

LOS TIPOS CELULARES EN LA ESPERMATOGENESIS DE
PHERETIMA CALIFORNICA KINBERG. (MEGASCOLECIDAE,
OLIGOCHAETA)

Por F. DULOUT, Z. TOMSIC, A. MORENO y M. LEVIN

SUMMARY

Cellular types in the spermatogenesis of *Pheretima californica* Kinberg (Megascolecidae, Oligochaeta).— The authors studied the histological structure and the spermatogenesis and spermiogenesis processes in the seminal vesicles, testis, etc. of *Pheretima californica* Kinb.

The material was included and selected according to the usual histological techniques with Feulgen's nuclear reaction in histological sections and staining of Hematoxylin — eosin and Van Giesson as control.

The different stages of spermatogenesis were observed, studying also the different cellular types.

The spermatogonia, spermatocytes, spermatides and their maturity cycle to spermatozoid are described, with special reference to the blastophore cycle in the final phases of the spermatogenesis and spermiogenesis.

Al realizar el presente estudio, hemos pretendido aportar más datos sobre la biología de este Oligoqueto, constituyendo la presente comunicación, el primer paso en el estudio integral de su espermatogénesis.

La gran variedad de características del proceso gonial en los Oligoquetos obliga a profundizar el análisis en cada especie, pues por aquel motivo son imposibles las generalizaciones. Sólo una pequeña cantidad de mínimos datos constituyen una base común.

Gracias a los pacientes y concienzudos trabajos de Michaelsen, Bugnion y Popoff, Cognetti, Stephenson, y más recientemente Muldal, Omodeo, Gavrilov, etc., se cuenta actualmente con una base o punto de partida con el cual enfocar el análisis adaptándolo, lógicamente, a las características de los fenómenos observados.

Sin embargo, la mayor parte de los antecedentes conocidos, se refieren a los casos en que se ha constatado una alteración en el proceso gonial y pocas son las descripciones de espermatogénesis normales en estos individuos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para proceder al estudio de los tipos celulares en la espermatogénesis de *Pheretima californica* Kinb. se efectuaron cortes histológicos en vesículas seminales de individuos adultos. Para ello se eligieron individuos con clitelo bien visibles, durante las recolecciones de material que se realizaron en el parque del Inst. Miguel Lillo y en los alrededores de la ciudad de S. Miguel de Tucumán.

Una vez determinada la especie por uno de nosotros (Z. T.) se procedió a la narcosis de los individuos en alcohol diluido y luego se dividieron en dos grupos, a saber:

—Fijados totalmente para luego extraer las vesículas seminales.

—Extracción de las vesículas seminales y fijación inmediata de las mismas.

Paralelamente se estudiaron cortes totales de individuos, efectuados a la altura de las gónadas.

El material se fijó en mezcla de Carnoy y fijador de Stieve.

Una vez fijadas, las vesículas seminales se incluyeron en parafina y se realizaron los cortes, de un espesor de 5 micras.

La mayor parte de los cortes se colorearon con la reacción nuclear de Feulgen, contrastada en algunas ocasiones con coloración citoplásmica de fast-green y de hematoxilina acética según Sáez.

También se empleó una modificación del método de Tjio y Levan de orceína acética para cromosomas (núcleos) de células animales, y coloración con Hemalum de Mayer.

En los cortes totales de individuos, se emplearon para teñir, la técnica de Van Giesson y coloraciones de Hematoxilina-eosina, PAS-Hematoxilina y Hemalum de Mayer.

RESULTADOS

En *Pheretima californica* Kinb. la espermatogénesis y espermiogénesis tienen lugar en los testículos, vesículas seminales medias, vesículas seminales y pabellones testiculares.

Los tipos celulares son característicos de cada porción y determinan un estado particular del proceso espermatogonial.

Tipos celulares en los testículos: observando panorámicamente un corte de testículo, se advierte en primer término la existencia de grupos con distinto

número de células, separados unos de otros en forma tal que poseen el aspecto de islotes. Aisladamente, entre estos sectores o superpuestos a ellos se advierten manojos de espermatozoides esparcidos irregularmente.

A mayor aumento puede observarse que las células difieren más notablemente por el tamaño, forma e intensidad de coloración de sus núcleos.

