

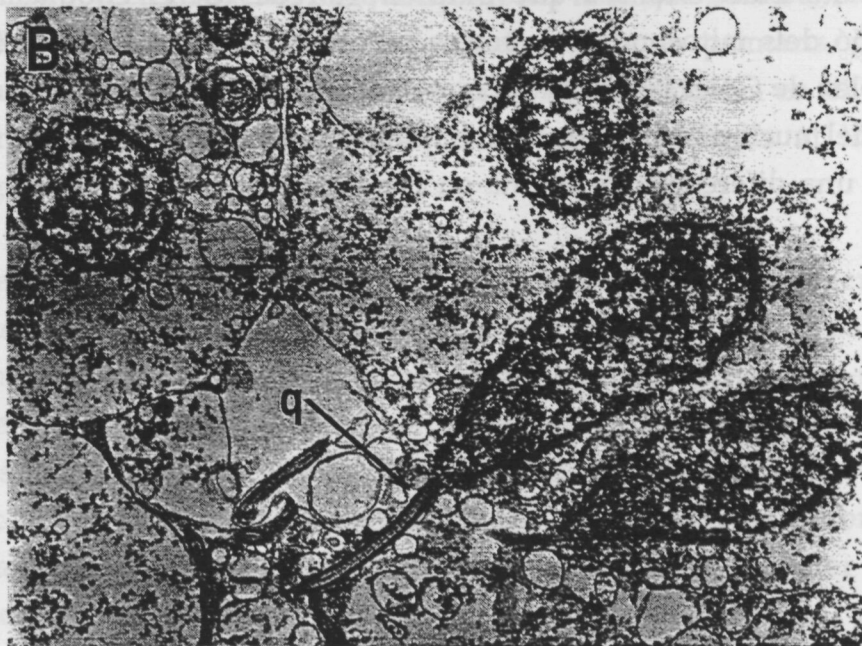
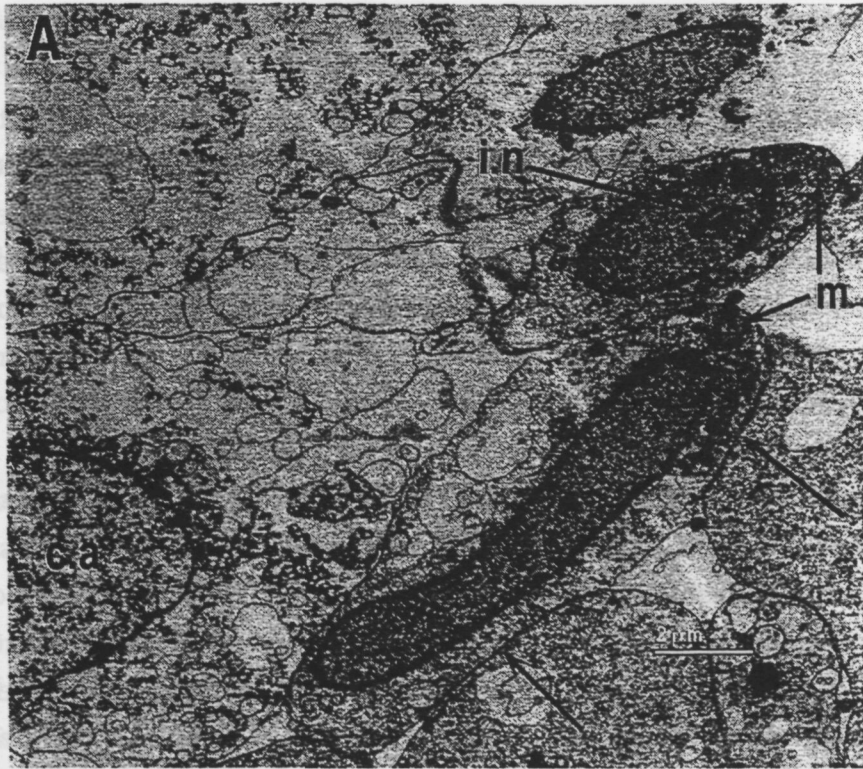
TESI DOCTORAL

Pepita Giménez Bonafé

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

Novembre, 1999

Fig.III.A.9. Espermàtides tipus IVa-b. Procés d'elongació. A- Espermàtides tipus IVa; mitocondris (m), contactes cèl.lula-cèl.lula (fletxa), cèl.lula acompanyant (c.a), invaginació nuclear (i.n). B- Espermàtida tipus IVb on la cromatina s'ha reorganitzat passant de tenir estructura granular (IVa) a formar fibres molt fines; cua (q). B- 9300x



Nucli : els nuclis de les espermàtides tipus I són rodons, i presenten una cromatina poc condensada, d'aparença somàtica.; en aquest estadi es comença a formar una petita invaginació nuclear. En l'estadi III la cromatina es condensa en la perifèria del nucli, i a l'interior també es condensa però d'una forma irregular (això es veu molt bé en l'estudi fet al microscopi òptic, Fig.III.A.4B); la cromatina té una textura granular, i la invaginació nuclear prospera bastant. Els nuclis de l'estadi III presenten una condensació perifèrica molt predominant i, tot i que en el seu interior hi ha alguns "nòduls" de condensació, continua tenint textura granular. Tot aquest canvis que es donen en la condensació de la cromatina són difícils d'explicar; de tota manera, es poden considerar "menors" amb respecte els canvis que es donaran en estadis més avançats de l'espermioogènesi. Les espermàtides tipus III representaran el punt de partida per l'elongació nuclear i de fet l'elongació de tota l'espermàtida.

L'estadi que segueix a l'espermàtica tipus III és la **espermàtia tipus IV**, descrita en les observacions en el microscopi òptic com la fase que sofreix una **elongació**. El procés d'elongació comprèn tota l'elongació de l'espermàtida fins abans de l'esprialització; estudiat al microscopi electrònic resulta ser un procés molt complex en el qual es diferencien diverses etapes. Anomenarem IVa, b, c, etc a les diferents fases per les quals atravesa l'espermàtida en el seu procés d'elongació.

En la Fig.III.A.9A podem veure la primera fase d'espermàtida en **elongació**, el que anomenarem **espermàtida tipus IVa**. Es pot veure que aquesta és la primera fase de l'elongació al basar-nos en la estructura de la cromatina: es pot apreciar que la cromatina presenta una clara condensació externa, mentre que en el seu interior la condensació és granular, i de fet l'aspecte global és bastant similar al "patró" de condensació que presenten les espermàtides tipus III.

En aquest estadi no sembla que hi hagi hagut cap reestructuració de la cromatina, i no hi ha presència de microtúbuls envoltant al nucli, del que es dedueix que el procés d'elongació del nucli s'efectua sense reorganització de la cromatina i sense el concurs dels microtúbuls.

