

# TESI DOCTORAL

Pepita Giménez Bonafé

*Proteïnes que estructurèn i remodelen  
la cromatina espermàtica.  
Alguns casos especials*

Novembre, 1999

### 5- Observació

Els talls varen ser observats en microscopis electronics Philips 301, del Departament d'Enginyeria Química (ETSEIB) de la UPC, i HITACHI H-800 i 600 de la Unitat de Microscòpia Electrònica dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona, treballant a 80 i 100 kV de potencial d'acceleració, respectivament.

Una part de les imatges van ser enregistrades sobre plaques Kodak 4489 (*ESTAR Thick Base*), i positivat amb paper ILFORD MULTIGRADE RC de Luxe 1M, utilitzant una ampliadora Durst mod. Laborator 1200 de llum puntual, o bé es va fer servir pel·lícula KODAK tipus Eastman i el positivat sobre paper AGFA-Browira, utilitzant una ampliadora DURST mod. M-605.

L'altra part de les imatges va ser enregistrada en un ordinador per posteriorment ser processades mitjançant el programa *Paintshop Pro* versió 4.10 (*Shareware Jasc Incorporated*).

#### iii. Microscòpia Electrònica de Rastreig

El material per ser observat en el microscopi electrònic d'escombratge (rastreig) es va fixar de la mateixa manera que pel cas del microscopi electrònic de transmissió. A partir de l'etapa de deshidratació es van aplicar les tècniques de processat específiques per la microscòpia de rastreig.

Un cop deshidratat el material, es va utilitzar el mètode del punt crític de desecació. L'aigua de les mostres va ser substituïda per diòxid de carboni líquid, éssent necessari realitzar després de la deshidratació una infiltració intermitja amb acetat d'amil. A continuació, les mostres es van muntar sobre portaobjectes del microscopi electrònic de rastreig i es va procedir al seu recobriment amb una capa d'or d'uns 20 a 50 nm de gruix, segons la textura de la mostra. Per tal recobriment es va utilitzar l'Sputter Coater-E 5000 de POLARON.

Les observacions es van realitzar en microscopis electrònics de rastreig, HITACHI H-2300, treballant de 10 a 30 kV de potencial d'acceleració, segons el tipus de mostra. Les imatges es van imprimir sobre pel·lícula fotogràfica KODAK T-MAX-120, 100.

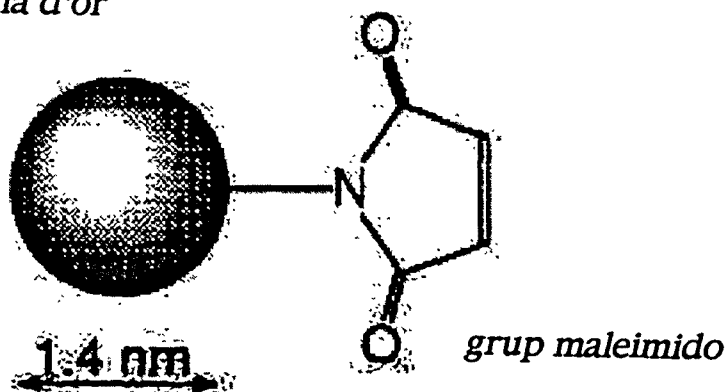
**b. Localització microscòpica de ponts disulfur per marcatge directe amb monomaleimido-nanogold (MMNA)**

Un dels objectius d'aquest treball ha estat el de localitzar els ponts disulfur en de l'espermatozoide d'*Eledone cirrhosa*. La tècnica immunocitoquímica del monomaleimido-nanogold (MMNA) proporciona un marcatge específic de la posició dels grups -SH reduïts tant en la cua com en el nucli de l'espermatozoide (*Nanogold Product Information, Nanoprobes Inc, Stony Brook, N.Y.*).

El MMNA està format per una partícula d'or d' 1.4 nm de diàmetre unida a un grup maleimido (v. Fig.II.C.2.) que és el que presenta afinitat pels grups tiol (-SH), quedant així marcats amb or. Per intensificar el marcatge s'utilitza plata, i d'aquesta manera, mitjançant un puntejat, queden localitzats els grups -SH en l'espermatozoide.

Fig.II.C.2. Monomaleimido-nanogold (MMNA), marcador de grups -SH (*Nanoprobes, Inc. Stony Brook, N.Y.*)

partícula d'or



La idea es basa en marcar els ponts disulfur d'una forma indirecta. Tal i com s'ha vist, el MMNA s'uneix als grups tiol (-SH) de les cisteïnes proporcionant un marcatge específic dels mateixos; així doncs, el MMNA s'unirà a les cisteïnes que es trobin en la forma reduïda (cys-SH): la incubació amb MMNA s'ha fet abans i després de la reducció dels ponts disulfur de les proteïnes,

de manera que l'objectiu ha estat el d'observar al microscopi electrònic un augment en el marcatge quan les cisteïnes han estat reduïdes, localitzant així els ponts disulfur.

El marcatge amb MMNA s'ha fet bé sobre la mostra en bloc (abans de ser inclosa), bé sobre la mostra ja tallada en la reixeta.

*Procediment:*

- Els sediments que contenen espermatozoides es renten amb PBS (pH 7.4, SIGMA).

- Posteriorment s'incuben amb l'agent reductor 2-mercaptoethylamina (MEA) (SIGMA) durant 1h en agitació, a temperatura ambient.

La quantitat de MEA/ml PBS dependrà del tipus de reducció que es vulgui fer. En aquest treball s'han fet les proporcions de 0, 20 i 25 mgMEA/ml PBS.

- Els espermatozoides es sedimenten i es realitza la primera fixació amb gluteraldehid al 0.5%, fent una incubació de 15 min a temperatura ambient.

- Posteriorment es sedimenta la mostra i es renta amb PBS (3-4 cops). A l'últim sediment se li afegeix PBS i glicina fins a una concentració 0.02M. S'incuba 5 min a temperatura ambient.

- Es sedimenta la mostra i es renta amb PBS (igual que abans).

A partir d'aquí el marcatge amb MMNA es pot fer de dues maneres, bé sobre la mostra en suspensió, bé sobre la mostra ja tallada en la reixeta. Els passos que venen a continuació són els mateixos per tots dos casos. A continuació es detalla el cas del marcatge de la mostra en suspensió.

- A l'últim sediment se li afegeix 1ml de PBS i a continuació una alíquota de 6 nmols de MMNA (6 nmols dissolts en 500µl de PBS) preparada en fresc. S'incuba de 45 min a 1h a temperatura ambient.

(En el cas de fer-se la incubació sobre la reixeta, aquesta s'incuba a sobre d'una gota de MMNA (preparat de la mateixa manera)).

- Es sedimenta la mostra i es renta amb PBS (3-4 cops). L'últim sediment es postfixa amb PBS i gluteraldehid 2% en proporció 1:1 (v:v). La fixació es fa durant 15 min a temperatura ambient.

(Els rentats en el cas de la incubació sobre reixeta es fan col.locant la reixeta a sobre de la gota de PBS).

- Es sedimenta la mostra i es renta amb PBS (igual que abans). L'últim sediment es tracta segons el Protocol de la reïna Lowicril (veure més endavant).

Un cop es tenen les reixetes amb les mostres muntades, tant si el marcatge amb MMNA ha estat sobre la mostra en suspensió com sobre la reixeta, es fa la intensificació amb plata. Per la intensificació s'han utilitzat els mètodes que es descriuen a continuació.

- HQ Silver reagent (Nanoprobes Inc, Stony Brook, N.Y, cat # 2012), kit format per un activador, accelerador i inhibidor. La intensificació s'ha fet a diferents temps (de 1 a 9 min) per trobar-ne l'adequat.

- Intensificador Hidroquinona-lactat de plata (Danscher, 1981).

*Inclusió amb Lowicril (en el cas específic de les mostres tractades o per ser tractades amb el MMNA)*

Es fa una deshidratació disminuint la temperatura a mida que la concentració de l'agent deshidratant (etanol) augmenta. Tant durant la deshidratació com en la infiltració, les mostres han d'estar en agitació. La deshidratació va seguir els següents passos:

<u>etanol</u> vol %	<u>temps</u>	<u>t° (°C)</u>
30 %	30'	4
50%	60'	-20
70%	tota la nit	-35
95%	60'	-35
100%	60'	-35
100%	60'	-35

La infiltració amb reïna Lowicril es fa amb proporcions d'etanol i reïna de 1:3, 1:1 i 3:1 (reïna:etanol), durant 1h cada una, a -35°C (en agitació). Posteriorment s'impregna amb reïna pura durant 2h a -35°C, i es fa un darrer canvi amb reïna pura deixant-ho tota la nit també a -35°C.

