

ULTRAESTRUCTURA FUNCIONAL DE LOS GAMETOS DE LA ALMEJA

Miguel Padilla, M.Sc.*

ABSTRACT. The following paper is a transmission electron microscope analysis of the ultrastructure of oocytes and sperm of the clam *Protothaca thaca*. Sperm suspensions treated with Ionofore A23187 showed an excitotoxicity of the acrosome filament. The functions attributed to some of the ultrastructural components are described and discussed in comparison to those of the sea urchin.

INTRODUCCION

El grupo de los moluscos bivalvos también denominados Lamelibranchios o Pelecípodos, constituye una de las seis clases que forman el "Phylum mollusca"; sus componentes son microherbívoros, suspensívoros o sedimentívoros, cuya posición en la cadena trófica marina está ubicada en el nicho correspondiente a los consumidores primarios.

La biología reproductiva de este importante grupo ha demostrado ser diversa y compleja, lo que nos ha obligado a considerar las especies por separado y compartimentar el estudio de su reproducción de manera de poder observar con mayor detalle los procesos fundamentales. Para esto se ha apelado a elementos que poseen una mayor resolución como el microscopio electrónico de transmisión el que nos ha permitido describir la ultraestructura de los gametos de la almeja *Protothaca thaca* (Molina 1827). Para los efectos de este estudio también hemos empleado procedimientos bioquímicos como el uso del Ionóforo

* Instituto de Oceanología, Universidad de Valparaíso. Casilla 13-D, Viña del Mar, Chile.

A23187 con el que se logra dar respuesta a algunas de las interrogantes sobre las funciones que cumplen las estructuras subcelulares de estos gametos.

El objetivo fundamental del presente trabajo, además de describir la morfología de las células sexuales de la almeja *P. thaca*, es el de contribuir a la descripción de los procesos que conducen a la activación, fertilización y exocitosis del filamento acrosomático del espermio.

Si bien es cierto que existe una extensa información sobre la reproducción en el laboratorio de los equinodermos, Epel (1975), Vacquier (1971), Schuel et al. (1982) y Nishioka (1980); lamentablemente no podemos decir lo mismo sobre la reproducción de los bivalvos.

El análisis de los gametos de las almejas chilenas más comunes como la *P. thaca* y la *Ameghinomya antiqua* nos ha permitido poder manifestar como antecedente que tanto el oocito como el espermio de estas especies son células sexuales que aunque reprimidas momentáneamente, están programadas para interactuar a través de receptores superficiales. Esta interacción produce cambios iónicos citoplasmáticos que desatan reacciones secuenciales, las que culminan en la activación del desarrollo.

Análisis previos de los gametos de la *P. thaca* y la *A. antiqua* nos ha demostrado que dentro de las poblaciones naturales de estas especies existen casi siempre especímenes con gametos en estados de madurez, también se pudo apreciar que las fecundidades de la *P. thaca* son considerables y que el número promedio de oocitos maduros estirpados que se pueden obtener en forma compacta, a través de una centrifuga manual, es del orden de 1.250.000 para almejas de 5 a 6 centímetros. Estimaciones efectuadas anteriormente en el laboratorio, nos dieron como fecundidades promedio para estas mismas tallas las cifras de 3.6×10^6 oocitos y 1.8×10^9 espermios.

Constituye una gran suerte el poder contar con esta profusión de gametos, pues ello implica que existe una rica fuente de material experimental con la cual se pueden disipar muchas de las incógnitas existentes en cuanto a las condiciones que requieren los procesos fundamentales como la fertilización y la activación del oocito.

Debemos reconocer que en la actualidad se desconocen muchas

de las reacciones intra celulares que inducen la citokinesis, lo que vale para la mayoría de las especies de los invertebrados marinos.

Recientemente a través de experimentos donde se omiten elementos requeridos y mediante el uso de agentes que impiden o inducen reacciones conocidas, se están señalando algunos de los principales efectores y sus respuestas.

Coincidente con el conocimiento de estos procesos está la descripción de los componentes ultraestructurales involucrados, tema central del presente trabajo.

MATERIALES Y METODOS

Método histológico empleado en la observación de los gametos de la almeja en el microscopio electrónico de transmisión

Las suspensiones de oocitos y espermios expuestas a diferentes tratamientos fueron fijadas en Glutaraldehído al 2.5%, empleando como "buffer" agua de mar filtrada pH 8.2. El material fue postfijado en tetróxido de osmio al 1% en el mismo "buffer". Se efectuó una tinción en bloque con acetato de uranilo (1%) seguido por una deshidratación en una serie de Etanol de 50-70-80-96-100%. Se completó la deshidratación en acetona (100%) para a continuación proceder con la inclusión en la resina Epon-812. Finalmente las muestras se colocaron en planchetas de silicona y se mantuvieron en una estufa a 60°C durante 3 días para completar la polimerización de la resina de inclusión. Secciones de 50-100 nm fueron obtenidas en un ultra micrótopo Reichert Om-V2 y las secciones contrastadas en forma convencional fueron observadas en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss Em-9.