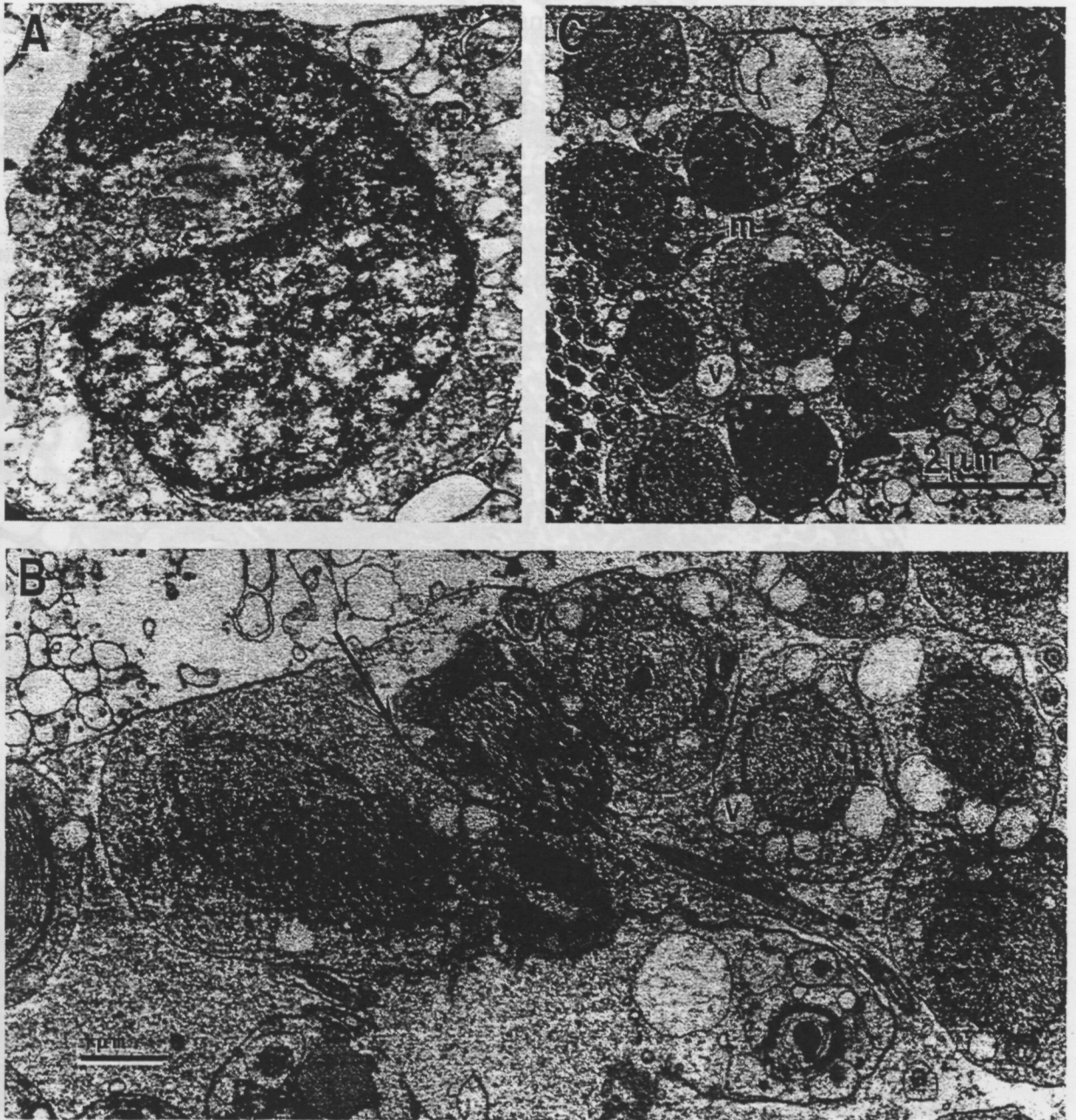
En la mateixa Fig.III.A.9A es pot veure que els mitocondris es troben clarament agrupats i polaritzats en un cantó del nucli. Entre les membranes citoplasmàtiques de diferents espermatides es poden observar diferents contactes cèl.lula-cèl.lula, i el mateix es dona entre la membrana de les espermatides i la membrana de les cèl.lules acompanyants. Aquestes espermatides, al igual que les de l'estadi anterior, ja tenen flagell (no observable en aquest tall però sí en d'altres), amb l'origen en la invaginació nuclear que s'ha agrandit en aquestes fases.

El següent pas de l'elongació consisteix en un inici de la **reorganització de la cromatina, estadi IVb**: la condensació perifèrica es manté, però a l'interior nuclear la cromatina granular comença a formar **fibres**, Fig.III.A.9B, fibres que són bastant fines i estan semiorganitzades en una mena de xarxa. A partir d'aquest punt la cromatina s'anirà organitzant progressivament en fibres. En aquest estadi continuem no trobant microtúbuls al voltant del nucli. Els canvis a nivell de citoplasma no es poden descriure bé a partir d'aquesta figura, doncs no ha quedat ben preservat; tot i així, es pot veure com els mitocondris romanen agrupats en la base del nucli, i hi ha la presència de vesícules poc electrodenses.

A mida que l'elongació avança i els grànuls de cromatina s'organitzen en fibres, **el nucli es retorça**, de una a diverses vegades, (estat també descrit per Franzén, 1967), retorçament possiblement relacionat amb la mateixa condensació de la cromatina, Fig.III.A.10A. En aquest procés seguim sense trobar la presència de microtúbuls.

En l'estadi que anomenem **IVc** la cromatina està tota ella organitzada en **fibres fines**, Fig.III.A.10B; el citoplasma que envolta al nucli es troba relativament reduït, i es va omplint de vesícules no electrodenses; en aquesta fase, els mitocondris, fins ara només agrupats, es comencen a organitzar en la base nuclear, Fig.III.A.10C. A la Fig.III.A.10B també es poden observar els contactes cèl.lula-cèl.lula establerts entre les espermatides, el que faria que el procés de maduració presenti una sincronicitat.