La reïna Lowicril (Lowicril K4M) està formada per tres components: Crosslinker A, Monòmer B i Initiator C, els quals es barregen en presència de N<sub>2</sub> gas per evitar la interferència de l'oxigen (3.6 gr, 16.4 gr i 0.10 gr respectivament).

La polimerització es realitza en la mateixa càmera a on s'ha fet la infiltració i es dona mitjançant llum ultraviolada. Per la confecció dels blocs s'utilitzen càpsules de gelatina. Un cop plenes les càpsules amb la reïna i amb la mostra, s'esperen de 15 a 30 min i a continuació es connecta la llum ultraviolada durant un mínim de 24h. Passat aquest temps, es posen les mostres a temperatura ambient, continuant la polimerització amb la llum ultraviolada durant 2-3 dies.

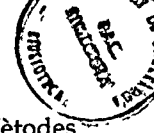
La ultramicrotomia i observació es realitzen de la mateixa manera que pel cas de les reïnes d'Espurr o Araldita (v. II.C.7.a.ii.).

### *c. Detecció de la cromatina nuclear amb tinció amb Hoechst*

Per detectar el grau de descondensació de la cromatina espermàtica quan nuclis d'espermatozoides es posen en contacte amb extractes proteïcs d'oòcits, s'ha utilitzat un reactiu que s'uneix a la cromatina anomenat *Hoechst* (*Hoechst* 33258, [2'-(4-hidroxifenil)-5-(4-metil-1-piperazinil)-2,5'-bi-bencimidazol]), fluorocrom que s'uneix de forma reversible a seqüències de tres o més parells de bases adenina-timidina en la cadena de DNA. L'excitació del fluorocrom, mitjançant la seva exposició a la llum ultraviolada, ens permet visualitzar el nucli, al microscopi òptic de fluorescència, i per tant veure l'estat de condensació de la cromatina.

El *Hoechst* (1 mg/ml) s'ha diluït 10 vegades amb tampó EM (KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM en TrisHCl 10 mM pH 7.4), i d'aquesta dilució (preparada sempre en fresc) s'han agafat les alíqüotes.

S'han fet incubacions de nuclis espermàtics amb extractes d'òvuls sobre el mateix portaobjectes, o bé en l'appendorf. Quan la incubació es fa sobre el portaobjectes, 32,000 nuclis d'espermatozoides (2 µl) s'incuben amb 2 µl de *Hoechst* (100 µg/ml), i posteriorment s'afegeix 6 µl d'extracte d'òvuls. La incubació es barreja bé pipetejant suaument a sobre del portaobjectes, i el procés de descondensació de la cromatina espermàtica (inflament dels nuclis) s'observa al microscopi òptic de



fluorescència. Els controls de les incubacions s'han fet incubant els nuclis espermàtics amb el reactiu i, en contes d'extracte s'ha utilitzat el propi tampó EM.

Quan la incubació s'ha fet en l'eppendorf, 3.2 milions de nuclis espermàtics (200  $\mu$ l) s'han incubat amb 40  $\mu$ l d'extracte, i s'han anat agafant alíqüotes de la incubació a diferents temps: a 3  $\mu$ l de la incubació se li han afegit 6  $\mu$ l de *Hoechst* (100  $\mu$ l/ml), i s'ha barrejat a sobre del portaobjectes pipetejant suaument, i d'aquesta manera s'ha fet l'observació.

### 8. *Microanàlisi de Raigs X*

La microanàlisi de raigs X és una tècnica que permet localitzar la distribució de certs components al llarg de qualsevol estructura.

Les mostres destinades a l'estudi mitjançant la microanàlisi de raigs X es van fixar en una solució de paraformaldehid 2%-gluteraldehid 2.5%, i es van incloure en reina Spurr. Es van fer talls de 0.5  $\mu$ m de gruix, i es van muntar sobre reixetes de titani amb una membrana suport de formvar de 20-30 nm i un recobriment de carboni de 3-5 nm. Els talls no es varen contrastar donat que el material a estudiar, nuclis i fibres denses de les cues d'espermatozoides d'*Eledone cirrhosa*, presenten una electrodensitat que fa que siguin fàcils de reconèixer.

Per la microscòpia electrònica i la microanàlisi de raigs X es va utilitzar un microscopi electrònic HITACHI H-800 HT equipat amb una unitat de rastreig d'imatge H-8010 i un detector d'energia dispersiva KEVEK QUANTUM ultrafilm WINDOW. El microscopi va treballar amb la modalitat STEM, amb un voltatge d'acceleració de 100 kV, una intensitat de corrent de 10-15 nm, un tamany d'*spot* de 6.0 nm i un temps d'acumulació de 100 s.

L'espectre de raigs X es va introduir en un analitzador d'interfase multicanal PDP-11/03 i es va guardar en disquets. Els espectres obtinguts no van ser sotmesos a la sustracció de l'espectre de la reixeta suport.

En aquest treball aquest mètode ens ha donat informació sobre la distribució del sofre i zinc al llarg de l'espermatozoide d'*Eledone cirrhosa*.

### 9. Incubacions d'extractes d'òvuls amb nuclis

Un milió de nuclis d'espermatozoides de *D. labrax* (llobarro) es posen en contacte amb el volum (o concentració) desitjat d'extracte d'òvuls, pipetejant bé perquè els nuclis quedin ben suspesos en l'extracte, i es fa una incubació a temperatura ambient, i a ser possible en agitació, durant el temps desitjat. Per aturar la incubació, es centrifuga a 10,500 g, 1 min, i es separa el sobrenadant; el sediment de nuclis es renta amb tampó EM (KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM en TrisHCl 10 mM pH 7.4), es torna a centrifugar (10,500 g, 1 min), i aquest segon sobrenadant s'ajunta al primer. El següent pas és l'extracció de les proteïnes tant dels nuclis com del sobrenadant.

Per extreure les proteïnes dels nuclis, s'afegeix HCl 0.4N als sediments resultants de la incubació, pipetejant de forma ràpida però suau, i als sobrenadants se'ls hi afegeix HCl portant-ho a una concentració de 0.4N. Es centrifuga a 10,500 g durant 6-7 min, i es recullen els sobrenadants de tots dos (on estaran les proteïnes solubles). El següent pas és precipitar les proteïnes amb TCA 20%. Un cop precipitades i seques, es dilueixen amb tampó de mostres I per un GPAU 6.25M urea/15% acrilamida, i es carreguen en el gel.

### 10. Incubacions amb fosfatasa alcalina

De vegades en gels d'electroforèsi (GPAU) es troben bandes que són molt properes i que *a priori* podrien fer pensar que són formes microheterogènies de la mateixa proteïna, formes precursoras, o fins i tot proteïnes diferents. Pot passar que aquestes bandes corresponguin a la mateixa proteïna en diferents estats de fosforilació, amb diferència entre elles en el nombre de fosfats, així com més fosfats, més càrregues negatives adquireixen (HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), de manera que en un GPAU on les proteïnes migren per càrrega (en direcció cap al pol negatiu) les proteïnes amb més fosfats avançaran menys que les defosforilades.

Una manera de identificar si diferents proteïnes (diferents bandes en un gel d'electroforèsi) són la mateixa proteïna en diferents estats de fosforilació és defosforilar la barreja de les proteïnes i veure si totes elles devenen una sola banda en el gel. Això és el que s'ha fet amb una de les protamines d'una de les espècies de *Gasterosteiformes*. L'enzim que defosforila és la fosfatasa alcalina.



Una quantitat d'1 µg de proteïna es va dissoldre amb 5 µl de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  0.2 mM,  $\text{Cl}_2\text{Zn}$  0.2 mM en  $\text{TrisHCl}$  100 mM pH 8.0, i es va afegir 1 unitat de fosfatasa alcalina (*phosphatase calf-intestinal* 10,000 U/mol, #2905 New England Biolabs.), duent a terme la incubació a 37°C durant 1h. Es va fer un control seguint els mateixos passos però sense afegir l'enzim. La reacció es va aturar afegint tampó de mostres II (v. II.C.1.a.i.), de manera que la mostra incubada (i control) es van carregar en un GPAU 2.5M urea/25% acrilamida.