El presente método fue realizado en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso.

Método de empleo del Ionóforo A23187 en la verificación de la excitosis del filamento acrosomático del espermio de la almeja

Se efectuaron dos suspensiones de espermios con dos gotas de espermio seco cada una, la primera en 10 ml de agua de mar artificial sin calcio y la segunda en 10 ml de agua de mar con el Ionóforo A23187.

El Ionóforo A23187 es un antibiótico de origen bacterial que altera la permeabilidad selectiva de la membrana del espermio hacia los cationes bivalentes, permitiendo el libre tránsito del Ca^{2+} a través de la membrana. El A23187, de peso molecular de 532, fue empleado en concentraciones micromoleculares, efectuándose primero una solución "stock" de 5.6×10^{-4} M en ethanol, la que se diluyó en agua de mar hasta obtener una concentración final de 5.6×10^{-6} M.

Los espermios de la almeja se colocaron en una suspensión de 2.2% v/v en la concentración del Ionóforo mencionada.

Método empleado en la activación del desarrollo del oocito de la almeja

La suspensión de oocitos fue sometida a una solución de 0.1 N de NH_4OH durante 30 minutos después de lo cual se observó la disolución de la vesícula germinal. El NH_4OH fue eliminado mediante filtración y la solución de oocitos fue reconstituída en agua de mar normal antes de ser fertilizada.

La fertilización se llevó a efecto con 1 ml de una solución compuesta por 2 gotas de espermio seco en 20 ml de agua de mar filtrada.

RESULTADOS

Descripción de las ultraestructuras del oocito y el espermio de la almeja

El oocito de la almeja mide aproximadamente 70 μm y se encuentra recubierto por más o menos 30 μm de una capa gelatinosa.

Lá única estructura que puede visualizarse en esta gelatina transparente es el tapón que recubre la cicatriz del pedúnculo (Lámina 1a).

La lámina 3a constituye una concepción esquemática de la membrana citoplasmática en la que se pueden apreciar una bicapa de lípidos que contiene proteínas globulares integradas y adheridas en forma periférica. Las microfotografías electrónicas de la membrana citoplasmática (Lámina 2a) demuestran que de ella se desprenden un sinnúmero de proyecciones o microvellosidades, las que se encuentran recubiertas por la capa vitelina. Los elementos ultraestructurales más frecuentes que se observan en el citoplasma son los gránulos de vitelo (Lámina 2b) los que constituyen el elemento nutritivo que requiere el corto desarrollo lecitotrófico de esta especie. También podemos distinguir gran número de mitocondrios (Lámina 2c), estructuras donde se produce la fosforilación oxidativa que suministra el ATP para toda clase de procesos celulares que consumen energía. Toda la célula se encuentra interconectada por la extensa red de retículo endoplasmático (Lámina 2d), estructura que además de relacionar los organelos internos de la célula entre sí, asocia a sus membranas los ribosomas. En una posición excéntrica dentro del oocito puede distinguirse el núcleo (N) o vesícula germinal (Lámina 1b) delimitada por su membrana nuclear (Lámina 2e). El nucleoplasma que porta los cromosomas de la especie, posee también un nucléolo, el cual desaparece junto con la disolución de la vesícula germinal. Inmediatamente debajo de la membrana citoplasmática se encuentran los gránulos corticales (Lámina 1c). Estos gránulos son producidos a nivel del aparato de Golgi (Lámina 1e) y forman un monoestrato de estructuras elipsoidales asociadas perpendicularmente con la membrana citoplasmática. Las innumerables fertilizaciones efectuadas en nuestro laboratorio con los gametos de la *P. thaca* nos han demostrado que bajo ciertas condiciones los gránulos corticales de esta especie estarían involucrados en la formación de una membrana de fertilización similar a la formada por la reacción cortical que se produce en los erizos. Además, se sabe que esta reacción en erizos, constituye uno de los mecanismos antipolispermicos que impide la penetración de aquellos espermios posteriores a la primera incorporación.