Fig.III.A.10. Espermatides tipus IVc. Procés d'elongació. A-B-C- Espermatides amb la cromatina organitzada en fibres fines; a mida que l'espermàtida avança de A-C les fibres es van associant formant fibres cada vegada majors; vesícules no electrodenses (v), mitocondris agrupats en la base del nucli (m), contactes cel.lulars (fletxa). En A s'aprecia com el nucli que s'està allargant, s'està torçant al mateix temps. A- 21,000x



Les fibres de cromatina es van associant entre si formant **fibres cada vegada majors**, estadi que anomenarem **IVd**; com es pot apreciar a la Fig.III.A.11, aquestes fibres estan espiralitzades i retorçades, i amb elles, els nuclis. Els nuclis estan torçats diverses vegades (donen voltes varios cops), i el citoplasma es troba molt vacuolitzat. En aquest estadi és quan veiem per primer cop l'**aparició dels microtúbuls** que envolten al nucli. A la Fig.III.A.12 es veu molt clar que hi ha dos jocs de microtúbuls: un d'ells en podriem dir circumferencials o circulars, mentre que l'altre joc envoltaria obliquament al nucli. La disposició d'aquest parell de jocs és difícil d'apreciar a la figura perquè el nucli està torçat irregularment, però si fós recte la disposició seria com indica l'esquema present en la mateixa figura, el que podria ajudar a comprendre la forma final del nucli en l'espermatozoide.

Fig.III.A.11. Espermàtides tipus IVd. Procés d'elongació. Les fibres de DNA es fusionen entre elles donant **fibres majors**, que al mateix temps s'espiralitzen i retorcen. En aquest estadi apareixen els **microtúbuls (mb)** envoltant al nucli. 19,000x

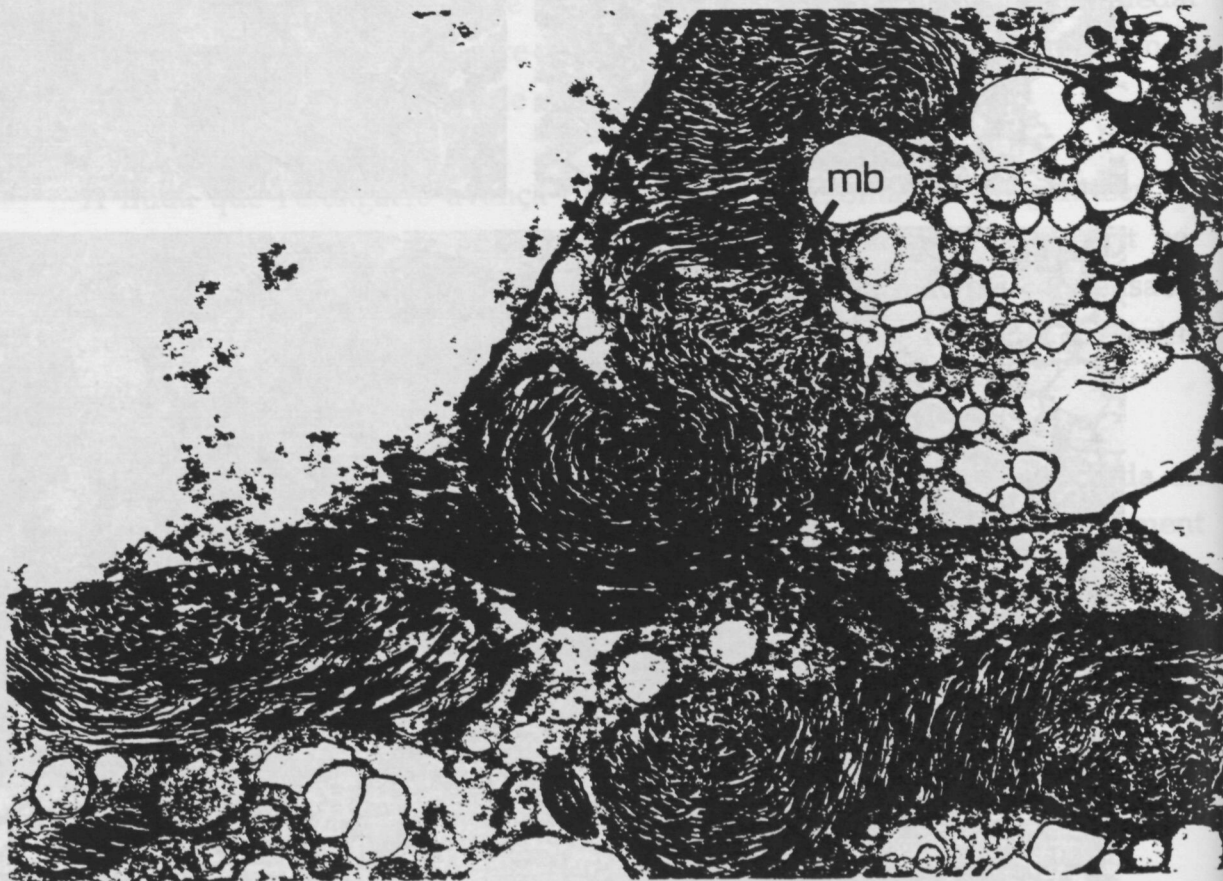
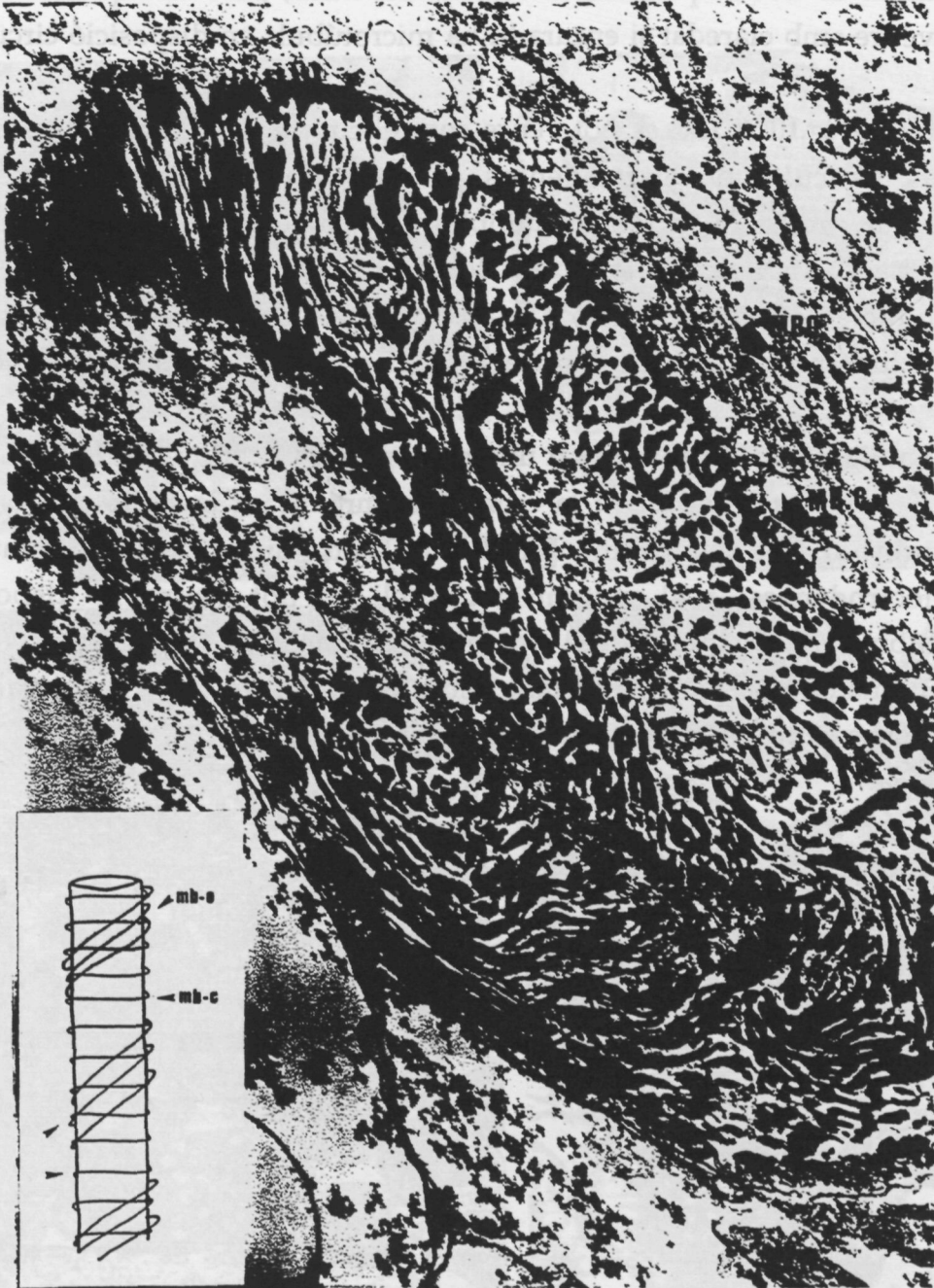


