

Caracterización estructural y ultraestructural del espermatozoide de *Emerita analoga* (Stimpson, 1857) (Decapoda: Anomura)

Structural and ultrastructural characterization of the spermatozoon of *Emerita analoga* (Stimpson, 1857) (Decapoda: Anomura)

Humberto Cerisola y Edith Méndez

Instituto de Biología, Universidad Católica de Valparaíso, Casilla 4059, Valparaíso, Chile.
Hcerisol@aix.ucv.cl

Abstract.- The ultrastructure of spermatozoon of *Emerita analoga* was examined. The animals were collected on the beach at Playa Negra, Valparaíso, Chile. Spermatozoa were obtained dissecting the spermatophore from living animals and then processed for light microscopy and for transmission and scanning electron microscopy. Fluorochrome staining for DNA visualization was also utilized to evidence the nuclear region. The sperm is approximately 15 μm in length. Two parts can be distinguished: A) a large and cylindrical acrosome located anteriorly and, B) the cytoplasm and the nuclear region. The acrosome has an operculum with characteristic features. The contents of the acrosome is heterogeneous and is composed of the following layers: acrosome membrane, acrosome capsule, external acrosomic material, inner acrosomic material and the sub-acrosomal material. The cytoplasm is reduced and occurs between the acrosome and the nucleus; it contains irregular mitochondria and microtubules. The arms, 9 to 10 in number and approximately 34 μm in length each, are extensions from the cytoplasm.

Keywords : Crustacea, Decapoda, Anomura, spermatozoon, ultrastructure, Chile.

Resumen.- El presente trabajo describe la estructura fina del espermatozoide de *Emerita analoga*. Los animales fueron recolectados en la zona intermareal de Playa Negra, Valparaíso, Chile. Los espermatozoides se obtuvieron por disección del espermátforo de organismos vivos y se procesaron para microscopía de luz, microscopía electrónica de transmisión y de barrido. También se utilizó la tinción de fluorocromo para visualizar el ADN y evidenciar la región nuclear. El espermatozoide mide aproximadamente 15 μm de longitud. Su morfología muestra dos regiones principales: A) Una región anterior que corresponde a un acrosoma grande y cilíndrico y B) una región posterior que contiene el citoplasma y el núcleo. La parte apical del acrosoma muestra una región opercular muy destacada y con una morfología característica. El contenido del acrosoma es heterogéneo y las estructuras que forman su pared son las siguientes: membrana acrosómica, cápsula acrosómica, material acrosomal externo, material acrosomal interno y el material subacrosomal. La región del citoplasma es reducida, se presenta entre el acrosoma y el núcleo; contiene mitocondrias irregulares y microtúbulos. Del citoplasma se extienden 9 a 10 brazos con estructura microtubular y con una longitud aproximada de 34 μm . Una envoltura nuclear limita el núcleo del citoplasma.

Palabras clave: Crustacea, Decapoda, Anomura, espermatozoide, ultraestructura, Chile.

Introducción

En un trabajo anterior se ha descrito la organización histológica del testículo y la estructura del espermátforo en *Emerita analoga*, mencionando que el tubo espermátforico contiene en su interior a los espermatozoides incluidos en una matriz primaria (González & Cerisola 1997) pero no se informa respecto a la estructura del espermatozoide en esta especie. El espermatozoide de *Emerita analoga* fue descrito primeramente por Vaughn *et al.* (1969) en forma breve con la finalidad de estudiar una posible relación de las proteínas básicas entre el núcleo y el citoplasma. Diversos estudios realizados posteriormente en

crustáceos decápodos a nivel de microscopía electrónica (Langreth 1969, Talbot & Chanmanon 1980a, Dupré & Barros 1983, Jamieson & Tudge 1990, Tudge & Jamieson 1991, Hinsh 1991, Tudge 1992, Jamieson *et al.* 1993, Lorham & Raineri 1995) nos indican que la organización de los espermatozoides en las diferentes sub-clases presentan una variación que es de interés considerarlas. El propósito del presente estudio es conocer la morfología del espermatozoide de *Emerita analoga* por medio de la microscopía de luz y electrónica.