### 11. Prediccions d'estructures secundàries

Quan s'han tingut les estructures primàries de les protamines de *Murex brandaris*, el que s'ha fet ha estat prediure la possible relació entre elles, així com un alineament de les seves seqüències i anàlisi dels seus *repeats* (tal i com es veurà al capítol III de Resultats). Aquest treball ha estat realitzat sota l'assessorament i col.laboració del Dr. Jaume Palau, a la Universitat Rovira i Virgili de Tarragona, utilitzant el mètode de Lipman i Pearson (1985).

Un altre tipus de treball teòric s'ha aplicat sobre la protamina d'*Eledone cirrhosa*, la seqüència de la qual s'ha introduït en el servidor *PredictProtein* ([www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html](http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html)), donant un predicció de la seva estructura secundària. Aquest treball s'ha fet gràcies a l'ajut de la Montse Solé, del Departament d'Enginyeria Química de l'Escola d'Enginyers Industrials (UPC) de Barcelona.



## ***III. Resultats***



*A. Eledone cirrhosa*



## A. *Eledone cirrhosa*

### 1. Espermiogènesi d'*E.cirrhosa*

L'espermiogènesi d'*E. cirrhosa* ha estat estudiada per Franzén (1967) a través de tècniques de microscòpia òptica, i per Maxwell (1974) tant per tècniques de microscòpia òptica com electrònica.

En aquesta part reexaminem alguns aspectes d'aquesta espermiogènesi. La idea fonamental ha estat la de centrar-nos en els canvis de conformació de la cromatina i en la gènesi de la morfologia nuclear. Tot i així, les observacions efectuades ens han indicat que el procés de l'espermiogènesi d'*E. cirrhosa* és molt més complex del que estava descrit fins aquest moment, i que hi poden haver processos funcionals citoplasmàtics molt relacionats amb la nucleomorfogènesi i coordinats amb l'activitat química de la protamina. Per tant, complementàriament a l'estudi de com evoluciona el nucli i la cromatina, també comentem alguns fets interessants que hem pogut observar al llarg d'aquest estudi morfològic.

Dintre dels estudis de microscòpia òptica, Maxwell descriu les **espermàtides tempranes** com a cèl·lules rodones amb un nucli esfèric de 5  $\mu\text{m}$  de diàmetre, i amb presència de flagell; a mida que transcorre l'espermiogènesi, el nucli augmenta el seu volum (curiosament és el primer cas descrit en que el nucli espermàtic és major que el nucli de l'espermàtida) i adopta una forma en espiral, de 40  $\mu\text{m}$  de llargada i 1-2  $\mu\text{m}$  de diàmetre.

El procés que descriu aquest autor és el següent:

a) Durant l'espermiogènesi es dona una reorganització nuclear, de manera que el nucli de l'espermàtida passa a ser en l'espermatozoide madur espiralitzat, amb 40  $\mu\text{m}$  de llarg i 1  $\mu\text{m}$  d'ample. Aquesta reorganització, segons Maxwell, es podria dividir en dues etapes que acabarien per solapar-se: primer es donaria una elongació nuclear, amb la formació d'un proacrosoma i invaginació centriolar, i segon, l'espiralització del nucli.

b) En l'espermàtida el nucli s'allarga, trobant-se una discreta membrana nuclear i una capa de citoplasma molt prima. La cromatina es comença a condensar en fibres de 10 nm de diàmetre; el diàmetre nuclear és de 4  $\mu\text{m}$  i les fibres de cromatina tendeixen a alinear-se en el seu plà longitudinal.

c) La condensació del nucli continua, formant-se unes fibres molt més grosses que tendeixen a agregar-se en la perifèria del nucli, coincidint amb la iniciació de la espiralització. El diàmetre del nucli es redueix a 2  $\mu\text{m}$ , i continua allargant-se. En aquest estadi apareix una filera de microtúbuls que es disposa molt a prop de la part externa de la membrana nuclear, seguint el camí helicoidal del nucli i el citoplasma que l'envolcalla és ric en vesícules de petit tamany.

d) En els estadis on l'espermàtida és més avançada es veu com la coberta de microtúbuls té la mateixa disposició angular que la vora externa del nucli helicoidal. Maxwell enfoca l'interès dels **microtúbuls** en la **modulació de la forma del nucli**, dient que, el fet de que apareguin en les darreres etapes de l'espermioquènesi i que tinguin una orientació tant propera al nucli, suggereix que els microtúbuls són els responsables de la forma del nucli madur. Això queda recolçat pel fet de que aquests no apareixen en el nucli madur de l'espermatozoide.

e) Maxwell troba una petita estructura paracristalina en els darrers estadis de l'espermioquènesi, i l'atribueix a restes de microtúbuls que comencen a degenerar un cop han acabat la seva funció de modelització i que acabaran per perdre's juntament amb el citoplasma residual.

f) Durant el procés d'espiralització del nucli, aquest es troba envoltat d'una capa de citoplasma que només es perd en el gàmeta madur; el procés d'espiralització comença en l'acrosoma i es desplaça en direcció cap al centriol. Simultàniament es formen petites gotes citoplasmàtiques que més tard seran expulsades, de manera que el nucli quedarà envoltat per una finíssima capa de citoplasma.

En aquest treball també es menciona la formació de l'acrosoma, sense mencionar el material que l'envolta, ni entrar en massa detall. I per últim,



descriu l'estructura de la peça mitja i cua, amb l'estructura centriolar  $9+2$  i la presència d'unes fibres que es troben en número de 9, que envolten l'axonema, i que en els mamífers es coneixen pel nom de ODF's ("outer dense fibers", fibres denses). L'espermatozoide madur resultaria ser una cèl.lula de  $552 \pm 5 \mu\text{m}$ , amb un cap de  $43 \pm 2 \mu\text{m}$  i una peça mitja de  $5 \mu\text{m}$  de llargada; el diàmetre del cap seria d' $1 \mu\text{m}$  i el de la cua de  $0.5 \mu\text{m}$ . I finalment, l'acrosoma també seria espiralitzat.

En el treball efectuat per Maxwell hi ha fases o estadis de l'espermiogènesi que no han estat descrites. Estudiar aquestes fases i comparar-les amb altres cefalòpodes, i en especial amb un altre octòpode, *Octopus vulgaris*, pot ajudar a comprendre la funció de certes estructures cel.lulars, i a la vegada ajudar a entendre les grans diferències aparents entre l'espermatozoide d'*E. cirrhosa* i els altres cefalòpodes, especialment dintre dels octòpodes. D'això s'encarrega aquest primer apartat. L'estructura nuclear queda completada més tard, doncs estudiem qui i com s'empaqueta aquest nucli espermàtic, i també mostrem com la protamina que empaqueta aquest nucli és una proteïna molt diferent a la resta de protamines dels octòpodes (cefalòpodes).

Aquest estudi queda dividit en dues parts, una primera on es fa un estudi general a nivell de microscòpia òptica, i una segona part on s'explica amb més detall el procés sofert per les cèl.lules, i que es basa en les observacions fetes al microscopi electrònic.