De esta manera se ven células en las que los núcleos presentan una cromatina dispersa, conforme a lo cual aparecen más débilmente teñidos. Este hecho es más notable en las preparaciones donde se ha usado la reacción de Feulgen.

Los grupos de células con un número variable de elementos, correspondería a los folículos, citados por Stephenson. Se trata de masas de células perfectamente aisladas en sectores definidos, visibles con claridad.

Presumiblemente, el número existente en cada grupo constituya una progresión geométrica, de manera tal que se encuentren células aisladas, células formando pares, y grupos de cuatro, ocho y dieciséis elementos. Si bien hemos observado grupos con esos números, también hemos constatado la presencia de grupos con números pares que no siguen una progresión lógica. Ello se debe, con seguridad, a que se ha operado exclusivamente con cortes en los que es imposible situar una capa uniforme de estos grupos.

El número máximo que hemos podido contar es de 16 elementos. Algunos grupos, exactamente los que cuentan con 8 y 16 células, presentan en algunos casos, una marcada condensación en la cromatina de sus núcleos, apareciendo éstos como cuerpos esféricos, picnóticos, de menor tamaño que los núcleos con cromatina dispersa que se observan en células aisladas. Con la reacción de Feulgen aparecen intensamente coloreados.

Los espermatozoides presentes en esta región de las gónadas aparecen como manojos o haces con número variable de componentes. La mayor parte de las veces resulta imposible determinar el número exacto, pero en ciertas oportunidades es posible ver espermatozoides aislados o grupos dispersos, apreciándoselos con precisión en lo que hace a su morfología.

Periféricamente es posible observar una capa de células de morfología marcadamente distinta de las arriba descriptas. Se trata indudablemente de una cubierta tisular en la que las células presentan un tamaño menor que las del interior, con núcleos también más pequeños, de cromatina densa.

Tipos celulares en las vesículas seminales medias y vesículas seminales propiamente dichas: las células presentes en estas zonas difieren totalmente de las descriptas anteriormente. Observando panorámicamente un corte se advierte una mayor heterogeneidad.

En primer término describiremos un tipo de células asociadas, pero de manera diferente a las del testículo y de tamaño mayor que aquellas.

Estas células aparecen en grupos de cuatro, ocho o más. Tienen un núcleo grande, con cromatina dispersa que ocupa la mayor parte del protoplasma. La cromatina presenta regiones donde es común observar estados de heteropienosis positiva. La forma de estas células es alargada, con un engrosamiento correspondiente con la posición del núcleo en la parte exterior y un adelgazamiento hacia la parte central, donde confluyen los elementos integrantes. Así, aparecen como un elemento circular múltiple con las células en posición radial.

No hemos observado aquí divisiones celulares. Podría ser que al comenzar éstas se desintegrara el grupo.

Luego pueden observarse células de forma esférica, formando grupos que pueden llegar a tener hasta 16 elementos (aunque este número no debe considerarse como absoluto). Son de tamaño algo menor a las arriba descritas, aunque el núcleo no es proporcionalmente más pequeño. La cromatina tiene distinto comportamiento con los colorantes, desde el aspecto de una matriz dispersa, hasta un estado de condensación, pasando, por etapas intermedias, donde es fácil distinguir regiones con heteropienosis positiva.

En estas células es donde hemos observado estadios claros de división, cuando el grupo tiene ocho elementos, y donde se hace distinguible el número diploide de cromosomas en metafase. Ello indica que se trata de espermatogonias.

A continuación se advierten células similares a las anteriores, pero de menor tamaño, que también se encuentran formando grupos, aunque con un número mayor de componentes. Los más claros, son los que tienen 32 células. Allí se ve la cromatina nuclear altamente condensada. No se pueden distinguir los cromosomas individualmente, sino formando una masa, que con las coloraciones específicas aparece densa.

También encontramos grupos similares compuestos de un mayor número de células, en los que resulta imposible determinar el número, dados los problemas que surgen de la pequeñez de las células y de la profundidad del campo.

Finalmente aparecen células en las que el núcleo ocupa casi todo el volumen y tiene un tamaño sumamente disminuído. Se ve, en ciertos cortes afortunados, rodeando periféricamente una masa de naturaleza acidófila.