Materiales y Métodos

Machos sexualmente maduros del cangrejo de arena *Emerita analoga* fueron recolectados en la zona intermareal de la localidad de Playa Negra, Valparaíso, Chile. Para la observación con microscopía de luz se procedió a remover el testículo de ejemplares vivos y seccionar la región distal del conducto deferente; luego se extrajo el espermatóforo y se puso en un portaobjeto excavado con agua de mar filtrada. Después de romper el espermatóforo se extrajeron los espermatozoides para su posterior observación en un microscopio de luz con un condensador de campo claro o de contraste de fases, manteniéndolos en agua de mar filtrada. Para la tinción con reactivo de Schiff (PAS) según el método de Spannhof (1966) se vierte una gota de espermatozoides en un portaobjetos, se hace un frotis y se fijan en formalina 10% en agua de mar.

Con otra muestra de espermatozoides se realizó una tinción vital para marcar el ADN con fluorocromo de Hoechst 3342 (Sigma Chemical Co., St. Louis) acorde a los procedimientos descritos por Reyes *et al.* (1997). La observación y las microfotografías se realizaron en un microscopio Nikon Diaphot con epifluorescencia.

El procedimiento utilizado para microscopía electrónica de transmisión (TEM) fue el siguiente: fijación con glutaraldehído 3% en agua de mar filtrada por 3 horas a 4°C, lavado en agua de mar y centrifugación suave. Se continuó con una postfijación en tetróxido de osmio 1% en agua de mar a temperatura ambiente por 1 hora. Deshidratación en alcoholes de gradación creciente hasta acetona e inclusión en resina hipóxica Medcast. Los cortes ultrafinos se tiñeron con acetato de uranilo 2% y citrato de plomo 2% y se examinaron en un microscopio electrónico Zeiss EM-900.

El procedimiento para microscopía electrónica de barrido fue el siguiente: obtención de los espermatozoides en agua de mar filtrada y rápidamente se procedió a fijarlos en glutaraldehído 3% en buffer fosfato por 1 hora a 4 °C, postfijarlos en tetróxido de osmio 1% y deshidratarlos en alcohol y acetona. Posteriormente se secaron al punto crítico con CO₂, se montaron en porta-especímenes y cubrieron con una capa de oro de 20 nm, mediante ionizador. Las observaciones fueron hechas en un microscopio electrónico de barrido Nanolab 2000 y Leo 420.

Resultados

El espermatozoide de *Emerita analoga* es alargado en su forma y está compuesto por dos regiones principales:

A) Una región anterior que corresponde al acrosoma y, B) una región posterior que contiene el citoplasma, el núcleo y los brazos (Figs. 1 y 2). Ambas regiones tienen

una longitud de 14 a 16 μm sin considerar las extensiones citoplásmicas o brazos.

El acrosoma se encuentra en la parte anterior del espermatozoide, tiene una forma cilíndrica y mide 8-9 μm de longitud y un diámetro de 2,66 μm (Figs. 1 y 2). En su parte apical se presenta la región opercular que muestra una depresión en su parte central y proyecciones digitiformes periféricas formando una estructura a manera de corona (Fig. 3).

En general, el contenido de todo el acrosoma se presenta heterogéneo al corte ultrafino (Figs. 4 y 5); las estructuras que se observan desde el exterior hacia el interior son las siguientes: membrana acrosómica, cápsula acrosómica, material acrosomal externo, material acrosomal interno y el material subacrosomal (Fig. 5). La membrana acrosómica cubre toda la superficie del acrosoma. La pared del opérculo está formada por un material electrodensito que es homogéneo cuando se cercana a los bordes superiores pero se disgrega hacia la región inferior en un material de menor electrodensidad (Fig. 4). Debajo de la membrana acrosómica se presenta una capa delgada de material moderadamente electrodensito denominada cápsula acrosómica (Fig. 4).

El material acrosómico externo forma la mayor parte de la estructura del acrosoma y se extiende desde la región sub-opercular hasta la región basal (Fig. 5). Superficialmente está relacionado con la cápsula acrosómica y, medialmente, con el material acrosómico interno. Ultraestructuralmente presenta una electrodensidad moderada y, al microscopio de luz, da una reacción positiva con el reactivo de Schiff (PAS) que detecta la presencia de polisacáridos.