El espermio de la *P. thaca* se desarrolla en los túbulos

seminíferos de la gónada. En el microscopio convencional de luz se puede apreciar solamente su cabeza, la que mide menos de 5 μm . La observación al microscopio electrónico de transmisión del espermio muestra un largo flagelo propulsor, cuya estructura es del tipo 9 + 2 (Lámina 4a y b). El cuello o pieza media se encuentra formado por 4 prominentes mitocondrios (Lámina 4c y d) que circundan a dos centríolos (Lámina 4e) bajo los cuales se desprende el flagelo. El núcleo es ancho en su base, aguzándose hacia el extremo donde adquiere una forma ligeramente arqueada. Entre el núcleo y el acrosoma, existe un pequeño espacio más claro (Lámina 4f). El acrosoma se encuentra formado por la argolla basal (Lámina 5a y 3b) y sobre esta argolla se encuentra el canal central o vástago axial (Lámina 5a y 3b). El contenido del canal central una vez producida la reacción acrosomática forma el filamento acrosomático (Lámina 5c y 3c). En posición lateral o periférica al canal central se puede apreciar una zona más oscura circundada por las membranas acrosomáticas externa e interna, que hemos denominado vesícula adhesiva (Lámina 5a y b y 3b). Nótese que el vástago axial de la *P. thaca* no parece atravesar el núcleo del espermio hasta su base (Lámina 1d) como sucede en los Mytilidos. Niiyima y Dan (1965). Una ligera constricción posterior divide al acrosoma intacto en dos compartimentos desiguales: la vesícula acrosomática (Lámina 5a y 3b) y la "ampula" apical o "perforatorium" (Lámina 5a y 3b). Ambas estructuras se encuentran recubiertas por la membrana acrosomática externa y por la membrana citoplasmática que envuelve tanto el acrosoma como al núcleo del espermio. La membrana acrosomática interna perdura en forma intacta después de la extensión del filamento acrosomático.

Una de las condiciones necesarias para que se produzca la fecundación del oocito por el espermio es que este último se adhiera a su sitio receptor y se fusione con el oocito. Básico tanto a la adhesión como a la fusión del espermio está el que se produzca la reacción acrosomática. Nosotros verificamos la inducción de esta reacción para suspensiones de espermios sometidos a agua de mar sin calcio y a agua de mar con el Ionóforo A23187 y pudimos comprobar que mientras los espermios sometidos a la primera situación, mantuvieron sus acrosomas intactos (Lámina 5a y b y 3b); los espermios sometidos al Ionóforo extendieron en su totalidad sus filamentos acrosomáticos (Lámina 5c y 3c).