El número de células en estas formaciones debe ser superior a 100, pero como en el caso anterior, nos ha sido imposible el recuento exacto.

Estas formaciones evolucionan para constituir los espermatozoides y el blastóforo, de aspecto característico y concordante con la descripción de Stephenson.

El blastóforo aparece como una masa citoplásmica esférica, finamente granulada. Desde el ecuador de esta esfera y hacia la parte inferior se extienden los espermatozoides, en forma de largos filamentos estrechamente asociados. En un corte de vesícula seminal son observables grupos de espermátidas, espermatozoides y blastóforos en distintas fases de su desarrollo.

Tipos celulares en los pabellones masculinos: los pabellones masculinos son regiones de las gónadas que se observan con facilidad en un corte de éstas. Aparecen como un receptáculo relacionado con las vesículas seminales, compuesto por masas compactas altamente basófilas y células de distinta clase.

Las masas a que hacemos referencia son los espermatozoides, ya en proceso de maduración, puesto que se hallan desprovistos del blastóforo, y la forma de asociación entre ellos es diferente a la que se presenta durante la espermiogénesis, donde se los ve regularmente asociados a la sustancia acidófila del blastóforo. Aquí se presentan como grupos de distinta extensión, densos, casi sin diferenciación entre los elementos constitutivos. Solamente las porciones apicales evidencian un marcado tropismo hacia un tipo de células epiteliales.

Estas células forman parte de los tejidos de revestimiento o cubierta de los pabellones. La capa más interna está compuesta por células columnares grandes, con un núcleo también de gran tamaño, ubicado en el extremo de la célula opuesto a la cavidad; hacia ésta se orienta el citoplasma, que termina en lo que aparentemente son microvellosidades hacia las que se ordenan las cabezas de los espermatozoides.

El tamaño de los núcleos y de los nucléolos, como así también el citoplasma "cargado" de estas células, indicaría que se trata de elementos de función sertoliana, de manera que la correlación evidenciada con los espermatozoides en proceso de maduración podría deberse, quizá, a una función nutricia y madurativa. Esto se ve avalado por el hecho de haber encontrado similar disposición en los receptáculos seminales (espermatecas), en cuyos divertículos observamos los espermatozoides orientados idénticamente.

CONCLUSIONES

En términos generales podemos decir que los tipos celulares en la espermatogénesis de *Pheretima californica* Kinb. coinciden con los descriptos por Stephenson, en base a los trabajos de Bugnion y Popoff, para la espermatogénesis normal en Lumbrícidos.

El proceso celular en las gónadas, conforme a los tipos descriptos, puede ser dividido en dos partes.

La primera, que ocurre en los testículos, consiste en la multiplicación de las células "preespermatozonales", agrupadas en lo que Stephenson denominó *folículos*.

Estas células pasarían individualmente a las vesículas seminales, donde aumentan su tamaño, se asocian en grupos por medio de pedículos, alcanzando un número de cuatro, ocho o más. Es de presumir que la división de estas células no tiene lugar conjuntamente y que al comenzar ésta, el grupo se desintegra.