El material acrosómico interno se distribuye en el eje central del acrosoma, extendiéndose desde la región sub-opercular hasta la región basal (Fig. 5). Los cortes ultrafinos sagitales muestran en su parte media y anterior un contenido homogéneo de mayor electrodensidad que el descrito para el material acrosómico externo. Hacia la parte posterior, el material acrosómico interno se prolonga en forma de láminas que bajan longitudinalmente hasta la base acrosómica. Estas láminas generalmente contactan en el centro y forman compartimentos desiguales, pudiéndose ver hasta 9 divisiones en un corte transversal (Fig. 6). El material inter-laminar es de muy baja electrodensidad, denominándolo como material sub-acrosomal (Figs. 2, 5 y 6). En cortes longitudinales el material sub-acrosomal en su parte inferior llega a contactar con el citoplasma (Figs. 2, 7 y 8).

En la región posterior del espermatozoide se presenta un área citoplásmica reducida que se dispone alrededor de la base del acrosoma y por encima del

núcleo (Fig. 7). En el citoplasma se observan mitocondrias, algunas intactas y otras en degeneración, de diferentes tamaños y cercanas a manojos de microtúbulos. En cortes longitudinales y transversales se observa la pared cilíndrica de los microtúbulos (Figs. 7, 8 y 10). Las extensiones citoplásmicas, con estructuras microtubulares forman los brazos, los cuales tienen una longitud aproximada de 34 μm y se cuentan en un número aproximado de 9-10, siendo negativos a la fluorescencia.

Mediante la tinción vital con fluorocromo para ADN y la microscopía de fluorescencia se identificó el

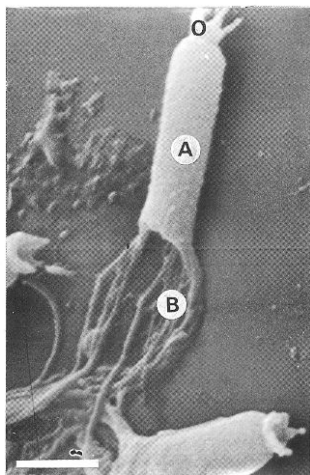


Figura 1

Espermatozoide de *Emerita analoga*. Microscopía electrónica de barrido. A, acrosoma. O, opérculo. B, brazos. Barra = 4,26 μm .

Scanning electron view of the spermatozoon of *Emerita analoga*. O, operculum. B, arms. Scale bar = 4.26 μm .

material nuclear en la región posterior del espermatozoide (Fig. 9). Con MET se observa una envoltura nuclear que se presenta discontinua ocasionalmente al contactar con el citoplasma (Figs. 2 y 7). El contenido del núcleo está formado por un material granular fino y de baja electrodensidad. Todo el material nuclear está delimitado hacia los lados por una membrana doble constituida por la envoltura nuclear y la membrana celular del espermatozoide, denominada membrana nucleoplásmica (Fig. 10). Hacia el exterior, esta última presenta invaginaciones o surcos que están ocupados generalmente por los brazos (Fig. 10).

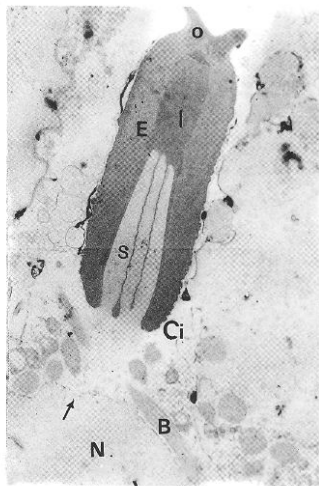


Figura 2

Corte longitudinal del espermatozoide. Microscopía electrónica de transmisión. O, opérculo. E, material acrosómico externo. I, material acrosómico interno. S, material subacrosomal. Ci, citoplasma. N, núcleo. Flecha, envoltura nuclear. B, brazo. X 8.400.

Transmission electron microscopy (TEM) view of spermatozoon in longitudinal section. O, operculum. E, outer acrosomal material. I, inner acrosomal material. S, subacrosomal material. Ci, cytoplasm. N, nucleus. Arrow, nuclear envelope. B, arm. X 8.400.