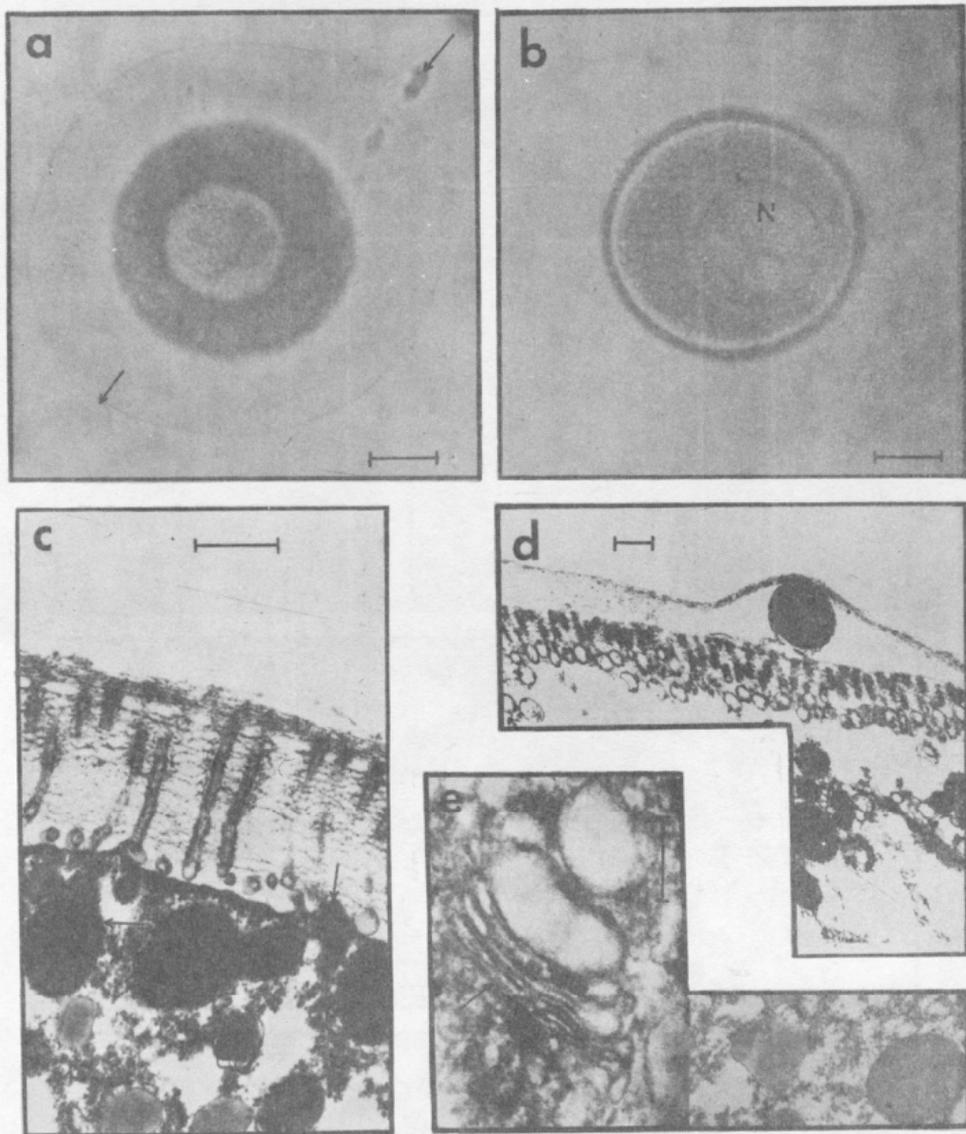
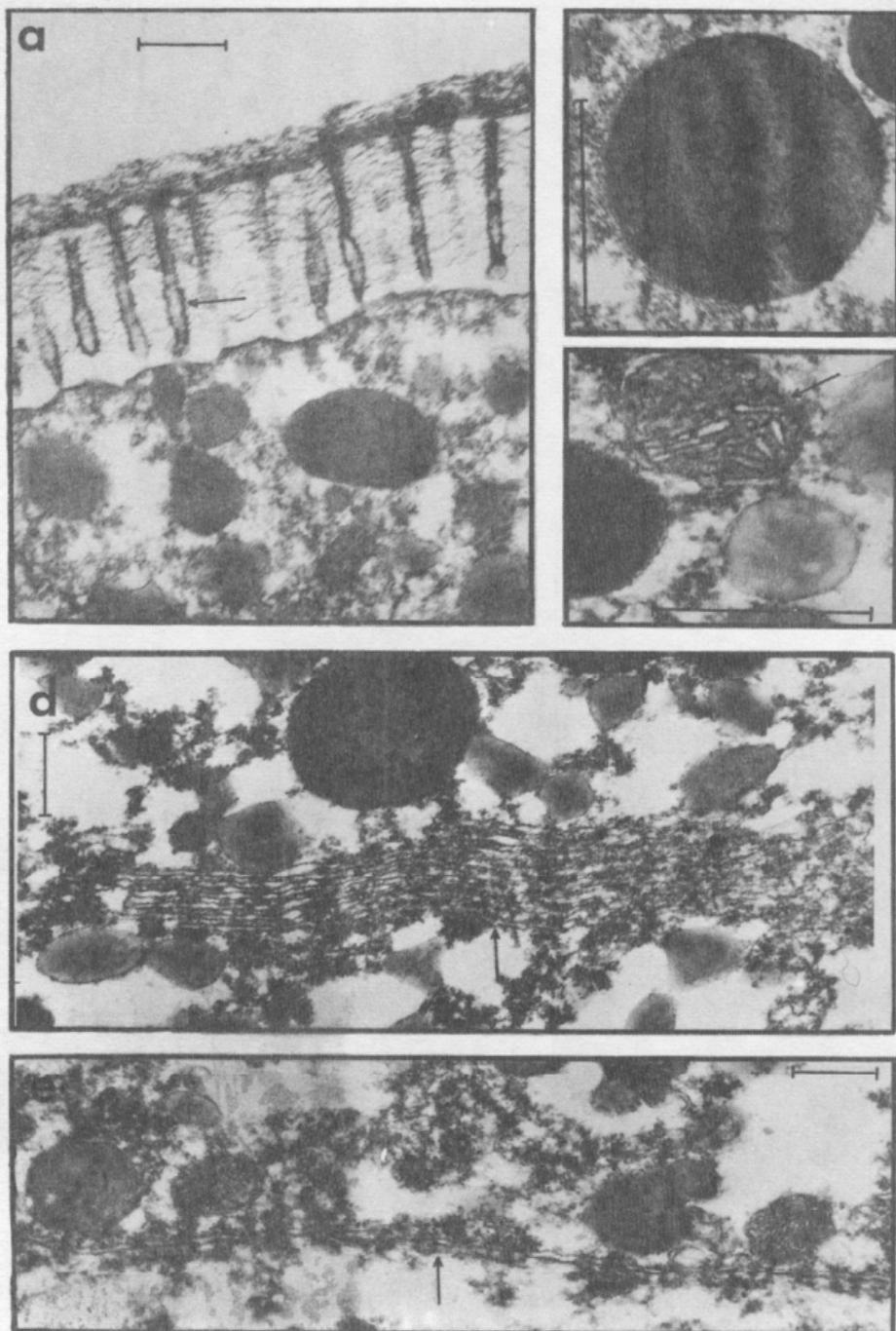


Lámina 1

Nota: Todas las barras representadas en las láminas de las fotomicrografías electrónicas corresponden a $0.5 \mu\text{m}$; las que representan las microfotografías convencionales de luz corresponden a $18 \mu\text{m}$.