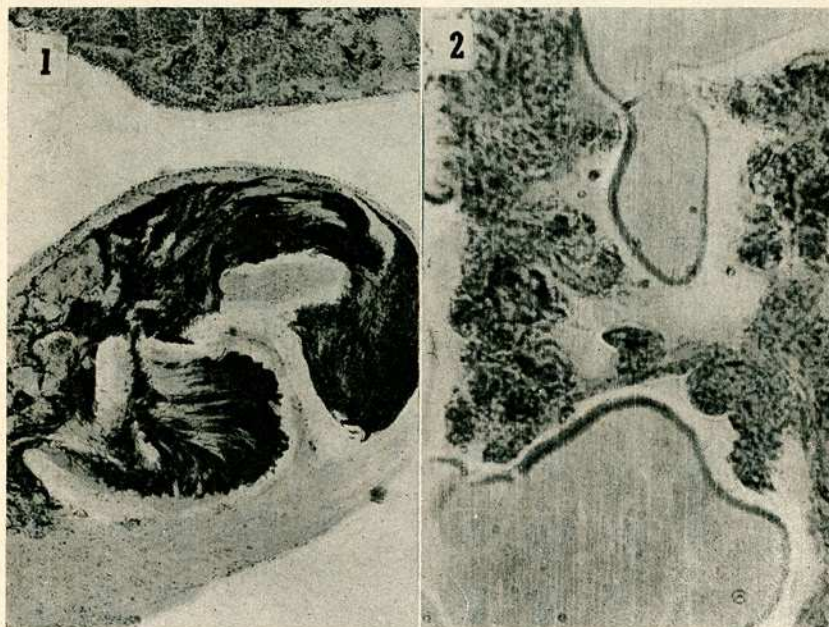


Fig. 1. — Pabellones testiculares. Se ven los espermatozoides constituyendo masas altamente basófilas, circunscriptos por capas celulares. Coloración de Feulgen. Aumento al microscopio 250 x.

Fig. 2. — Vesícula seminal a gran aumento. Coloración de Feulgen. En el centro metafase de espermatocito I vista lateralmente. Se observan los cromosomas agrupados en la placa ecuatorial evidenciando una acentuada condensación. Aumento al microscopio 1.000 x.

La segunda parte comenzaría por la presencia de una verdadera espermatogénesis, surgida de la ruptura del conjunto anterior, cuyas células inician una serie de divisiones mitóticas sincrónicas a partir de la segunda, conformando de este modo una progresión geométrica.

Coincidiría esto con lo expresado por Stephenson en el sentido de que ocurren cuatro mitosis goniales, de forma tal que se trata de espermatogonias hasta cuando el grupo tiene dieciseis elementos, de espermatocitos I cuando tiene treinta y dos y de espermatocitos II cuando tiene sesenta y cuatro células, constituyendo las espermatidas grupos de ciento veintiocho elementos. Aunque no ha sido nuestro objetivo realizar un trabajo estadístico de la existencia de esa progresión, podemos decir que aparentemente los distintos tipos de células están agrupadas en esas cantidades.

Un detalle que creemos necesario aclarar es el relativo a la denominación de *mórula* empleada hasta ahora para los grupos de células presentes en las vesículas seminales. Entendemos que no es exactamente preciso su empleo, pues este término es prácticamente privativo de las descripciones embriológicas.

Es evidente un marcado sincronismo en todo el proceso gonial, que llega hasta la íntima asociación de las espermatidas y espermatozoides con el blastóforo.

Este desaparece antes del pasaje de los espermatozoides a los pabellones masculinos, donde la agrupación es menos estrecha, dependiendo del tropismo hacia el tipo de células epiteliales aparentemente nutricias.

Finalmente, podemos afirmar que en *Pheretima californica* Kinb. la espermatogénesis sigue un proceso normal, acorde con las particularidades que le son privativas.

Se confirma lo dicho por la presencia de espermatozoides normales en los receptáculos seminales.

BIBLIOGRAFIA

- BUGNION, E., y POPOFF, 1905. La spermatogenèse du lombric terrestre.—C. R. du VI Congr. Int. Zool. Genève: 410-420.
- CHATTON, E., y TUZET, O., 1941. Sur quelques faits nouveaux de la spermiogenèse du *Lumbricus terrestris*.—C. R. Acad. Sci. 213 : 373-376.
- DULOUT, F., 1966. Una modificación del método de Tjio y Levan de orceína acética para aplastados. Trabajo en preparación.
- GAVERILOV, K., 1948. Sobre la reproducción uni y biparental de los Oligoquetos.—Acta zool. lilloana 5 : 221-311.
- OMODEO, P., 1952. Cariología dei Lumbricidae.—Caryologia, 4 (2).
- TOMŠIĆ, Z., 1966. Contribución al conocimiento de los Oligoquetos terrícolas argentinos. Trabajo en preparación.