Fig.III.A.12. Espermàtida tipus IVd. Procés d'elongació. Les fibres de DNA, cada cop més gruixudes, es retorcen i espiralitzen, al mateix temps que apareixen dos jocs de microtúbuls, un de circular (MB-C) i l'altre d'obliqu (MB-O) que envolten al nucli. L'insert en la figura mostra la disposició teòrica dels mateixos. 43,000x

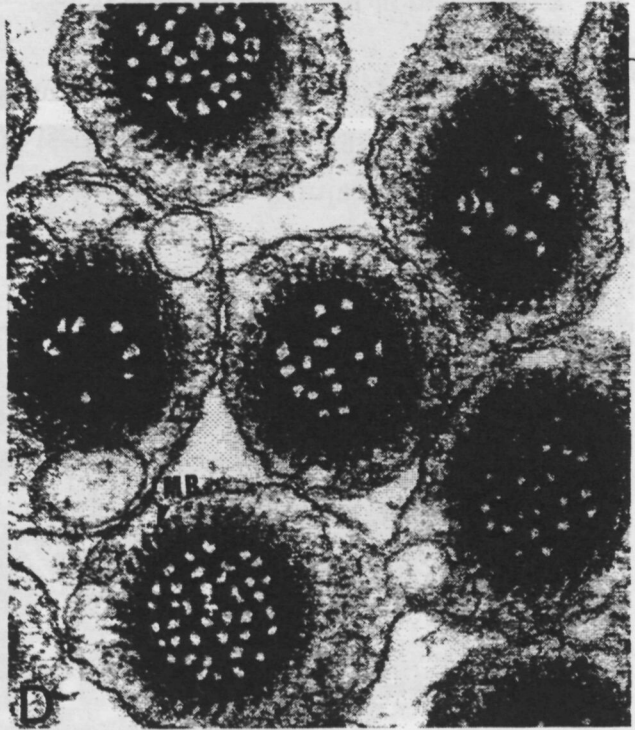
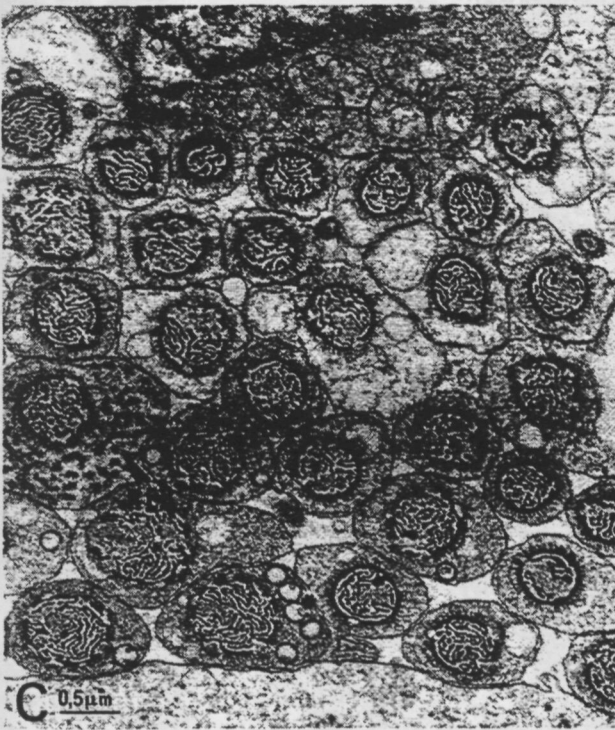
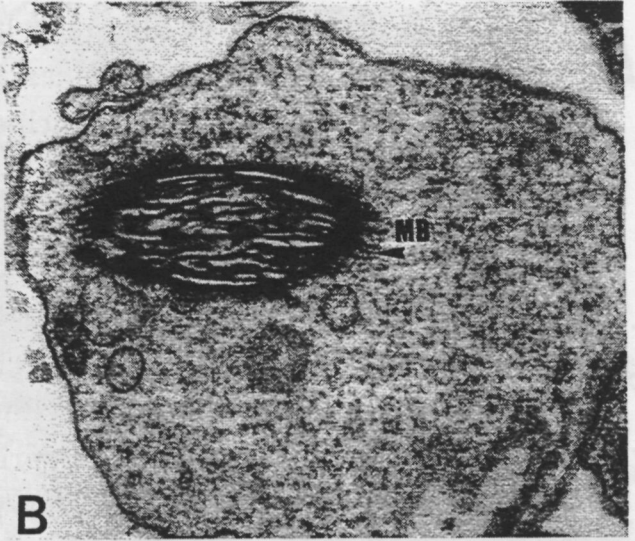


Les **espermàtides IVe** presenten un volum nuclear reduït (tot i que es reduirà molt més en estadis posteriors), i en talls obliquis tals com els de la Fig.III.A.13A la cromatina sembla estar estructurada en fibres, però en talls transversals, com els de la mateixa figura III.A.13B, es veu que aquestes fibres es van interconnectant, i es podria parlar d'una estructuració en **lamel·les**. Els microtúbuls es troben presents al voltant del nucli, però en aquestes imatges no es pot veure amb claredat si encara hi ha microtúbuls en disposició circular.