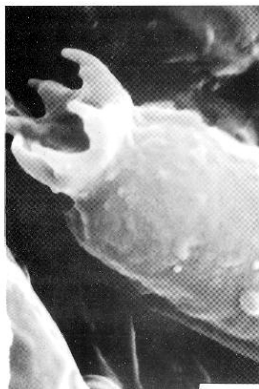


Figura 3

Región opercular. Microscopía electrónica de barrido.

Barra = 1 μ m.

Scanning electron microscope view of the operculum.

Scale bar = 1 μ m.

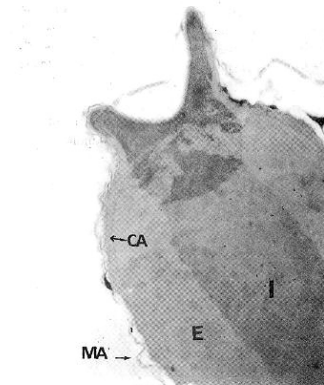


Figura 4

Región apical del acrosoma. Microscopía electrónica de transmisión. I, Material acrosómico interno. CA, cápsula acrosómica. MA membrana acrosómica. E, material acrosómico externo. X 23.800.

TEM view of the apical region of the operculum. I, inner acrosomal material. CA, acrosomal capsule. MA, acrosomal membrane. E, outer acrosomal material. X 23.800.

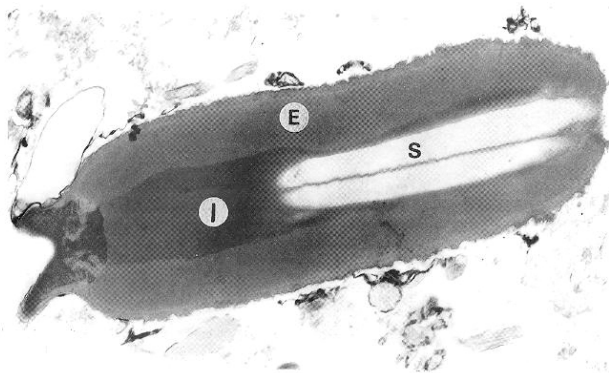


Figura 5

Corte longitudinal del acrosoma. E, material acrosómico externo. I, material acrosómico interno. S, material subacrosomal. X 14.800.

The acrosome in longitudinal section. E, outer acrosomal material. I, inner acrosomal material. S, subacrosomal material. 14.800.

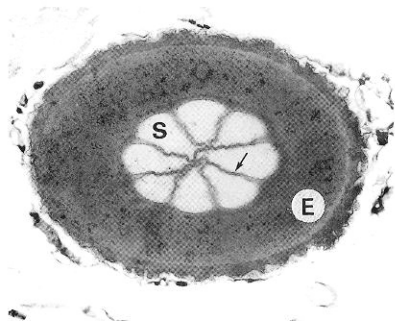


Figura 6

Corte transversal del acrosoma en su parte media. E, material acrosómico externo. S, material subacrosomal. La flecha indica extensión laminar del material acrosómico interno. X 15,360.

Transversal section of the middle region of the acrosome. E, outer acrosomal material. S, subacrosomal material. Note the laminar extension of the inner acrosomal material (arrow). X 15,360.

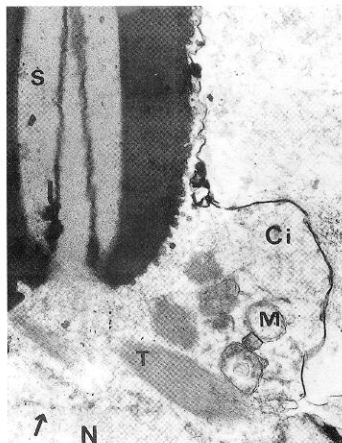


Figura 7

Corte longitudinal de la región basal del acrosoma. S, material subacrosomal. Ci, citoplasma. T, manojos de microtúbulos. M, mitocondrias en degeneración. N, núcleo. Flecha, envoltura nuclear. X 15,600.

Acrosome base in longitudinally section. S, subacrosomal material. Ci, cytoplasm. T, microtubules bunches. M, degenerated mitochondria. N, nucleus. Note the nuclear envelope (arrow). X 15,600.