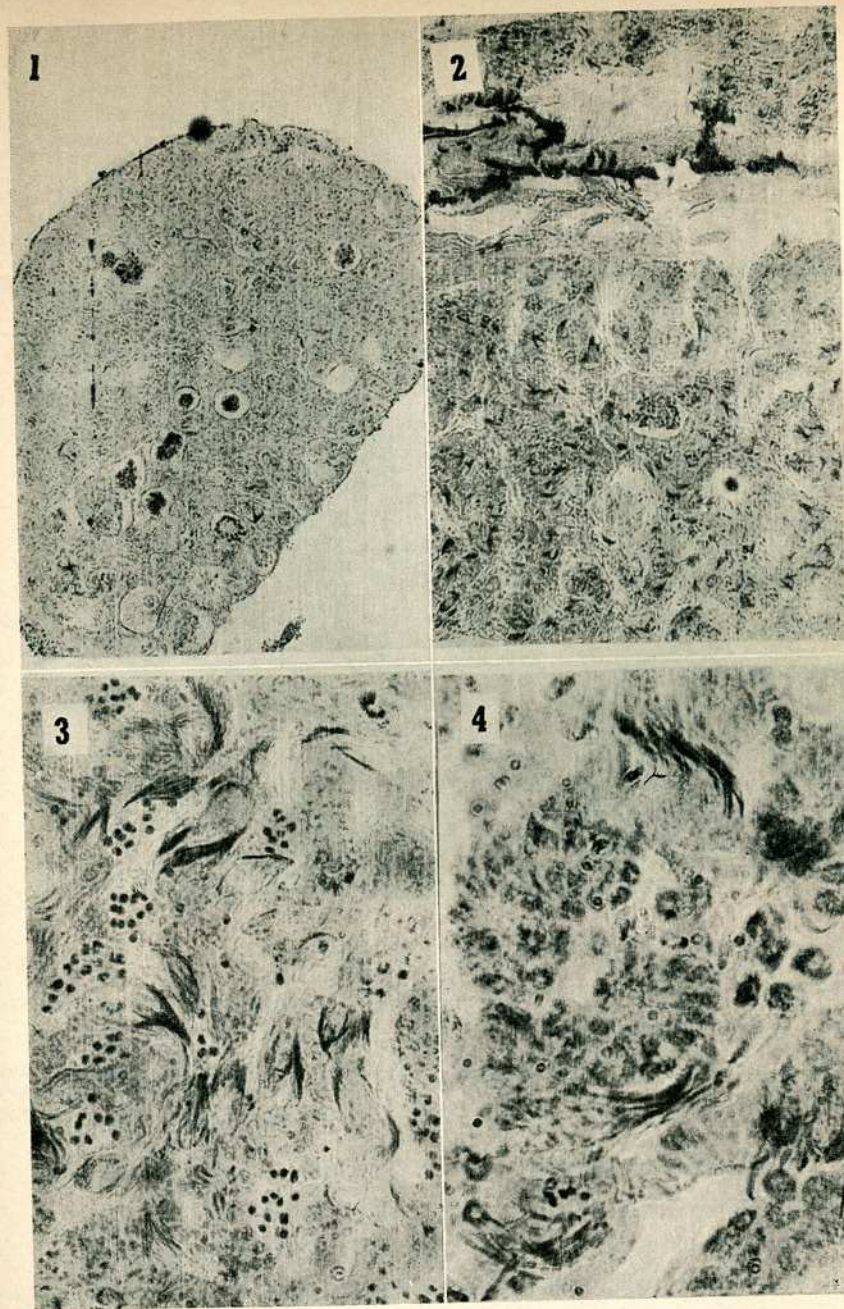


Fig. 1. — Panorámica de testículo de *Pheretima californica* Kinb. Coloración de Feulgen. Aumento al microscopio 250 x.

Fig. 2. — Panorámica de vesícula seminal. Arriba pequeña porción de pabellones testiculares. Coloración de Feulgen. Aumento al microscopio 250 x.

Fig. 3. — Vesícula seminal a mayor aumento. Coloración con Hemalum de Mayer. Se observan distintas agrupaciones celulares y manojos de espermatozoides, como también un blastóforo en período final, donde la porción citoplásmica acidófila casi no es visible (Centro hacia la izquierda). Aumento al microscopio 450 x.

Fig. 4. — Vesícula seminal a gran aumento. En el centro se puede apreciar un grupo de células pediceladas. Coloración con Hemalum de Mayer. Aumento al microscopio 1.000 x.