En la Fig.III.A.13C es pot veure com el citoplasma d'aquestes espermàtides presenta vesícules no electrodenses, i a l'esquerra de la mencionada figura s'observa la presència de reticle endoplasmàtic rugós; trobem també una sèrie de vesícules amb aparença de tenir una doble membrana (asterisc), que possiblement són producte de la degeneració d'una part de la població de mitocondris present en la cèl.lula (procés que se sol donar a mida que avança l'espermioquèsi).

La Fig.III.A.13D és un estat una mica més avançat que el de la Fig.III.A.13C. El nucli continua compactant la cromatina mitjançant la **fusió de les lamel·les**, disminuint així el seu volum. En el citoplasma hi continuen havent vesícules poc electrodenses, i al voltant del nucli es pot veure la disposició dels microtúbuls, en la qual no es pot distingir molt bé la presència (o no) dels microtúbuls circulars. És important veure que les seccions transversals del nucli són rodones; el **nucli** és aproximadament un **cilindre**.

Fig.III.A.13. Espermatides tipus IVe. Procés d'elongació. Estructuració en lamel·les de la cromatina (A,B), que es van fusionant entre elles donant lloc a unes làmines (C), que també es fusionaran i d'aquesta manera la cromatina s'anirà compactant (D). En C destaca la presència de reticle endoplasmàtic rugós (RER) i vesícules possiblement de doble membrana (*); MB- microtúbuls. A- 21,500x; B- 21,500x; D- 50,000x

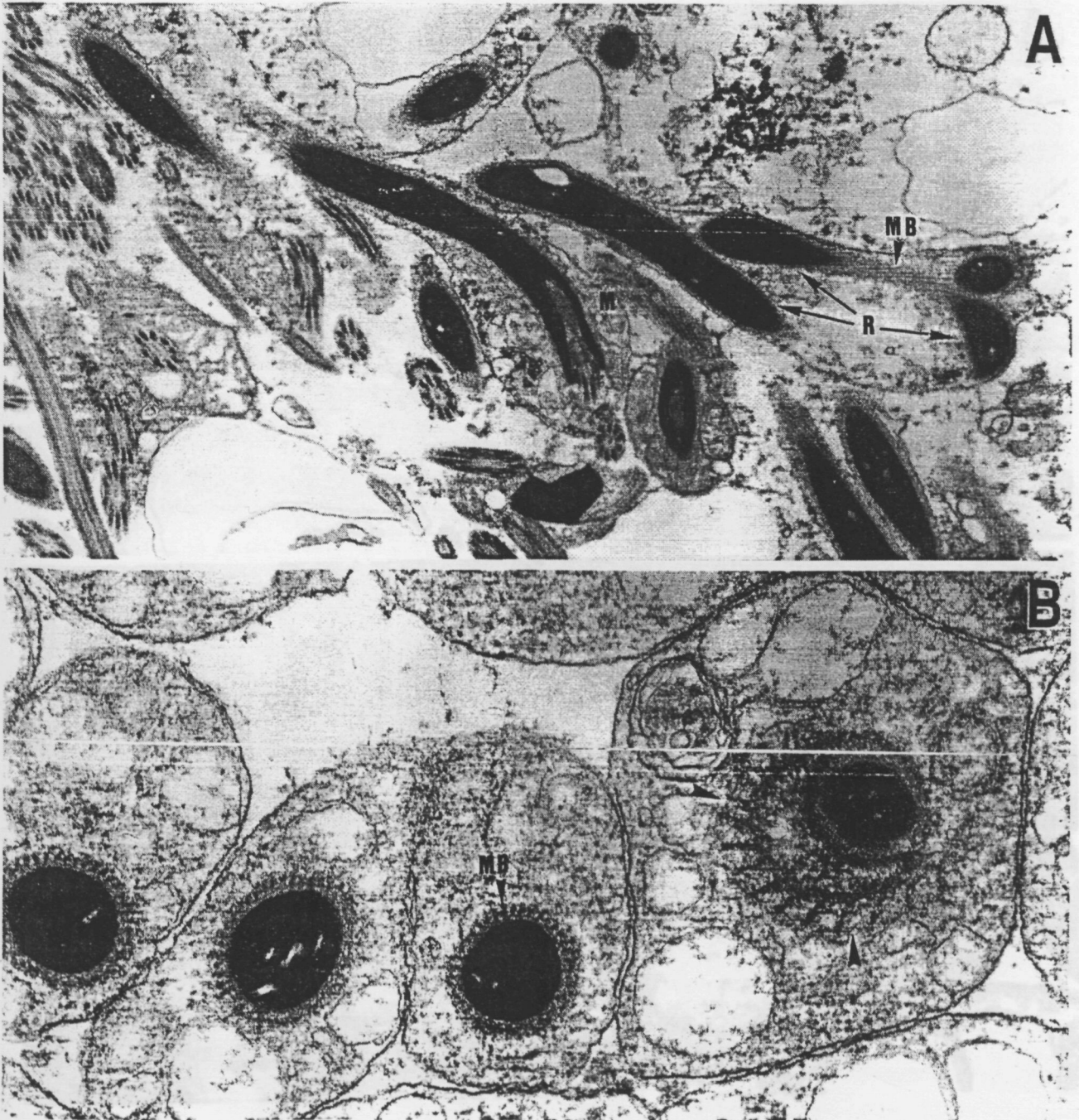


Així doncs, les fases de l'espermàtida IVa-e comprenen tot el procés d'elongació nuclear (i cel.lular, però aquí ens fixem només en el nucli) fins que el nucli es converteix en un cilindre doblegat irregularment diverses vegades. Cal remarcar que el nucli es condensa sense espiralitzar-se. Si fem un petit **resum** d'aquest procés a nivell de nucli podem dir que la condensació nuclear comença en la perifèria i l'interior es manté a l'inici amb estructura homogènia granular. Comença a donar-se el procés d'elongació sense el concurs de microtúbuls, i a mida que el nucli es va allargant, la cromatina es va organitzant en fibres molt fines que formen una mena de xarxa poc regular (estadi IVb); en aquest estadi es pot apreciar clarament com el nucli es va retorçant.

Posteriorment, la xarxa de fibres es va organitzant clarament en fibres una mica majors que presenten una tendència no molt clara a seguir més o menys la direcció de l'eix nuclear (que per cert, està tort) (estadi IVc). En les espermàtides de tipus IVd les fibres continuen associant-se en fibres majors, les quals semblen que es retorcen en l'interior nuclear. En aquest estadi, on els nuclis també estan molt retorçats, és on apareixen per primer cop (o almenys es poden apreciar) els microtúbuls; sembla que hi ha dos jocs de microtúbuls, uns en disposició circular respecte el nucli, i els altres helicoidal (obliquus).

