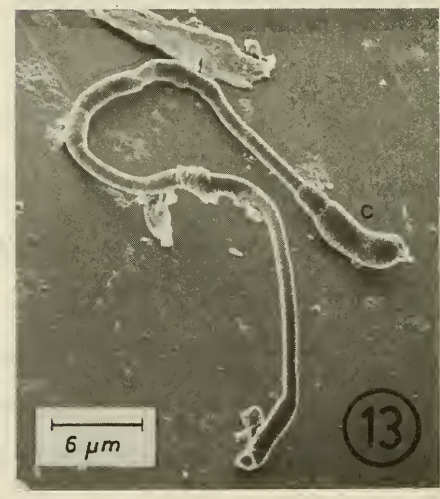
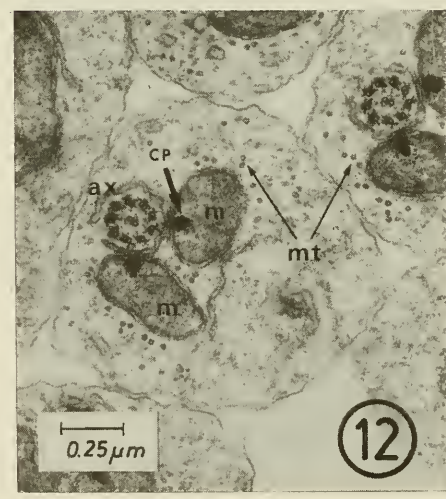
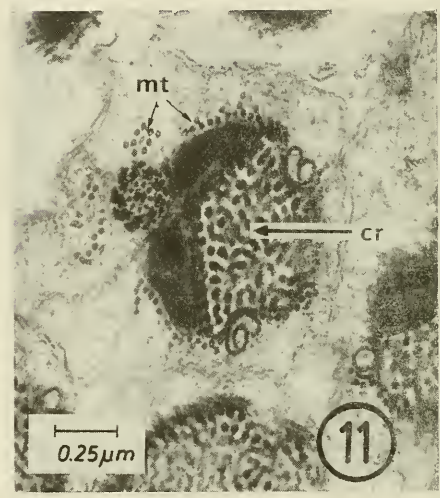
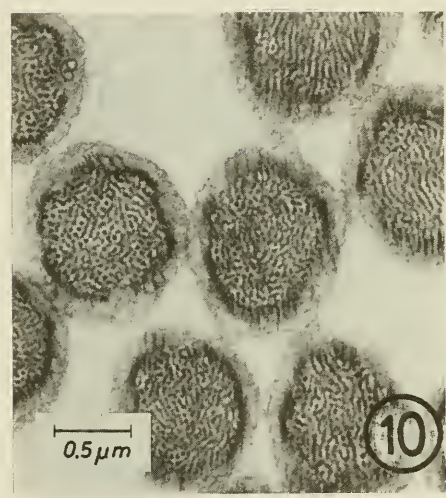
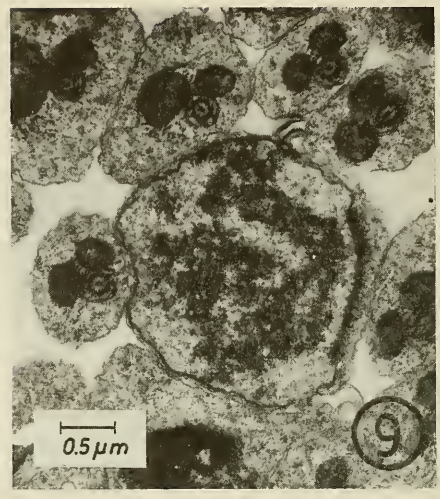
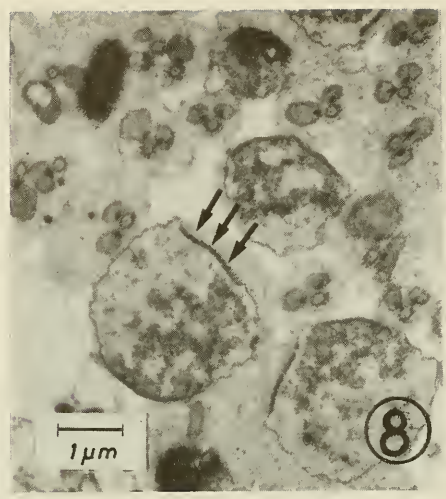


Fig. 8. Engrosamiento de una parte de la envoltura nuclear (flechas).
12000 X.

Fig. 9. Discontinuidad del engrosamiento de la envoltura nuclear.
20000 X.

Fig. 10. Corte transversal de la región cefálica del espermatozoide.
28000 X.

Fig. 11. Tercio posterior de la cabeza de un espermatozoide.
cr = cromatina; mt = microtúbulos. 43000 X

Fig. 12. Corte transversal del flagelo. m = mitocondria; cp = cuerpo paracristalino; ax = axonema; mt = microtúbulos.
43000 X.