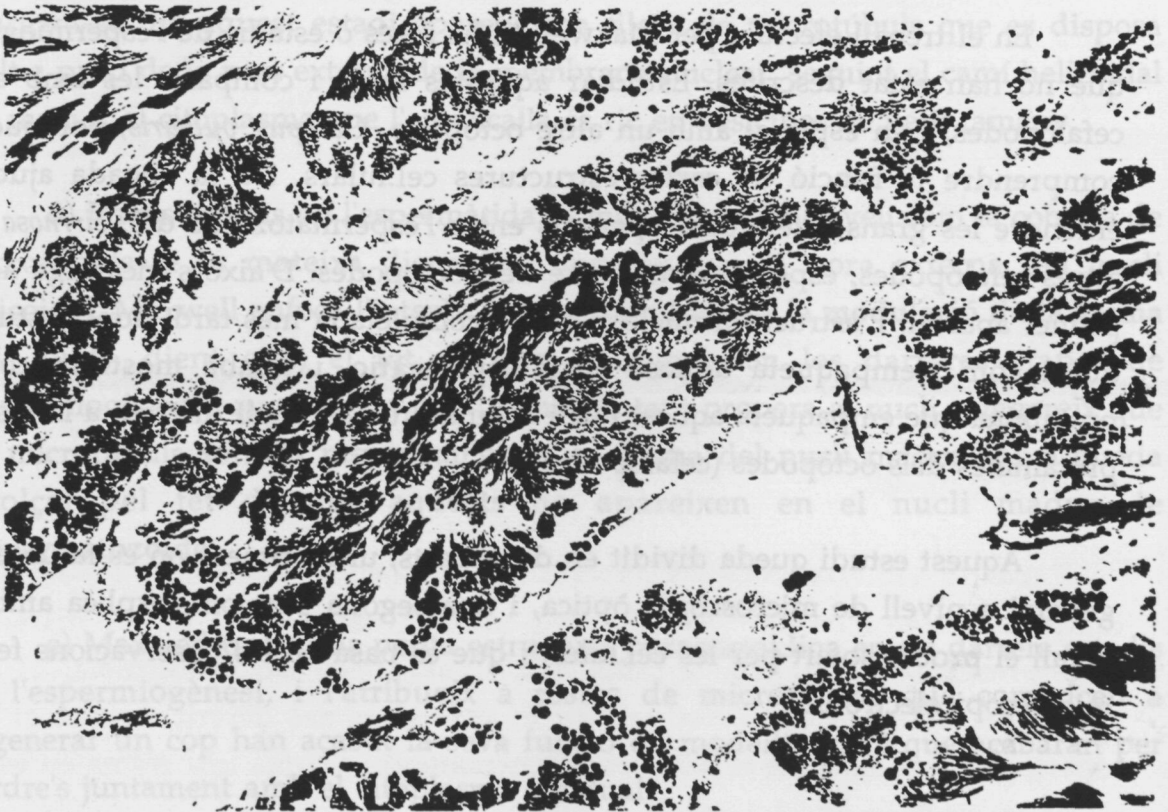
## a. *Estudi a nivell de microscòpia òptica*

### i. *Espermatogènesi*

Tal i com passa en altres cefalòpodes octòpodes, la gònada està formada per un conjunt de tubs seminífers, els quals es troben adherits els uns als altres i donen un aspecte general molt compacte. En la gònada madura, els túbuls (delimitats per cèl.lules epitelials, vasos, i altres estructures que no tractem aquí) es troben plens, i pràcticament es poden observar tots els estadis de l'espermatogènesi, malgrat que hi predominen les etapes més avançades de la

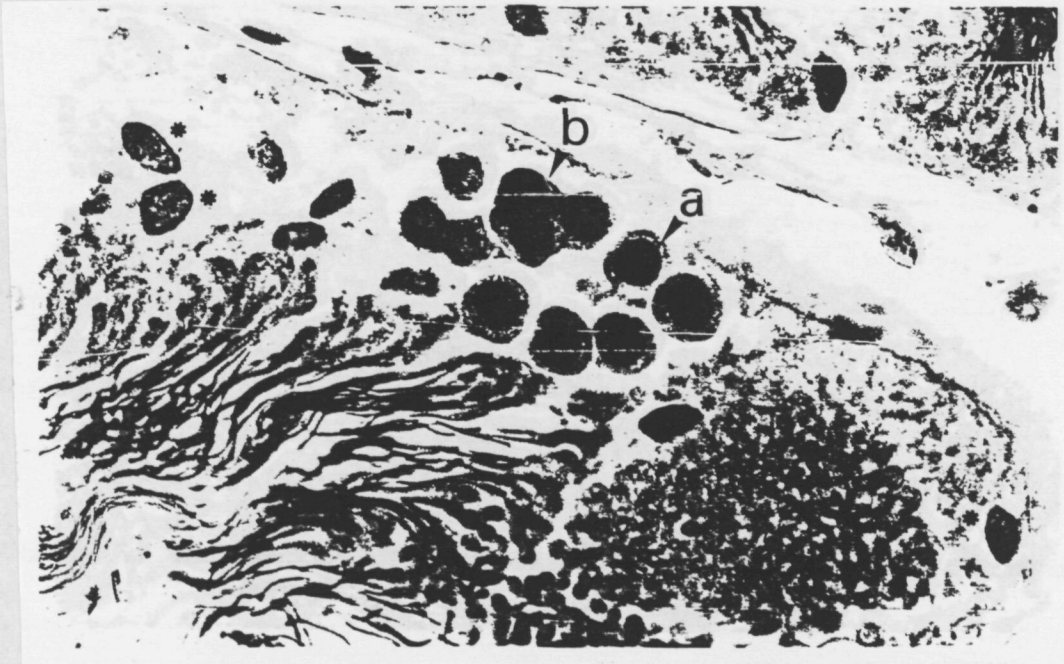
diferenciació. En la Fig.III.A.1 s'aprecia com la diferenciació (espermatogènesi) s'efectua en grups, trobant-se en general grupets de cèl.lules en el mateix estadi de diferenciació.

**Fig.III.A.1.** Talls transversals de tubs seminífers (gònada) on s'aprecien grups de cèl.lules en el mateix estadi de diferenciació. A l'interior d'ells detaca la presència de flagells pertanyents als espermatozoides madurs (tinció més intensa). 200x



En els estadis primerencs trobem les **espermatogònies (I i II)**, que són les cèl.lules de major tamany, i els **espermatòcits de 1<sup>er</sup> i 2<sup>on</sup> ordre**. Els nuclis de tots ells és arrodonit i es tenyeixen bastant intensament, i el citoplasma també és rodó. En alguns d'ells els nuclis apareixen amb una textura granular, deguda a que aquestes cèl.lules sofreixen mitosi i meiosi. Aquestes fases es troben adhosades a la base del tub seminífer. En la Fig.III.A.2 es veuen dos espermatòcits que encara no s'han separat, després d'haver experimentat mitosi.

Fig.III.A.2. Primers estadis de l'espermatogènesi: espermatogònies (a) i espermatòcits de primer i segon ordre (b). Al voltant de les cèl.lules espermàtiques destaca la presència de cèl.lules acompanyants (\*). 700x



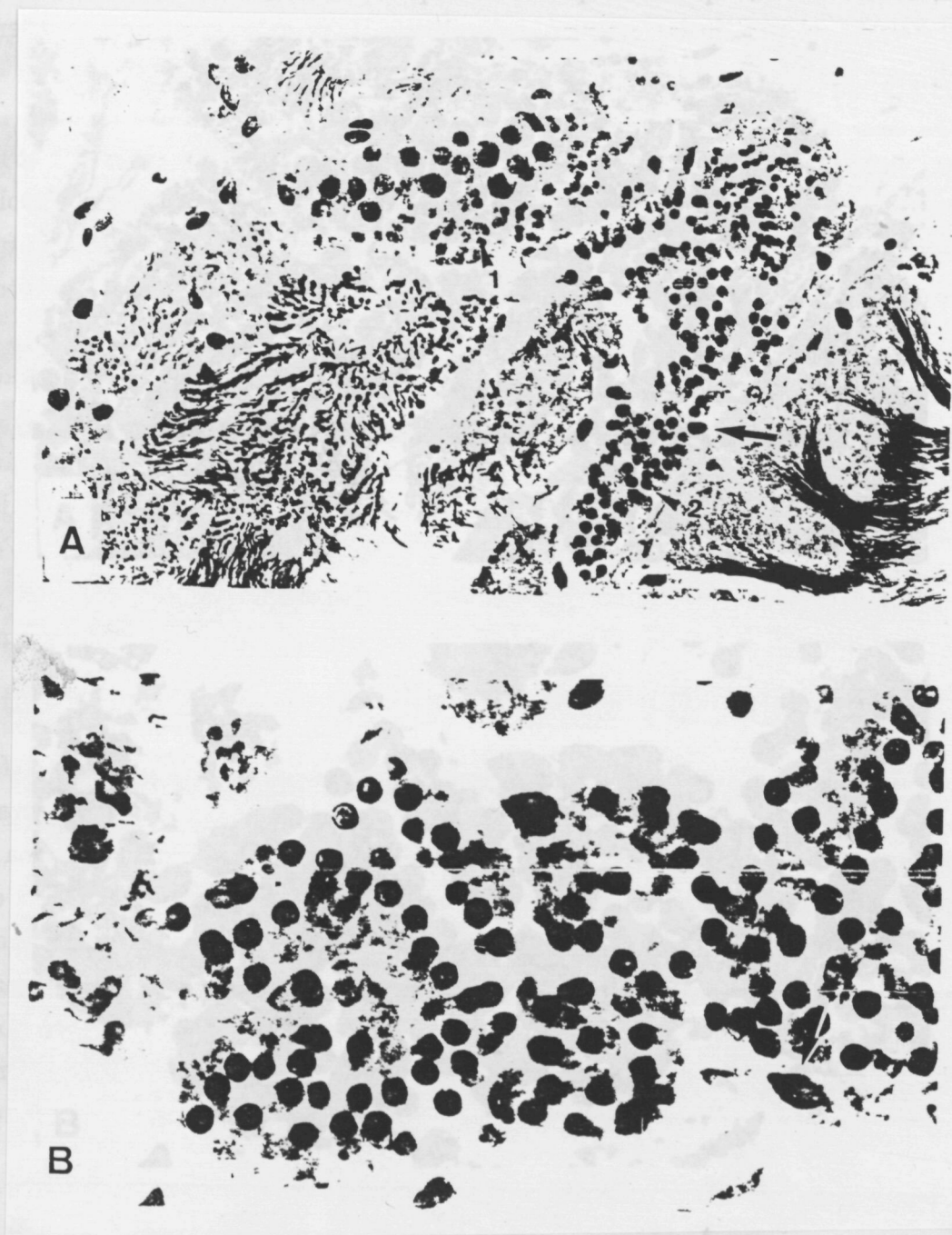
També, i en general (però no sempre), pròximes a la base del tub seminífer acostumem a trobar unes cèl.lules que tenen els nuclis menys condensats amb una forma ovalada, i un citoplasma que és gairebé impossible d'observar al microscopi òptic convencional (Fig.III.A.2, asterisc). Aquestes cèl.lules (com es veurà més endavant) es troben sempre associades al citoplasma de les espermatides, i correspondrien al que es coneix com a cèl.lules de Sertoli dels invertebrats (Arnold, 1978; Dohmen, 1983); nosaltres les anomenarem **cèl.lules acompanyants**. La funció d'aquestes cèl.lules seria la de donar suport a les cèl.lules que envolten, i a més a més, estaria relacionada amb el tractament, reciclatge o eliminació del citoplasma tan complex que presenten les espermatides avançades (com també es veurà més endavant).