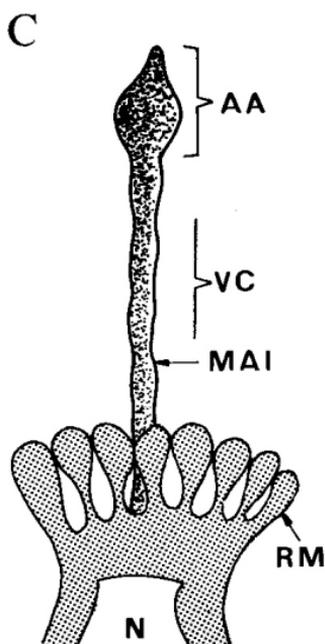
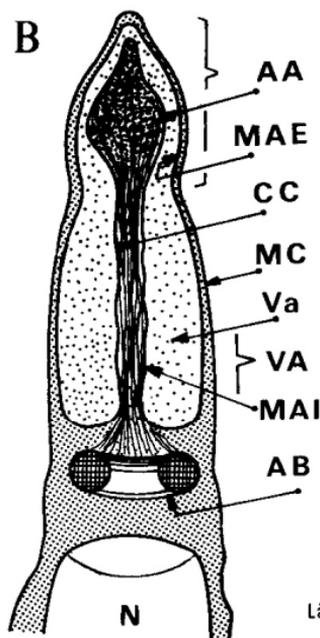
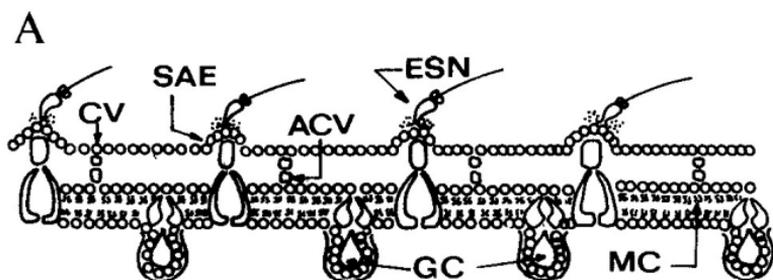