Discusión

La forma cilíndrica del acrosoma es comparable a lo descrito en espermatozoides de *Emerita talpoida*¹, *Coenobita spinosus* (Tudge & Jamieson 1991), *Pleuroncodes planipes* (Hinsch 1991) y *Homarus americanus* (Talbot & Chanmanon 1980a). En el presente estudio se describe en el extremo anterior del acrosoma un opérculo con varios levantamientos o prominencias que constituyen una característica del espermatozoide de *Emerita analoga*. Esta misma región del acrosoma, aunque con otra morfología, ha recibido otras denominaciones por otros autores, es así como también se llama cápsula apical (Talbot & Chanmanon 1980a) o región opercular (Tudge 1992) y que estaría involucrada en el proceso de fecundación. Los cortes

ultrafinos mostraron la presencia de una cápsula acrosómica por debajo de la membrana acrosómica, estimándose que sería una región periférica del material acrosómico externo con distinta electrodensidad y que probablemente tendría importancia en el proceso de la fecundación. En cuanto a la descripción realizada del material externo e interno de la pared acrosomal, nos ha indicado que es semejante a lo descrito para el espermatozoide de *Homarus americanus* (Talbot & Chanmanon 1980a) o el de *Coenobita spinosus* (Tudge 1992), con la diferencia que el material acrosómico interno muestra desde la parte media hacia la parte posterior, la presencia de proyecciones a manera de láminas que delimitan áreas que contienen el material sub-acrosomal, característica que no ha sido descrita en los espermatozoides de otros crustáceos Anomura. Esta última región corresponde a lo que Tudge (1992) denomina columna perforatorial. El material acrosómico externo muestra una reacción positiva con el reactivo de

¹ Barker, KR & Austin, CR. 1963 Sperm morphology of *Emerita talpoida*. Biological Bulletin 125: 361-362 (Abstract).

Schiff (PAS), indicando la presencia de polisacáridos, hecho que concuerda con lo descrito por Talbot & Chanmanon (1980a) en el espermatozoide de *Homarus americanus* y con lo descrito por Langreth (1969) en el espermatozoide de *Cancer borealis*. Este último autor comenta que cuando la reacción de PAS positiva es intensa, también nos indica un mayor grado de diferenciación y maduración del acrosoma.

En una revisión de los estudios realizados por Talbot & Chanmanon (1980b) en *Homarus americanus*, se describe la vesícula acrosomal durante la reacción acrosómica, indicando que el contenido de ella forma una nueva capa en el exterior del acrosoma del espermatozoide, permitiendo de esta manera la eyeción del material subacrosomal y del núcleo hacia la región

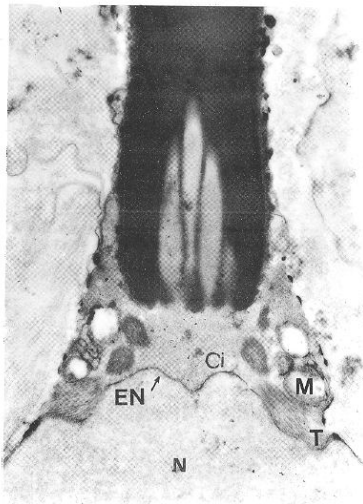


Figura 8

Corte longitudinal a nivel de la región posterior del espermatozoide. Ci, citoplasma. M, mitocondria en degeneración. T, manojos de microtúbulos. N, núcleo. EN, envoltura nuclear. X 14,800.

Longitudinal section of the posterior region of the spermatozoon. Ci, cytoplasm. M, degenerated mitochondria. T, microtubules bunches. N, nucleus. EN, nuclear envelope. X 14,800.

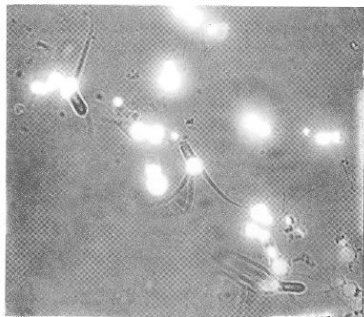


Figura 9

Espermatozoides tratados con el fluorocromo de Hoechst 33258. La fluorescencia está restringida a la región nuclear. X 1,400.

Spermatozoa treated with the fluorochrome Hoechst 33258. Note that the fluorescence is restricted to the nuclear region. X 1,400.