Les espermàtides IVe comprendrien diferents passos de la condensació: les fibres es van reunint progressivament en lamel·les (amples), i posteriorment aquestes s'ajunten, i com a conseqüència el nucli disminueix la seva secció transversal.

Fig.III.A.14. Espermàtida tipus V, caracteritzada per presentar un nucli gairebé condensat, retorçat (R), amb una secció cilíndrica, i microtúbuls (MB) disposats al voltant d'ell. A- Detall de la base nuclear, amb un citoplasma eixamplat ple de mitocondris (M) i de reticle endoplasmàtic llis i rugós, vesícules, i material dens. **B-** Cromatina gairebé condensada, i detall d'unes formacions que envolten el nucli (fletxes); MB- microtúbuls. A- 15,000x; B- 37,500x



La Fig.III.A.14A mostra detalls interessants. En ella es veu quin és el primer objectiu de la condensació nuclear: un nucli gairebé homogeni en quan a condensació, retorçat, amb una secció cilíndrica, i amb microtúbuls disposats al voltant d'ell (es veuen els obliquos); un nucli que és un cilindre, i tot i que continua condensant la seva cromatina, no perd mai la secció circular. Aquest estadi és l'anomenat V. Aquesta figura també mostra com el citoplasma està expandit en la base del nucli (on hi ha un acúmulo de mitocondris, reticle endoplasmàtic llis i rugós i vesícules, entre d'altres), on es troba la invaginació nuclear i a partir de la qual sortirà la cua: és en aquest punt on es generen les fibres denses (ODF's, de *outer dense fibers*, com ocorre en els mamífers) (Fawcett, 1975) que envolten l'axonema de la cua (format per l'estructura típica de 9+2, tal i com Maxwell va descriure en el seu moment) (Maxwell, 1974), i on hi ha un acúmulo d'un material dens que potser provingui de la desaparició del centriol proximal, tal i com també es dona en els mamífers.

En aquest punt, la cromatina està condensada fins que ha format una estructura uniformement electrodensa, Fig.III.A.14B. En aquesta figura també apareixen unes formacions al voltant del nucli (fletxes) que possiblement poden estar relacionades amb l'organització dels microtúbuls que envolten el nucli (veure més endavant).

El pas següent és l'**espiralització del nucli** i l'adquisició simultània de forma de vareta recta espiralitzada (Fig.III.A.15): l'espermàtida tipus V presentava un nucli com un cilindre retorçat, envoltat per microtúbuls; a partir d'aquest moment, suposadament els microtúbuls entrarien en contracció i provocarien, per una banda, l'espiralització homogènia del nucli, i per altra banda la disposició recta del nucli, adquirint una forma de vareta (vareta que adquireix una elevada rigidesa, com es veurà en els següents apartats, degut a l'establiment de ponts disulfur establerts entre les proteïnes nuclears que compacten el nucli). A aquesta fase de nucli en forma de vareta i espiralitzat l'anomenarem **espermàtida tipus VIa**.

Fig.III.A.15. Espermàtida tipus VIa. Espiralització nuclear. Nucli espiralitzat en forma de vareta rígida amb citoplasma residual (gota citoplasmàtica) a l'apex.