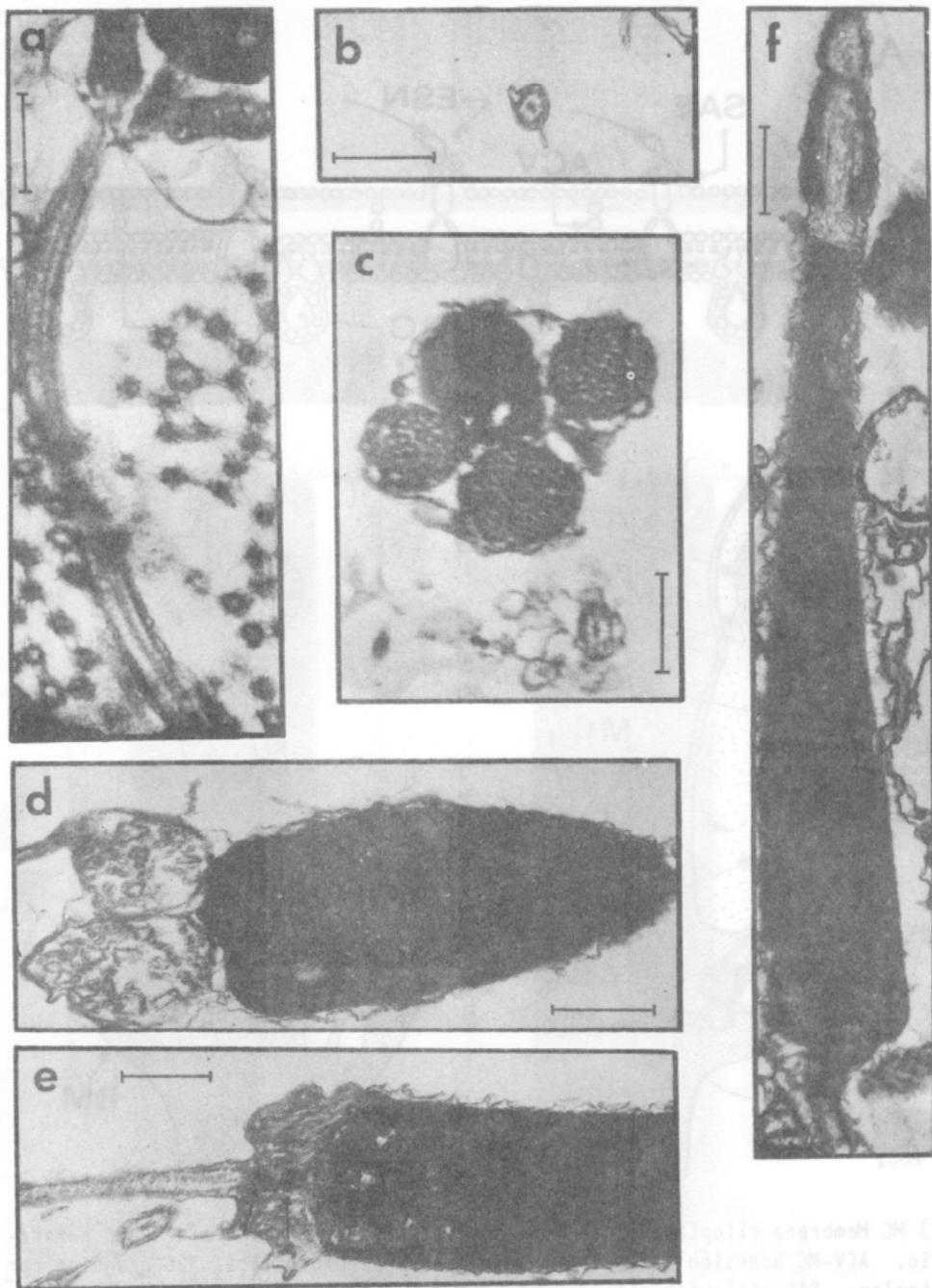
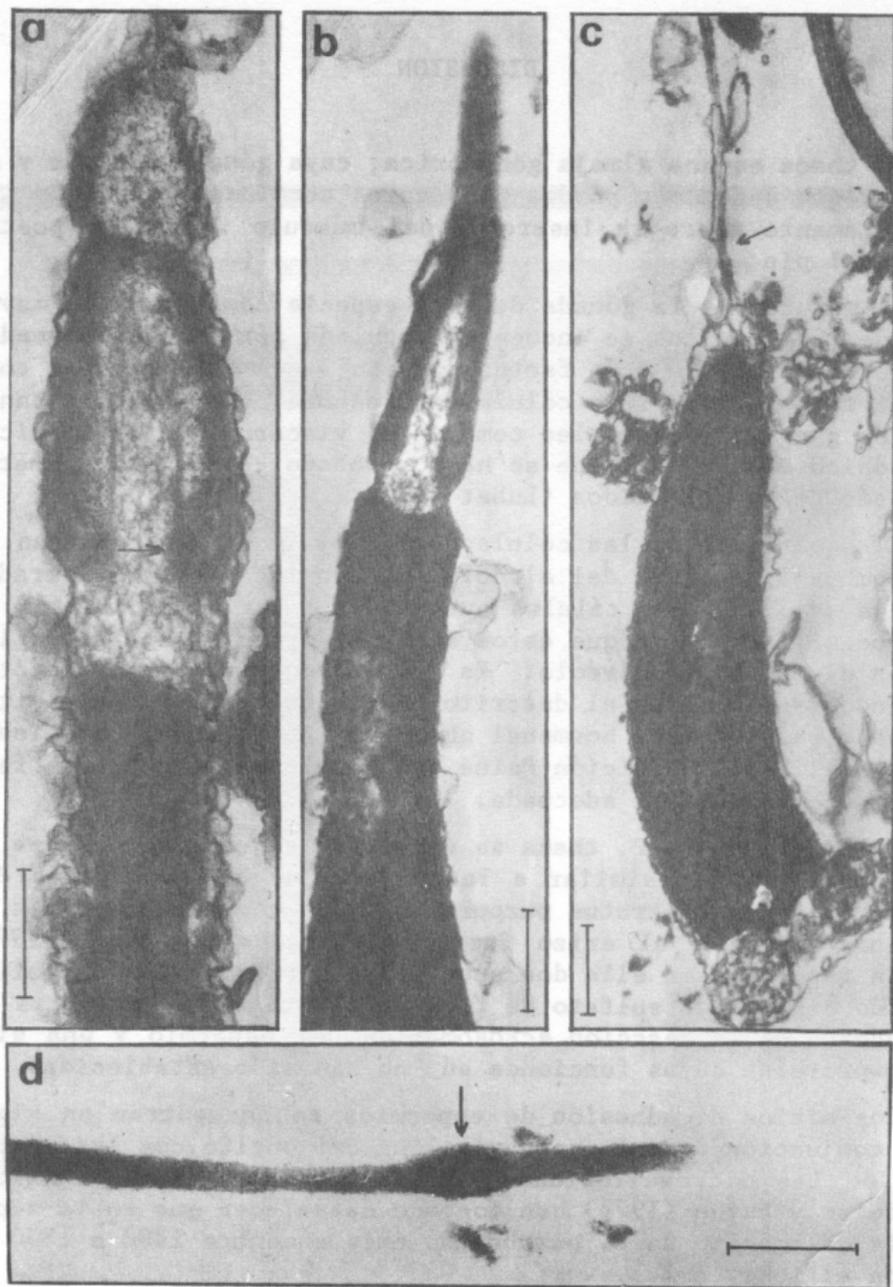