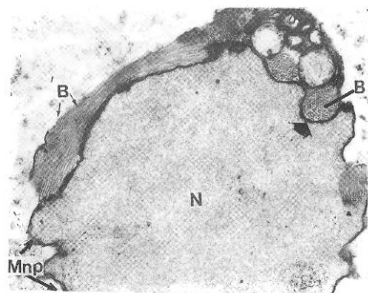


Figura 10

Corte transversal del espermatozoide a nivel de la región nuclear anterior. N, núcleo. Mnp, membrana nucleoplásmica. Cabeza de flecha, surco. B, brazos. X 30,000.

Nuclear region of the spermatozoon in transverse section. N, nucleus. Mnp, nucleo-plasma membrane. Note the grooves (arrowhead) where the arms (B) are placed. X 30,000.

anterior. No conocemos el mecanismo de la reacción acrosómica en el espermatozoide de *Emerita analoga*, lo que será tema de otro trabajo. Probablemente el material acrosómico interno se evierte al exterior, pero desconocemos los cambios que pueden ocurrir a nivel de las estructuras laminares y del material subacrosomal. Respecto a esto último, algunos autores han descrito en la cámara perforatoria la presencia de túbulos del perforatorio en *Neodoriippe astuta* y en *Portunus pelagicus* (Jamieson & Tudge 1990) o la presencia de microvellosidades en el espermatozoide de *Coenobita spinosus* (Tudge 1992), en formaciones que tienen otras características estructurales y se sabe que no interfieren en el pasaje del material subacrosomal durante la reacción acrosómica.

Talbot & Chanmanon (1980a) describen el material subacrosomal en el espermatozoide de *Homarus americanus* en una "fosa" localizada en la base del acrosoma y que después se continuaba con la cromatina del núcleo. En los espermatozoides revisados de *Emerita analoga* el material subacrosomal se dispersa en el citoplasma, sin contactar con el material nuclear.

El origen de los brazos es muy variable, según la especie considerada (Pochon-Masson 1983), teniendo en algunas un origen nuclear y, en otras, un origen citoplásmico. En el espermatozoide de *Emerita analoga*, hemos visto que son largos y se originan de la región citoplásmica, en donde se encuentran las bases de los cordones de microtúbulos. La ultraestructura es semejante a lo descrito para el espermatozoide de *Birgus latro* (Tudge & Jamieson 1991) y de *Coenobita spinosus* (Tudge 1992), ambos de la familia Coenobitidae, como también a lo descrito para el espermatozoide de *Cervimunida johni* de la familia Galatheididae (Lohrman & Raineri 1995), sin embargo éstos presentan en general un número de 3 brazos, en tanto que en *Emerita analoga* es de 9 a 10.

Barker & Austin (1963) en *Emerita talpoida* mencionan 3 a 9 filamentos largos en los cuales no se detecta material nuclear utilizando la tinción de Feulgen. La ausencia de material nuclear en los brazos del espermatozoide de *Emerita analoga* lo indica la tinción específica con fluorocromo Hoechst 3342 para ADN. Esta característica fue corroborada a nivel de microscopía electrónica, en que se observó la presencia de una envoltura nuclear contactando con el citoplasma y sin proyectarse hacia los brazos. En varios decápodos, el ADN se encuentra en todo el largo de los brazos, como en el cangrejo *Procambrus clarkii* (Moses 1961), en *Neodoriippe astuta* (Jamieson & Tudge 1990) o en *Calocarcinus africanus* (Jamieson et al. 1993), todos de la Sección Brachyura, pero los espermatozoides de las especies mencionadas tienen brazos muy cortos, lo cual

contrasta con los espermatozoides de brazos largos que no presentan ADN.

La membrana celular del espermatozoide a nivel del citoplasma se presenta engrosada debido a la unión con la envoltura nuclear, hecho que concuerda con lo descrito por Tudge & Jamieson (1991) en *Birgus latro* y que denominan membrana nucleoplásmica. En el citoplasma del espermatozoide de *Emerita analoga* se observó mitocondrias intactas y otras en degeneración, lo cual coincide con lo descrito para braquiuros (Pearson & Walker 1975) y se sugiere que la función mitocondrial es reemplazada por un sistema de membranas.