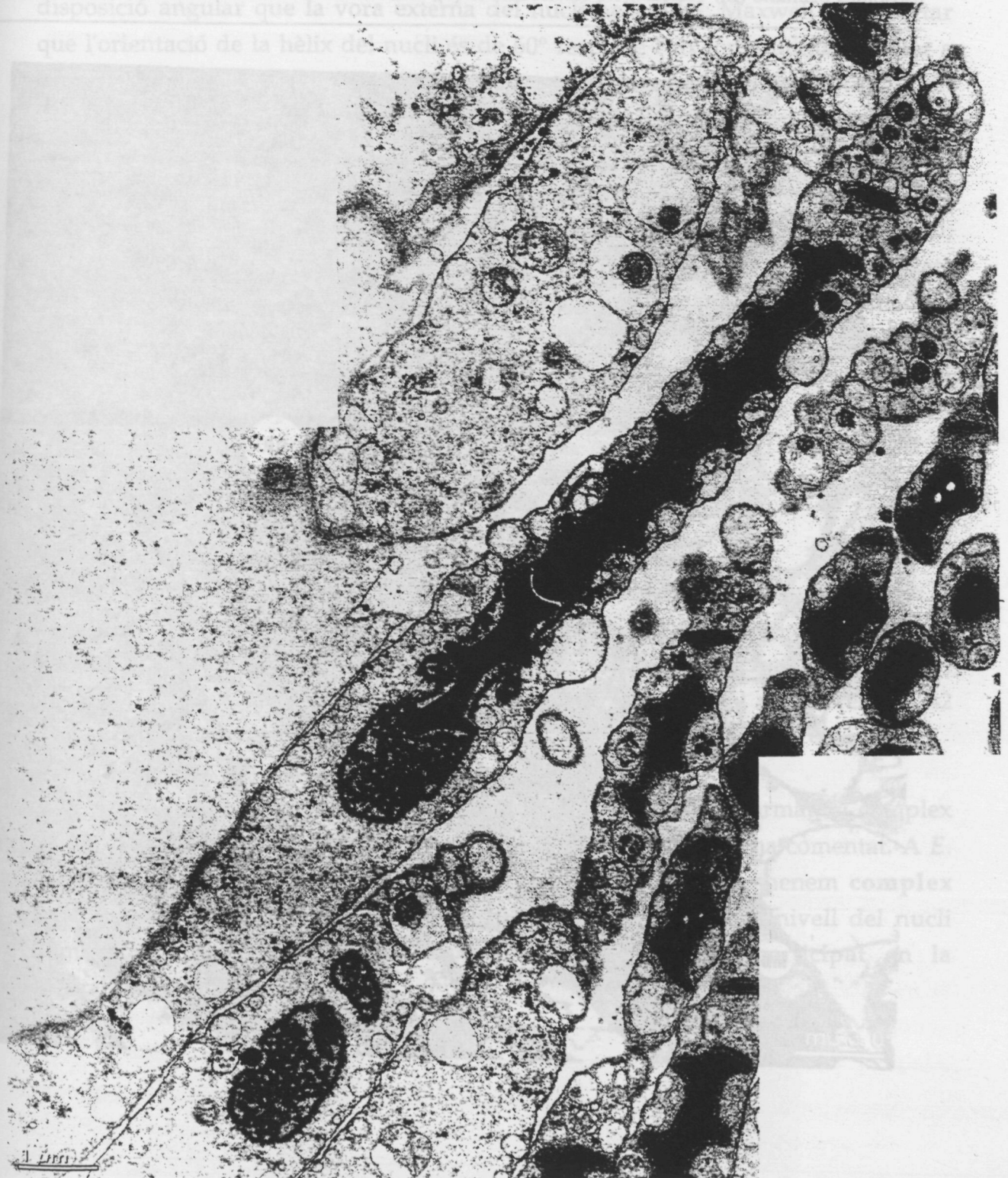
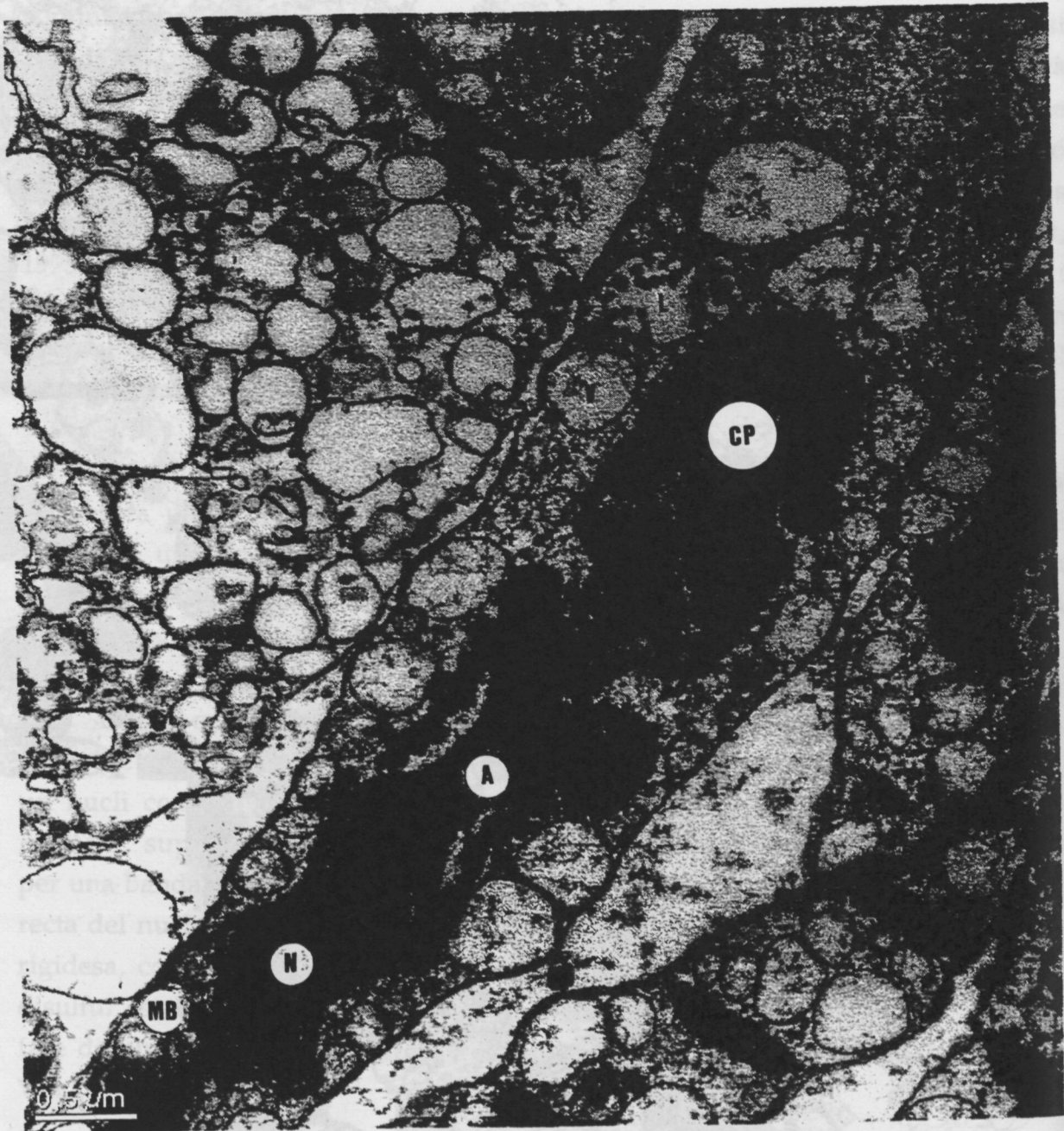


Fig.III.A.16. Detall de la zona apical del nucli de l'espermàtida tipus VIa (espiralitzada). A sobre del nucli (N) es disposa l'acrosoma (A), i al voltant d'ell es situa el complex periacrosomal (CP) que acaba en els microtúbuls (MB), complex que presenta una massa externa i una interna; presència de lisosomes primaris (L), vesícules no electrodenses (v), entre d'altres.