Lámina 3

a) MC Membrana citoplasmática. CV capa vitelina. ESN espermio super numerario. ACV-MC adhesión capa vitelina membrana citoplasmática. GC gránulos corticales. SAE sitio adhesión de espermios; b) AA ampula apical o "perforatorium". MAE membrana acrosomática externa. CC canal central. MC membrana citoplasmática. Va vesícula adhesiva. AB argolla basal. N núcleo. VA vesícula acrosomática; c) RM repliegue membranoso. VC vástago axial. MAI membrana acrosomática interna. AA ampula apical o "perforatorium".





DISCUSION

La *P. thaca* es una almeja gonocórica, cuya gónada pareada y arborescente desemboca en dos gonoductos terminales ubicados inmediatamente sobre la inserción del músculo retractor posterior del pie.

La madurez de la gónada de esta especie como la de la mayoría de los moluscos se encuentra regulada por un sistema endocrino sincronizado a un factor exógeno, sumamente estable como es el fotoperíodo. Las células neurosecretoras ubicadas tanto en los ganglios cerebrales como en el visceral poseen un ciclo periódico discernible que se ha comprobado estimula la gametogénesis de los Mitílidos (Lubet 1980).

El desarrollo de las células goniales que se encuentran en la membrana germinal del alvéolo emplean los aportes liberados por la lisis de las células nutritivas y su incorporación a los oogonios permite que éstos se transformen en oocitos e invadan el lumen del alvéolo. Es probable que un factor meiótico endocrino similar al descrito por Illanes (1979) para Mitílidos, sea el agente hormonal que permita reactivar la meiosis de las almejas, condición "sine qua non" para obtener una fertilización "in vivo" adecuada.

El oocito de la *P. thaca* se encuentra recubierto por una capa gelatinosa muy similar a la que recubre a los oocitos del erizo *Strongilocentrotus purpuratus*. Los componentes de la gelatina que posee el erizo fueron analizados por Epel (1975) quien reconoció en ella dos substancias principales: un polisacárido denominado sulfato de fucosa, al que se le atribuye la inducción de la reacción acrosomática del espermio y una sialico-proteína cuyas funciones aún no han sido establecidas.

Los sitios de adhesión de espermios se encuentran en algunas conjunciones de la capa vitelina del oocito con las cúspides de las microvellosidades de la membrana citoplasmática. Vacquier y Payne (1973) han logrado establecer que en la superficie del oocito de *S. purpuratus* existen entre 1300 a 1800 de estos sitios.

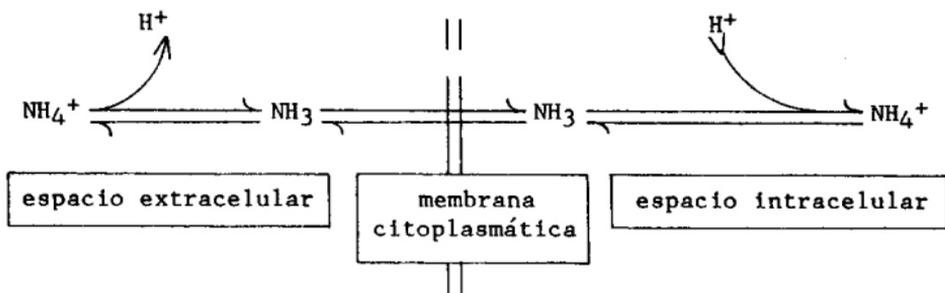
La reacción acrosomática como ya hemos señalado es activada por el sulfato de fucosa que contiene la gelatina del oocito y se inicia con la fusión de las membranas acrosomática externa

y citoplasmática del espermio. Las fotomicrografías electrónicas de espermios con filamentos acrosomáticos extendidos (Lámina 5c) demuestran que estas membranas una vez producida su fusión se repliegan o se deshacen, dejando libre el canal central o vástago axial para que éste se transforme en el filamento acrosomático. Para ello el canal central contiene la actina, proteína estructural que accionada por el Ca^{2+} externo se polimeriza y aumenta de extensión. Según lo observado en las fotomicrografías electrónicas el filamento acrosomático mantiene en su extremo a la "ampula" apical o "perforatorium" (Lámina 5d).

Las funciones de los contenidos de los componentes del acrosoma pueden deducirse de acuerdo a las tareas que deban desarrollar éstos hasta perforar la capa vitelina del oocito. Al parecer la función de adhesión a los sitios receptores de espermios es consumada por una proteína adhesiva contenida en la vesícula que forman las membranas acrosomática externa e interna. Esta sustancia adhesiva recubriría el filamento acrosomático durante su extensión (Lámina 5a y 3b) y ha sido aislada en erizos por Vacquier (1971) quien la denominó "bindina". Se presume también la existencia de una enzima proteolítica, posiblemente hialuronidasa, capaz de producir la perforación de la capa vitelina. La ubicación de esta proteasa en erizos ha sido tentativamente asignada a la argolla basal (Lámina 5a y 3b). Sin embargo, en la *P. thaca*, la persistencia de la "ampula" apical en el extremo del filamento acrosomático después de su extensión nos ha hecho pensar que este sitio tendría la posición ideal para ser portador de dicha enzima (Lámina 5d), por lo que constituiría con bastante propiedad lo que se ha venido a llamar el "perforatorium" del espermio.