## ii. *Espermiogènesi*

El desenvolupament de les primeres etapes sembla ser bastant comú a tots els cefalòpodes, i per tant a tots els octòpodes (Franzén, 1967).

Les **espermàtides tempranes** podrien classificar-se en dos tipus, segons com queda tenyit el nucli: un Estadi I, on les espermàtides presenten un nucli poc tenyit, i un Estadi II, amb un nucli rodó i fortament tenyit, dens a la perifèria i parcialment condensat a l'interior. A la Fig.III.A.3A es poden veure el que podrien ser els primers estadis de les espermàtides haploides (Estadi I): abaix de la figura, en el centre, es poden observar uns nuclis d'espermàtides poc condensats, mentre que en la mateixa figura a l'esquerra, s'observaria el següent pas de l'espermiogènesi (Estadi II), unes espermàtides amb un **nucli arrodonit** i una tinció nuclear molt més forta. A la Fig.III.A.3B es veuen més ampliades les espermàtides pertanyents a l'Estadi II: com s'acaba de dir, presenten un nucli rodó amb una condensació perifèrica, i en l'interior una condensació més o menys irregular, i un citoplasma ple de grànuls que, com es veurà en l'estudi al microscopi electrònic, és complex. Destaca el fet de que grups d'aquestes espermàtides apareixen associades a cèl.lules acompanyants.

Fig.III.A.3. Primers estadis de l'espermiogènesi. A- Estadi I, espermatides haploides molt tempranes amb un nucli poc condensat (1), i Estadi II, on les espermatides presenten un nucli arrodonit i més condensat/tenyit (2). B- Ampliació de les espermatides de l'Estadi II on s'aprecia la condensació perifèrica del nucli. En totes dues figures destaca la presència de cèl.lules acompanyants (fletxa). A- 150x; B- 550x



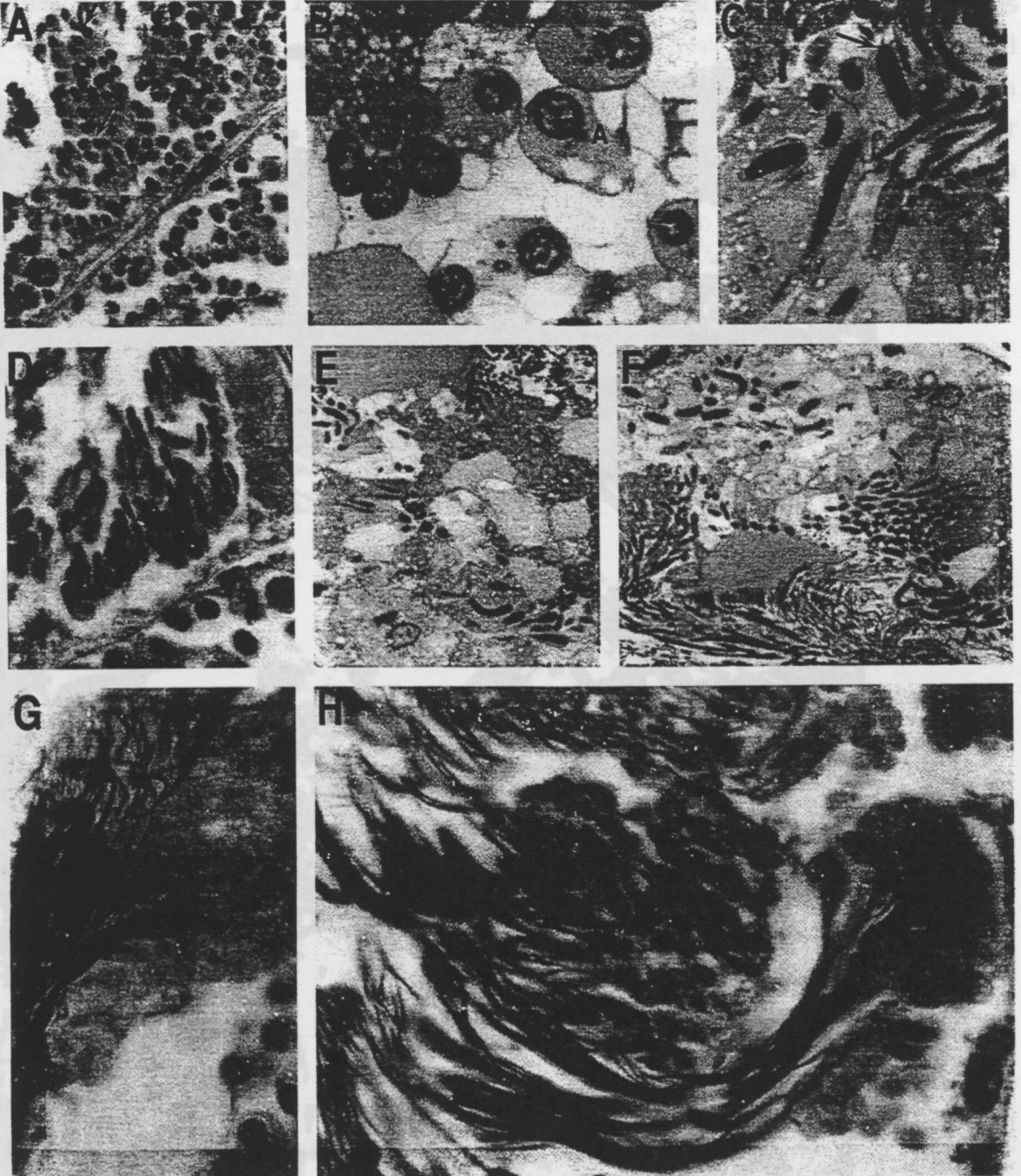
Les espermàtides tempranes tipus II (Estadi II) patiran una **invaginació nuclear** a partir de la qual es generarà la cua del futur espermatozoide, estadi que anomenarem III: a la Fig.III.A.4A es pot observar com el nucli de l'espermàtida ja no és tan rodó, sinó que **comença a ovalar-se**, i en la base apareix una mena de petit filament, que possiblement és on s'acumularà un material dens i es generarà la cua; curiosament, aquestes espermàtides presenten la cromatina interna menys densa que en el cas de les espermàtides tipus II, però es continua mantenint la condensació perifèrica.