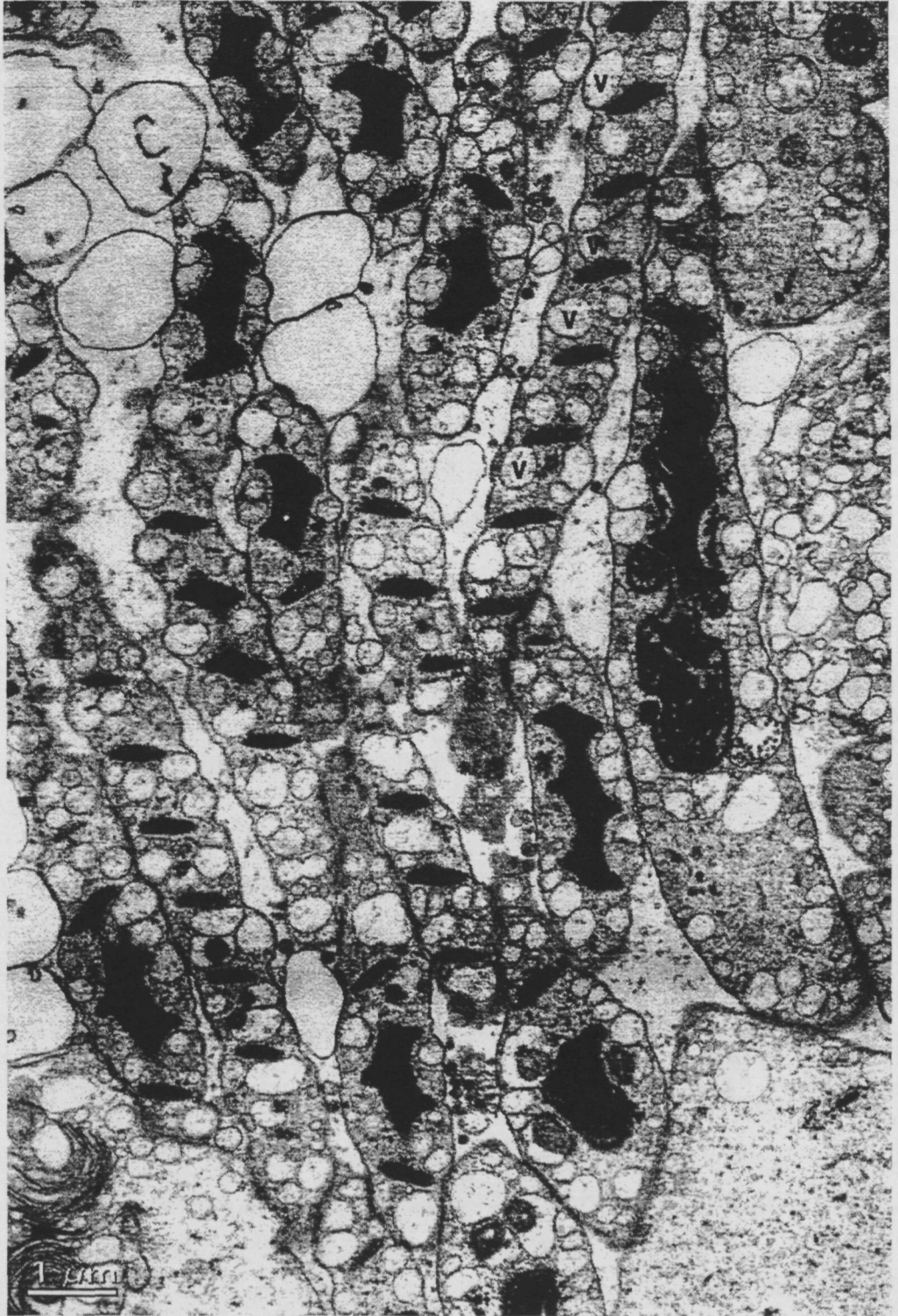


Els treballs anteriors (Franzén, 1967 i Maxwell, 1974) expliquen com l'espiralització comença des de l'extrem de l'acrosoma i es propaga en direcció cap a la peça mitja. Es pot observar com la coberta de microtúbuls té la mateixa disposició angular que la vora externa del nucli helicoidal; Maxwell va reportar que l'orientació de la hèlix del nucli és de 60° respecte l'eix longitudinal, similar a l'orientació microtubular; la peça mitja no queda envoltada per microtúbuls. El fet de que els microtúbuls apareguin en les darreres etapes de l'espermioogènesi i que tinguin una orientació tan propera al nucli suggereix que els microtúbuls són els responsables de la forma del nucli madur. Tenint en compte les descripcions esmentades de Franzén i Maxwell, i les observacions fetes en aquest treball, proposem aquí la hipòtesi (ja comentada) que els microtúbuls ja organitzats podrien entrar en una forta contracció i produir simultàniament la rectificació de la forma nuclear, és a dir, la disposició en forma de vareta helicoidal tan regular que presentaran els nuclis espermàtics. (És de notar que a partir d'aquest punt, en les preparacions bioquímiques alhora de purificar nuclis, aquests es comporten com a varetes helicoidals molt rígides, però que en aquest estadi la cromatina és plàstica ja que s'amotlla segons la contracció dels microtúbuls, passant d'un cilindre a una hèlix).

Els microtúbuls en les espermàtides VIa acaben en el mateix punt que el nucli, en la regió centriolar, i no s'extenen cap a la peça mitja o cap a la regió on maduren els mitocondris, regions que no estan externament espiralitzades (v. Maxwell, 1974). Com a resultat del procés d'espiralització, el nucli presenta 42 voltes en sentit horari.

En *Octopus vulgaris* se sap que un cop l'acrosoma s'ha format, el complex de Golgi acaba formant una estructura paracristalina, com ja s'ha comentat. A *E. cirrhosa* trobem la presència d'una estructura especial que anomenem **complex periacrosomal**, que reseguix les vores de l'acrosoma i que a nivell del nucli sembla que es transformi en els microtúbuls que han participat en la espiralització (Fig.III.A.16).

Fig.III.A.17. Inici del procés catabòlic experimentat en les espermàtides tipus VIa. Destaca la presència de múltiples vesícules poc electrodenses (v) disposades entre els solcs de les hèlix del nucli.



Tal i com hem comentat, Franzén (1967) i Maxwell (1974) descriuen que l'esprialització comença per la part adjacent de l'acrosoma; una hipòtesi interessant és que l'organització dels microtúbuls tingui la base en la part anterior de l'acrosoma, on hi ha el complex periacrosomal; aquest complex presenta un material dens estructurat, amb una masa externa i una d'interna (Fig.III.A.16), i gairebé sempre que s'observa al microscopi electrònic es troba associat a un "grànul", que no és res més que la punta de l'acrosoma; la capa externa de material dens segueix l'esprial fins a l'acrosoma, i després es converteix en una capa relativament poc estructurada que envolta l'acrosoma en sí, no trobant microtúbuls al voltant d'ell. La capa de material dens arriba al nucli i al cap d'una volta d'hélix desapareix, per donar lloc als microtúbuls; on hi ha microtúbuls no hi ha la capa de material dens. Un suggeriment interessant a comprovar és si aquesta formació periacrosomal formada per un material dens, actuaria com un centre del qual es derivarien i s'organitzarien els microtúbuls responsables de part del procés d'esprialització.

En aquesta fase de l'espermàtida, s'observa la presència d'una "gota o prolongació citoplasmàtica" (Fig.III.A.15 i altres), que també conté estructures semblants al complex periacrosomal, vesícules, mitocondris en regressió, lisosomes primaris, i complexos de Golgi, entre d'altres, citoplasma disposat en la part anterior del nucli, el qual posteriorment es tornarà més complex, i serà important en les següents fases.

En el cas d'*Octopus*, l'espermioogènesi és relativament simple: un cop el nucli s'ha elongat, no sofreix procés d'esprialització i es dona la pèrdua del citoplasma, també en forma d'una gran gota citoplasmàtica apical, però en *E. cirrhosa*, a partir d'aquest moment, apareixen processos catabòlics molt complexos. En *E. cirrhosa*, tot el llarg del nucli queda recobert per una capa de citoplasma on hi ha vesícules clares disposades entre els solcs de les hélix (Fig.III.A.17), quedant en la part anterior la resta de citoplasma en forma d'una gran gota, citoplasma que resulta ser molt actiu metabòlicament, doncs en ell trobem gran nombre de complexos de Golgi molt desenvolupats, gotes de lípids, i moltes vesícules poc electrodenses (tal i com es pot veure en les properes Fig.III.A.18 i 19).