Nosotros verificamos la extensión del filamento acrosomático del espermio de la *P. thaca*, haciendo uso del Ionóforo A23187. Como hemos visto, lo que ocurre es que el Ca^{2+} induce la polimerización de la actina lo que produce una leve extensión del filamento acrosomático. La exocitosis del filamento puede ser visualizada a través de las microfotografías electrónicas, las que demuestran claramente que los espermios contenidos en agua de mar sin calcio mantuvieron sus acrosomas intactos (Lámina 5a y 5b), mientras que los espermios contenidos en el Ionóforo A23187 muestran sus acrosomas disueltos (Lámina 5c).

En cuanto se diluye el espermio en agua de mar se inicia un intercambio iónico dependiente del Na^+ extracelular que libera el H^+ (ácido) intracelular. Este intercambio alcaliniza al medio interno, fenómeno que Nishioka (1980) ha relacionado con la activación del metabolismo del espermio. Lo mismo ocurre con los oocitos donde el medio alcalino cambia, además, la "conductancia" del K^+ , el que también se encuentra involucrado en un intercambio iónico con el Na^+ . Artificialmente sin hacer uso del espermio el NH_4OH cumple similares funciones al parecer substituyendo al Na^+ por el NH_4^+ y produciéndose el siguiente equilibrio descrito por Nishioka (1980):



El NH_4^+ se equilibra con el NH_3 fuera de la célula y el NH_3 al no tener carga es permeable y no puede ser rechazado por la membrana del oocito, esto le permite entrar libremente al interior de la célula donde absorbe protones (H^+) y alcaliniza el medio intracelular del oocito lo que induce la activación del metabolismo. El presente rodeo artificial de las funciones normales, sin embargo, no inicia la liberación de Ca^{2+} intracelular, suceso que produciría una reacción cortical y posible mente accionaría también el mecanismo de intercambio entre el Na^+ y el H^+ del oocito (Epel 1975).

Los experimentos efectuados en el laboratorio con los gametos de la *P. thaca* han comprobado la existencia de uno de los cambios iónicos esenciales para la iniciación de la activación del oocito, cual es un intercambio entre el Na^+ extracelular y el H^+ intracelular que alcaliniza el medio interno causando la síntesis proteica.

La evidencia experimental para este cambio la hemos obtenido aumentando el pH intracelular a través del uso del NH_4OH el cual substituye el intercambio $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ por un intercambio

$\text{NH}_4^+ - \text{H}^+$, lo que también alcaliniza el medio intracelular dando comienzo a la síntesis proteica.

AGRADECIMIENTOS. Deseo manifestar mis agradecimientos al Dr. Eduardo Couve de la facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso, por haberme recibido en su laboratorio y haber puesto a mi disposición sus conocimientos sobre microscopía electrónica y morfología ultraestructural.

También deseo agradecer al técnico del laboratorio de Microscopía Electrónica de la facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso Sr. Fidel Vargas por su valiosa ayuda.

La concentración a que fue empleado el Ionóforo A23187 fue sugerida por el Dr. Klaus Behn de la Universidad de Valparaíso, a quien hago extensivos mis agradecimientos.

Deseo también agradecer al Dr. Howard B. Halden de Lilly Research Laboratories, USA, por haberme facilitado el Ionóforo.

REFERENCIAS

- Epel, D. The program of and mechanisms of fertilization in the echinoderm
1975 egg. *Amer. Zool.* 15: 507-522.
- Illanes, J.E. Recherches cytologiques et experimentales sur la neurosecre-
1979 tion de la moule *Mytilus edulis* L. These 3r. cycle Univ. Caen.
135 p. 7 pl.
- Lubet, P.E. Actions des facteurs interns sur la reproduction des mollusques
1980 lamellibranches. *Oceanis* 6 (Fac. 5): 491-510.
- Niiyima, L. and Dan. The acrosome reaction in *Mytilus edulis* L. *J. Cell.*
1965 *Biol.* 25: 243-248.
- Nishioka, D. Relationship between release of acid, the cortical reaction and
1980 the increase of protein synthesis in sea urchin eggs. *J. Exp. Zool.*
212: 215-223.
- Schuel, A., R. Schuel, P. Dandekas, J. Baldt and R. Summers. Sodium requeri-
1982 ments in hardening of the fertilization envelope and embryonic de-
velopment of sea urchins. *Biol. Bull.* 162: 202-213.
- Vacquier, V.D. and J.E. Payne. Methods for quantitating sea urchin Sperm
1973 binding. *Exp. Cell. Res.* 82: 227-235.

- Vacquier, V.D. and G.W. Moy. Isolation of bindin the protein responsible for
1971 adhesion of Sperm to sea urchin eggs. *Proc. Nat. Acad.Sci. USA*, 74
(Nº 6): 2456-2460.