És en el pas d'espermàtida tipus II al tipus III on es comença a formar l'**acrosoma**. En la Fig.III.A.4B, es pot apreciar la presència d'un grànul molt dens depositat a sobre del nucli rodó d'una espermàtida. La formació i evolució de l'acrosoma es veurà amb més detall en l'estudi realitzat al microscopi electrònic.

Posteriorment el nucli comença a **elongar-se**, Fig.III.A.4C-D, (Estadi IV), adoptant una forma de cilindre, i al mateix temps que s'allarga comença a sofrir una **torsió** (Fig.III.A.4E-F). El nucli, cilíndric, continua allargant-se i s'arriba a torçar diverses vegades, (Fig.III.A.4G); en aquests estadis les espermàtides van desplaçant el seu citoplasma cap a l'extrem apical (l'oposat a l'extrem on s'origina la cua), citoplasma que, com veurem més endavant, presenta una composició molt complexa. Al final d'aquest procés el nucli es troba uniformement condensat, (Estadi V, Fig.III.A.4H).

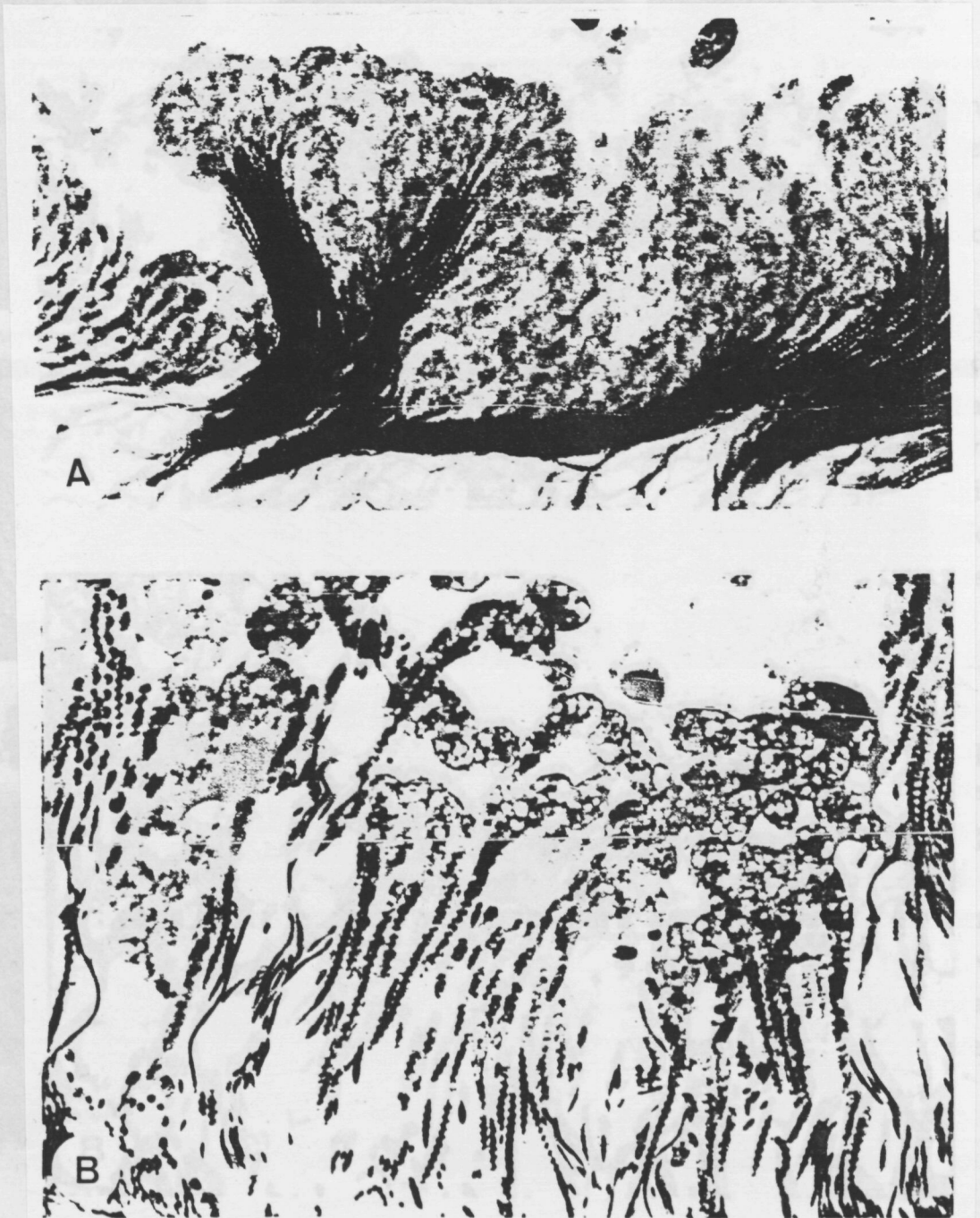
Fins que el nucli no s'ha acabat d'allargar (o almenys en les últimes fases de l'allargament), no es dona el següent pas: l'**espiralització nuclear**, estadi que anomenarem VI, Fig.III.A.5A, on el nucli deixa de ser un cilindre i passa a tenir una forma espiralada, però encara torçada; en aquest estadi, el citoplasma està ple d'uns cossos i inclusions, i apareixen associades cèl.lules acompanyants. A mesura que es produeix el procés d'espiralització, el nucli va adoptant una forma de vareta recta i rígida, progressivament menys torçada, tal i com es pot observar a la Fig.III.A.5B, i el **citoplasma**, acumulat en una "gota" apical, comença a **desprendre's** fins a la seva pèrdua total, on l'espermatozoide adquireix, finalment, la seva independència.

**Fig.III.A.4. Espermàtides en l'Estadi III:** A- Espermàtides amb el nucli ovalat i la invaginació nuclear formada (fletxa); B- Espermàtides amb acrosoma (A). **Espermàtides en l'Estadi IV:** C-D- Elongació del nucli espermàtic; en C es veu en detall la invaginació nuclear i l'inici de la cua (fletxa); E-F-G- Torsió del nucli espermàtic. **Espermàtides en l'Estadi V:** H- Nucli espermàtic torçat completament condensat i amb el citoplasma desplaçat. A- 150x; B- 900x; C- 400x; D- 400x; E- 100x; F- 100x; G - 100x; H- 100x



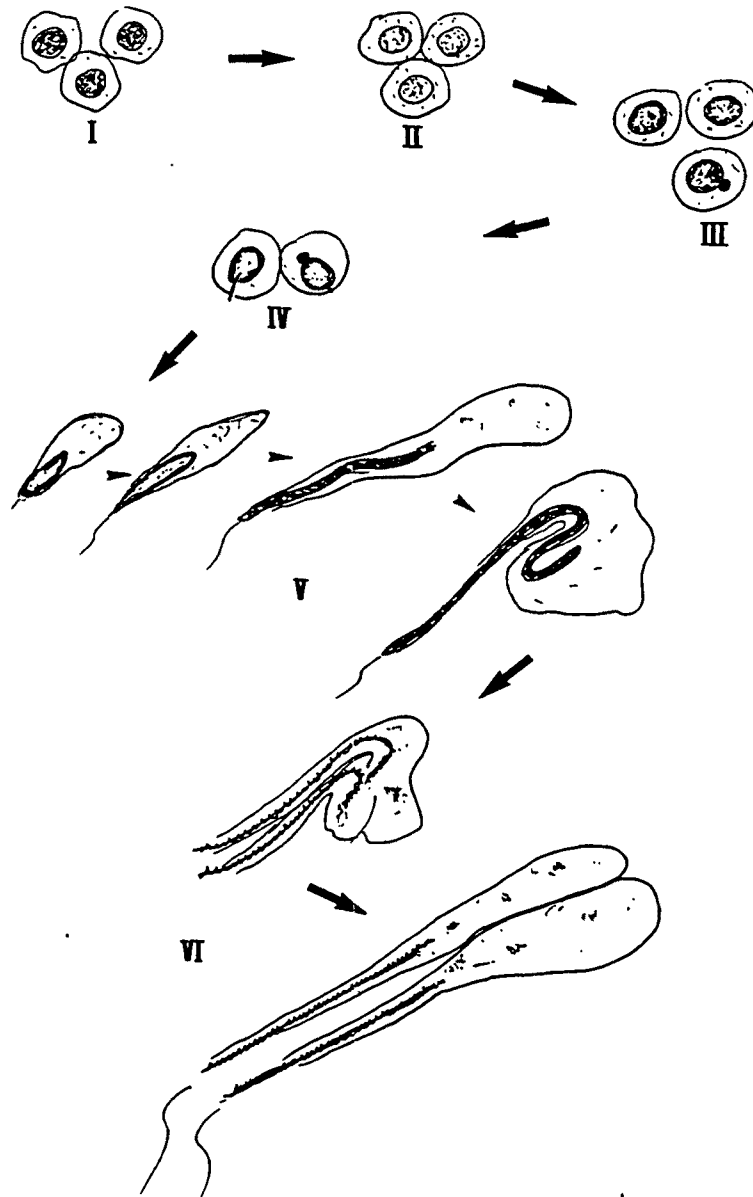
Tot el procediment explicat queda resumit en l'esquema present en la Fig.III.A.6.