Aunque se sabe que los microtúbulos de los brazos sirven probablemente de soportes estructurales (Talbot & Chanmanon 1980a, Hirsch 1991), la comprensión de la función de los brazos aún no está aclarada. El presente estudio se refiere únicamente al análisis estructural y ultraestructural del espermatozoide de *Emerita analoga* como un antecedente para una investigación futura que trate los mecanismos de la fecundación en esta especie.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Profesor Eduardo Couve, de la Universidad de Valparaíso, por las facilidades otorgadas para la utilización del microscopio electrónico de transmisión y al Sr. Fidel Vargas por su ayuda en los cortes ultrafinos. También queremos agradecer al Profesor Orlando Garrido de la Universidad Austral, por su colaboración en la microscopía electrónica de barrido.

Literatura Citada

- Dupré E & C Barros. 1983. Fine structure of spermatozoon of *Rhynchocinetes typus*, Crustacea, Decapoda. Gamete Research : 1-18.
- González M & H Cerisola. 1997. Descripción histológica del aparato reproductor masculino y formación del espermátforo en *Emerita analoga* (Stimpson, 1857) (Decapoda: Anomura). Revista de Biología Marina y Oceanografía 32: 215-225.
- Hirsch GW 1991. Ultrastructure of the sperm and spermatophores of the anomuran crab *Pleuroncodes planipes*. Journal of Crustacean Biology 11: 17-22.
- Jamieson BGM & CC Tudge. 1990. Dorippids are Heterotrema: evidence from ultrastructure of the spermatozoa of *Neodoriippe astuta* (Dorippidae) and *Portunus pelagicus* (Portunidae) Brachyura: Decapoda. Marine Biology 106: 347-354.
- Jamieson BGM, D Guinot & B Richer de Forges. 1993. The spermatozoa of *Calocarcinus africanus* (Heterotrema, Brachyura, Crustacea) : ultrastructural synapomorphies with xantid sperm. Invertebrate Reproduction and Development 24 : 189-196.

- Langreth SG. 1969.** Spermiogenesis in cancer crabs. The Journal of Cell Biology 43: 575-602.
- Lohrman K & M Raineri. 1995.** Ultrastructure of the spermatozoon of the crab *Cervimunida johni* Porter 1983 (Galatheidae, Anomura, Crustacea). Invertebrate Reproduction and Development 28: 71-76.
- Moses MJ 1961.** Spermiogenesis in the crayfish *Procambarus clarkii*. I. Structural characterization of the mature sperm. Journal of Biophysical and Biochemical Cytology 9: 222-228.
- Pearson PJ & MH Walker. 1975.** Alteration of cytochrome c oxidase activity during spermiogenesis in *Carcinus maenas*. Cell and Tissue Research 164: 401-410.
- Pochon-Masson J. 1983.** Arthropoda-Crustacea: The spermatozoa: En: Adiyodi KG & RG (eds), Reproductive Biology of Invertebrates II: 407-447. John Wiley & Sons Ltd.
- Reyes JG, A Díaz, N Osses, C Opazo & DJ Benos. 1997.** On stage single cell identification of rat spermatogenic cells. Biology of the Cell 89: 53-66.
- Spannhof L. 1966.** Histoquímica Práctica. Editorial Acriba, España, 195 p.
- Talbot P & Chanmanon P. 1980a.** The structure of sperm from the lobster *Homarus americanus*. Journal of Ultrastructure Research 70: 275-286.
- Talbot P & P Chanmanon. 1980b.** Morphological features of the acrosome reaction of lobster (*Homarus*) sperm and the role of the reaction in generating forward sperm movement. Journal of Ultrastructure Research 70: 287-297.
- Tudge CC & BGM Jamieson. 1991.** Ultrastructure of the mature spermatozoon of the coconut crab *Birgus latro* (Coenobitidae: Paguroidea: Decapoda). Marine Biology 108: 395-402.
- Tudge CC. 1992.** Comparative ultrastructure of hermit crab spermatozoa (Decapoda: Anomura: Paguroidea). Journal of Crustacean Biology 12: 397-409.
- Vaughn JC, J Chaitoff, R Deleos, C Garland & L Thompson. 1969.** Changing nuclear histone pattern during development. II. Isolation and partial characterization of "Decapodine" from sperm cells of the crab *Emerita analoga*. Experimental Cell Research 54: 362-366.