Fig. 13. Espermatozoide visto al microscopio de barrido (SEM).
c = cabeza. 160 X.

da temprana. Al mismo tiempo que se inicia la elongación nuclear, queda de manifiesto una gran fosa flagelar por invaginación de la envoltura nuclear (Fig. 4). Posteriormente, en esta escotadura se inserta el flagelo ocupando el último tercio de la cabeza del espermatozoide. Cortes transversales en áreas más distales muestran la configuración típica 9+2 de los microtúbulos del axonema (Fig. 12). Una serie de microtúbulos acompañan al flagelo en todo su recorrido, disponiéndose irregularmente.

En cortes por zonas más distales de la pieza media persiste la asociación entre axonema y mitocondrias, estas últimas con los cuerpos paracrystalinos dirigidos hacia la superficie de contacto de éstos y el flagelo (Fig. 12).

El término de la espermiogénesis define la morfología del espermatozoide de la especie. En la Fig. 13 se observa un espermatozoide maduro fotografiado al SEM; en él se distingue la cabeza, cuyo tamaño corresponde aproximadamente a 1/9 del largo total del espermatozoide.

CONCLUSIONES

1. Es interesante destacar que, siendo *Neta chilensis* (Walker) un díptero de la Familia Calliphoridae, su morfología testicular es similar a la de *Glossina palpalis* (R-D) (Musci-

dae) y también lo es con respecto a la de los Pupipara (v. gr. Hippoboscidae y Braulidae). Sin embargo, a diferencia de los dípteros citados, los testículos de *N. chilensis* no forman un ovillo compacto (Séguy, 1951; Richards and Davies, 1977).

2. A la microscopía electrónica de transmisión (TEM) es posible observar en el interior de los túbulos seminíferos a los cistos, cuyas células germinales se encuentran en un mismo estado de diferenciación (Fig. 2).
3. Al igual que muchos insectos, en la espermatida temprana de *N. chilensis* las mitocondrias forman el cuerpo mitocondrial o "nebenkern" (Fig. 6).
4. El flagelo emerge del tercio posterior de la cabeza del espermatozoide (Fig. 5).
5. La organización microtubular del axonema corresponde al patrón 9 + 2; exteriormente grupos de microtúbulos acompañan al flagelo (Fig. 11).
6. En el interior de las mitocondrias ubicadas en el flagelo existen estructuras paracrystalinas orientadas hacia la región vecina al axonema (Fig. 12), descritos también en otros invertebrados.
7. En la envoltura nuclear se advierte un engrosamiento localizado, lo cual sugiere que tempranamente se establezca una polaridad en la diferenciación de la espermatida (Fig. 9).

BIBLIOGRAFIA

- Bairati, A. and Perotti, E. 1970. Some comparative considerations on the ultrastructure of *Drosophila melanogaster* spermatozoon. In: Comparative Spermatology. B. Bacetti, Ed. Academic Press. New York.
- Cooper, K.W. 1950. Normal spermatogenesis in *Drosophila*. In: Biology of *Drosophila*. M. Demerec, Ed. J. Wiley & Sons. New York.
- Courtens, Y.L. 1982. Roles indirects des microtubules dans la morphogènes nucléaire de spermatides. Reprod. Nutr. Dévelop. 22: 825-840.
- Habliston, D.L., Stanley, H.P. and Bowman, J.T. 1977. Genetic control of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*: The effect of abnormal association of centrosome and nucleus in mutant Ms(1). J. Ultrastr. Res. 60: 221-234.
- Pratt, S. 1970. Formation and differentiation of the nebenkern in spermatids of an hemipteran insect, *Murgantia histrionica*. In: Comparative Spermatology. B. Bacetti, Ed. Academic Press. New York.
- Reyes, E.A. y Almonacid, M.E. 1984. Ciclo biológico de *Neta chilensis* (Walker) (Insecta: Díptera). Studies on Neotropical Fauna and Environment, Vol. 19(4): 219-222.
- Richards, O.W. and Davies, R.G. 1977. Imm's General Textbook of Entomology. 10th ed. Chapman & Hall, London 1: 418 p.; 2: 1354 p.
- Séguy, E. 1951. Ordre des Díptères. In: P.P. Grassé, Traité de Zoologie, 10(1): 349-744.
- Shoup, J.R. 1967. Spermiogenesis in wild-type and in a

- male sterility mutant of *Drosophila melanogaster*, J. Cell Biol. 32: 663-675.
- Stanley, H.P., Bowman, J.T., Romrell, L.J., Reed, S.C. and Wilkinson, R.F. 1972. Fine structure of normal spermatid differentiation in *Drosophila melanogaster*. J. Ultrastruct. Res. 41: 433-466.
- Tokuyasa, K.T. 1974. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. IV) Nuclear transformation. J. Ultrastruct. Res. 48: 284.
- Wilkinson, R.F., Stanley, H.P. and Bowman, J.T. 1974. Genetic control of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*: The effect of abnormal cytoplasmic microtubules population in mutant ms (3) IOR and its colcemid-induced phenocopy. J. Ultrastruct. Res. 48: 242-258.