Fig.III.A.5. Espermàtides en l'Estadi V. A-Inici de l'espiralització nuclear quan el nucli encara està torçat. B- Nucli espiralitzat i en forma de vareta rígida, perdent el citoplasma residual, i per tant donant lloc a l'espermatozoide madur. A- 1000x; B- 1500x





Curiosament, en els nuclis de les cèl.lules espermàtiques temperanes es diferencien dos tipus de **condensació de la cromatina**. Per una banda, la present en les espermatides tipus I (amb un nucli poc electrodens, i per tant poc condensat), i per altra banda, la que presenten les espermatides tipus II (on es dóna una condensació de la cromatina a nivell de la perifèria, i l'interior del nucli roman poc condensat). A partir de les espermatides tipus II, la condensació perifèrica es manté, però l'interior del nucli sembla que es descondensi (cas que es troba en les espermatides tipus III-IV), del que es dedueix que quan comença el procés d'elongació es dóna una reordenació de la cromatina. Una vegada l'elongació es troba en un estadi una mica avançat, el nucli es torna a condensar (espermatides tipus V), i finalment s'espiralitza, arribant a la màxima condensació.

Fig.III.A.6. Espermiogènesi d'*E. cirrhosa* estudiada a partir de la microscòpia òptica.

## b. Estudi a nivell de microscòpia electrònica

### i. Espermiogènesi

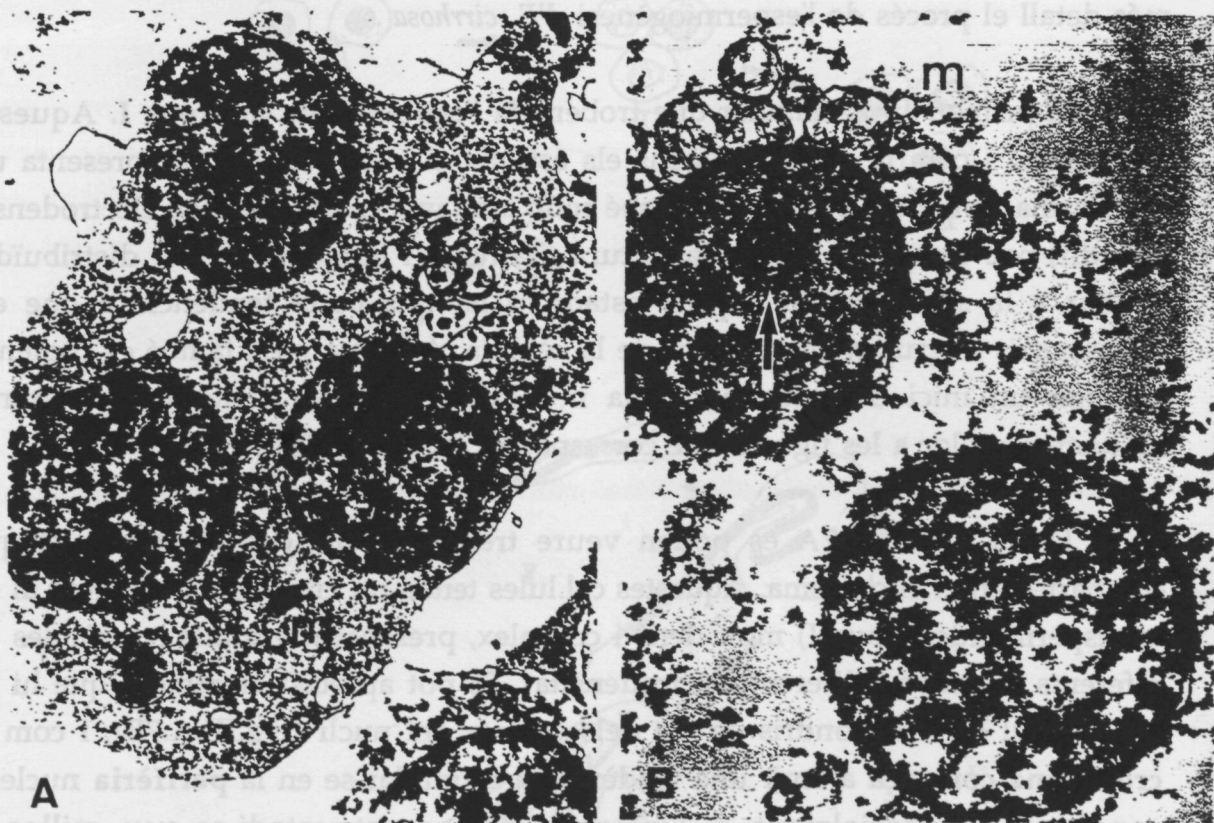
Els estudis al microscopi electrònic ens han permès poder estudiar amb més detall el procés de l'espermiogènesi d'*E. cirrhosa*.

El primer tipus cel·lular que trobem és l'espermàtida de tipus I. Aquesta cèl·lula, tal i com ja s'ha dit segons els estudis al microscopi òptic, presenta un citoplasma arrodonit, i un nucli també rodó amb una cromatina poc electrodensa, és a dir, poc compacta, amb una textura granular i homogèniament distribuïda, similar a la somàtica. En aquest estadi hi ha una certa tendència a que els mitocondris s'agrupin en una part de la cèl·lula. A més a més, també es comença a donar un inici de formació de la invaginació nuclear. Tots aquests punts s'il·lustren millor a les figures que corresponen a l'Estadi II.

En la Fig.III.A.7A es poden veure tres espermàtides de tipus II que comparteixen el citoplasma. Aquestes cèl·lules tenen un citoplasma (diferent al de les espermàtides tipus I) molt dens i complex, presentant grànuls i vesícules de diferents tamanys i diferent electrodensitat. Es pot apreciar clarament que hi ha un acúmulo de mitocondris en un dels costats del nucli (Fig.III.A.7B), i com la cromatina comença a tenir una tendència a acumular-se en la perifèria nuclear, condensat-se parcialment a l'interior. En aquest estadi es veu millor la invaginació nuclear (Fig.III.A.7B, fletxa), que en fases més avançades, es farà una mica més profunda i s'omplirà d'un material moderadament electrodens (no descrit per Maxwell, 1974), l'aparició del qual està descrit en d'altres cefalòpodes.

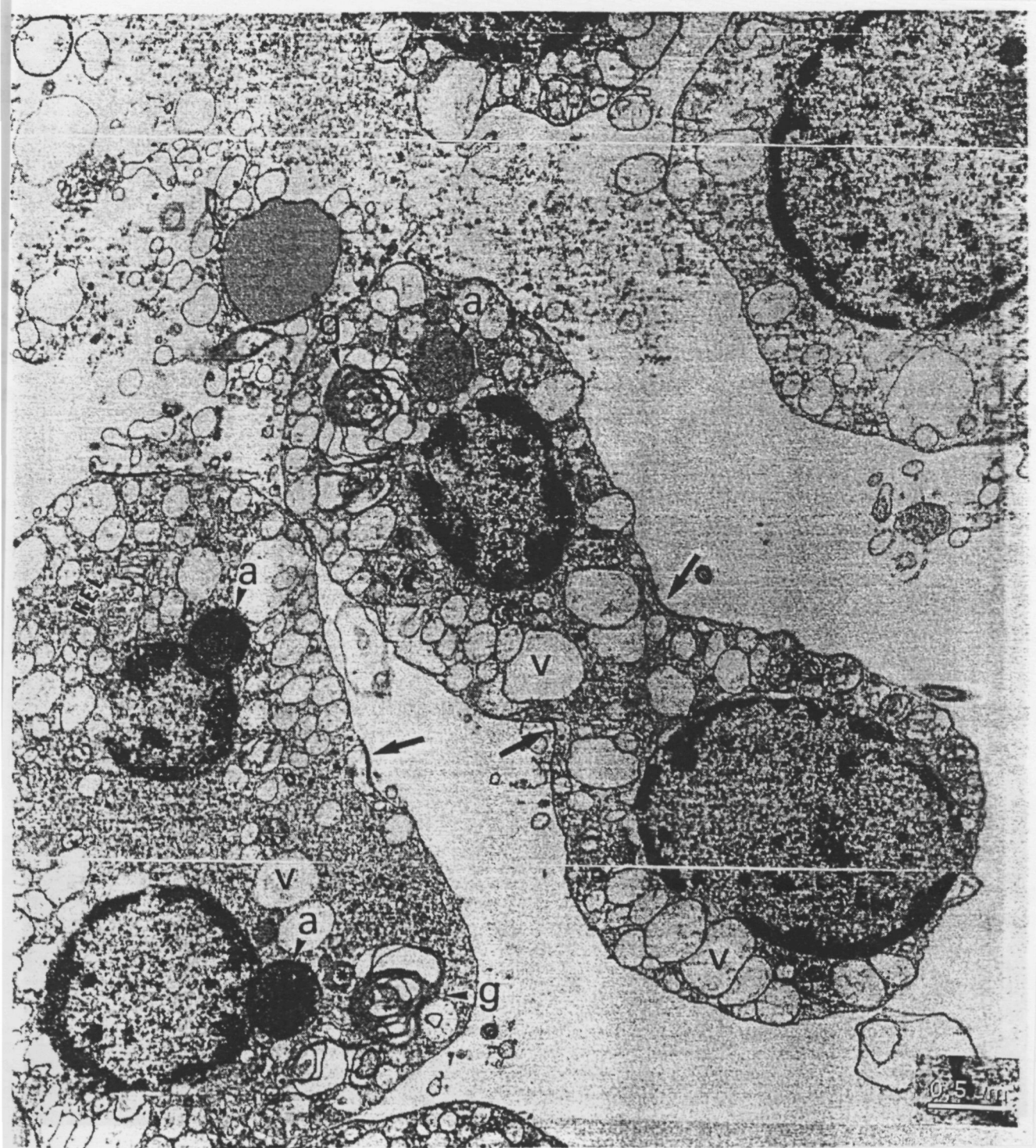
És interessant observar que la cromatina tendeix a presentar una condensació que clarament comença per la perifèria. La imatge presentada en la Fig.III.A.7B mostra que la condensació perifèrica més definida i contínua es troba associada a la proximitat de mitocondris. La formació temprana d'una capa contínua perifèrica de cromatina condensada, associada a la presència de mitocondris, és un detall que ha estat observat en el nostre laboratori en altres espècies no relacionades i podria voler dir que la formació d'aquesta superfície és un procés que requereix ATP.

**Fig.III.A.7. Espermàtides tipus II.** A-Tres espermàtides compartint el citoplasma, on destaca l'acúmulo de mitocondris (m) en un costat del nucli. B- Detall de la condensació perifèrica associada a la proximitat de mitocondris i acúmulo polar dels mateixos (m); presència de la invaginació nuclear (fletxa) de l'espermàtida tipus II que progressa cap a tipus III. A- 11,500x; B-16,000x



En la Fig.III.A.8 es veuen 5 espermàtides que abandonarien l'estadi II per entrar en l'estadi III. El nucli presenta una **condensació** de la cromatina a nivell **perifèric**, i a l'interior té un aspecte granular amb alguns punts de condensació. En aquest estadi, es pot observar com alguns dels nuclis passen de ser rodons a tenir una forma ovalada (estadi molt inicial de l'elongació).

Fig.III.A.8. Espermatides tipus III. Condensació perifèrica de la cromatina nuclear i formació de l'acrosoma (a); presència en el citoplasma de nombroses vesícules no electrodenses (v), alguna semielectrodensa (\*), complexes de Golgi molt actius (g), reticle endoplasmàtic llis (REL), entre d'altres. El citoplasma compartit presenta ponts citoplasmàtics (fletxes).



El **citoplasma** (que en l'estadi II començava a tenir vesícules) s'omple de **vesícules i/o vacuols poc electrodensos** i, a més a més, presenta una textura granular (semielectrodensa), possiblement degut a la presència de ribosomes. El que destaca d'aquest citoplasma (com d'altres que veurem en estadis més avançats) és que posseeix uns complexos de **Golgi molt actius**, així com un reticle endoplasmàtic llis molt evident i desenvolupat (Fig.III.A.8); el complex de Golgi dóna lloc a una sèrie de grànuls específics, alguns dels quals donaran lloc al futur acrosoma, i d'altres es quedaran en les immediacions del mateix. Els mitocondris continuen trobant-se agrupats en una regió del nucli.

Un altre aspecte interessant que es pot observar a la Fig.III.A.8 (fletxa) és la presència de **punts citoplasmàtics**, delimitats per un engrossament de la membrana, presents en l'estrangulament que hi ha en el citoplasma compartit per les espermatides, degut a que el nucli s'ha dividit però la divisió del citoplasma ha estat incompleta, el que fa que existeixi una sincronicitat en el procés de maduració de les espermatides; aquests punts estan presents fins a fases molt avançades.

La **formació de l'acrosoma** a partir del complex de Golgi també es pot veure a la Fig.III.A.8. El **complex de Golgi**, que es troba molt proper al reticle endoplasmàtic llis, fabrica per una banda, una gran quantitat de vesícules amb un contingut molt poc electrodens, les quals omplen la major part del citoplasma de l'espermàtida; per una altra banda, fabrica els lisosomes primaris, una sèrie de vesícules que presenten al mateix temps unes microvesícules en el seu interior (que contenen enzims hidrolítics), i que es troben presents al llarg de tota l'espermioquèsi.

Un tercer tipus de vesícules que el complex de Golgi genera són unes vesícules amb un contingut semi-electrodens (Fig.III.A.8, asterisc) que es disposen en les immediacions de l'acrosoma (sense arribar mai a fusionar-se amb ell); aquestes vesícules podrien ser l'origen d'unes estructures periacrosomals que veurem més endavant. I per últim, el complex de Golgi genera una vesícula que donarà lloc a l'acrosoma; en la Fig.III.A.8 (al centre) es veu la formació d'un acrosoma, amb forma de bola encara no unida al nucli, format per un material granular homogeni; a la mateixa figura 8 (abaix, a l'esquerra), es veu com

l'acrosoma s'ha assentat a sobre del nucli, mantenint-se tots dos orgànuls separats.

Podriem resumir en dos apartats els canvis que es donen en el pas d'espermàtides tipus I al tipus III: citoplasma i nucli.

*Citoplasma* : el citoplasma de les espermàtides tipus I és molt simple, amb textura granular i poc electrodens; els mitocondris tendeixen a agrupar-se, i es pot apreciar la presència de reticle endoplasmàtic rugós, però no en quantitats importants. En les espermàtides tipus II, el citoplasma és més electrodens, els mitocondris apareixen en grup i polaritzats, i comença una complicació del nombre i tipus de formacions en el citosol (Fig.III.A.8), formacions que concretaran en l'espermàtida tipus III.

L'espermàtida tipus III és la més interessant, ja que iniciarà els processos de diferenciació més aparents. Els més destacables són, en primer lloc, el fet de que presenta un reticle endoplasmàtic llis molt desenvolupat, i lligat a aquest aspecte, té uns complexos de Golgi molt actius, els quals donen lloc a tres tipus de vesícules: unes vesícules no electrodenses, unes semielectrodenses, i una més densa que és la que donarà lloc al futur acrosoma. Destaca el gran nombre de vesícules no electrodenses que omplen gairebé tot el citoplasma cel.lular, i l'agrupació dels mitocondris de forma polaritzada. L'acrosoma es forma a partir del complex de Golgi i, diferent al que ocorre en la majoria d'espècies, es deposita a sobre del nucli allà on s'ha format, sense migrar al pol oposat; a més a més, comença una diferenciació interna en l'acrosoma.