

ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DEL FAGOCITO TESTICULAR DE *Dina lineata* (Hirudinea, Erpobdellidae)

S. Bonet, M. Molinas

Departamento de Biología Celular y Fisiología. Col·legi Universitari de Girona. C/ Hospital, 6. GIRONA.

RESUM

En aquest treball es fa una descripció de l'estructura i ultraestructura de l'amebòcit mononuclear dels hirudínids erpobdèl·lids i la seva relació amb l'evolució de les cèl·lules germinals masculines. Per això s'estudien els fagòcits lliures en la cavitat testicular de *Dina lineata* (O.F. Müller, 1774).

Aquestes cèl·lules presenten un nucli oval i bilobular, emeten nombroses microvel·lositats i pseudópodes, i tenen un citoplasma activament inmers en l'activitat fagocitària. A l'interior de les vacuoles hereofàgiques hom pot apreciar espermatogònies, espermatides i restes del citòfor en diversos estadis de digestió.

RESUMEN

En este trabajo se realiza una descripción estructural y ultraestructural del fagocito mononuclear del hirudíneo erpobdélido *Dina lineata* (O.F. Müller, 1774).

Se trata de células con un núcleo oval y bilobulado, y con un citoplasma activamente inmerso en la actividad fagocitaria. Emiten microvellosidades y pseudópodos que pueden recoger desde restos del citóforo a polioplastos enteros ya sea con espermatogonias, ya sea con espermátidas maduras.

ABSTRACT

The presence of phagocytes inside the sperm sacs of *Dina lineata* (Hirudinea, Erpobdellidae) is verified and the role of this wandering phagocyte is examined.

The free phagocyte is a cell with numerous vesicles and pseudopods, a bilobulate nucleus and a cytoplasm actively immersed in phagocytosis. Inside the phagocytic vacuola spermatogonia and spermatozoons can be seen. This engulfed cells don't present seeming anomalies.

Key words: Hirudinea, Macrophage, Phagocyte, Spermatogenesis.

INTRODUCCION

Exceptuando la síntesis de anticuerpos todas las reacciones inmunológicas celulares o humorales estan presentes, aunque a veces de forma atenuada,

en los invertebrados. Fenómenos como reconocimiento, fagocitosis, encapsulación e incluso memoria inmunológica manifestada a través del rechazo, se dan en mayor o menor grado en toda la escala zoológica.

El sistema inmunitario se desarrolla para preservar la identidad del individuo, sea frente a invasores extraños o a elementos alterados del propio organismo. La presencia de células especializadas en reconocimiento y fagocitosis —macrófagos, granulocitos— se mantiene en todos los niveles de la escala zoológica, incluso en los vertebrados donde se alcanza el máximo grado de sofisticación inmunológica. Ello demuestra su importancia y el carácter básico de la función que dicha célula fagocitaria tiene encomendada. (Volkman, 1984).

El macrófago, derivado según Cooper (1974) de una célula inmunológica ancestral, presenta una gran heterogeneidad morfológica (monocito, macrófago libre, macrófago sedentario, células de Kupffer, etc...) pero, a pesar de ello, su alto grado de especialización funcional le determina unos caracteres propios que permiten su identificación como célula.

En el trabajo que presentamos a continuación describimos el amebocito mononuclear de los hirudínicos erpobdélidos y su relación con el proceso de espermatogénesis y espermiogénesis. Para ello hemos estudiado las características y la función de los fagocitos libres en los sacos testiculares de *Dina lineata* en distintas fases del proceso de maduración sexual.

MATERIAL Y MÉTODO

Dina lineata es una sanguijuela dulceacuícola muy común en los ríos y riachuelos de nuestra Península. Los ejemplares utilizados en este estudio fueron recogidos en la provincia de Gerona.

Las preparaciones para la microscopía óptica se realizaron fijando las muestras en formalina comercial al 10 % en tampón fosfato de Sörensen pH 7,4, incluyendo en glicol metacrilato (GMA) y coloreando los cortes según las técnicas descritas por los autores Bonet y Molinas (1983), y Bonet y Huguet (1985).

Para su observación al microscopio electrónico las muestras se fijaron en líquido de Karnovsky, se postfijaron con tetraóxido de osmio, se lavaron en tampón fosfato 0,2 M pH 7,4 y se incluyeron en resina Spurr. Los cortes obtenidos y contrastados del modo habitual —Reynolds/Acetato de uranilo— fueron observados con un Hitachi HU 12A del Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad Autónoma de Barcelona.

OBSERVACIONES

Fagocitos de los sacos testiculares

En las sanguijuelas la espermatogénesis se realiza en el interior de sacos celómicos diseminados en el parénquima y unidos, a través de estrechos

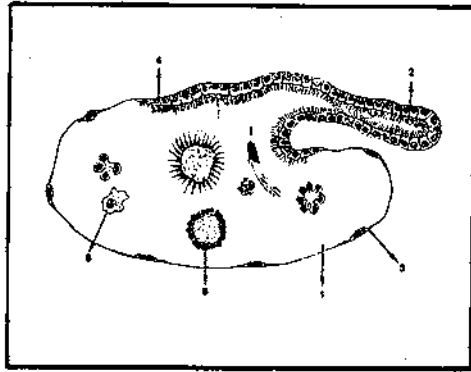


Figura 1. Esquema en el que se muestran los elementos que se presentan en un corte histológico de un saco testicular: 1, Saco testicular. 2, Conducto eferente. 3, Mesotelio pavimentoso. 4, Mesotelio cúbico-ciliado. 5, Fagocito. 6, Poliplasto germinal.

canales eferentes, a un canal deferente común. (Fig. 1). En su interior las espermatogonias se dividen de modo sincitial originando poliplastos con las espermátidas unidas por un débil pedúnculo a un cuerpo central común, el citóforo (Fig. 2).

La espermiogénesis origina un espermatozoide filamentosamente helicoidal formado por cuatro regiones: acrosómica, nuclear, mito-

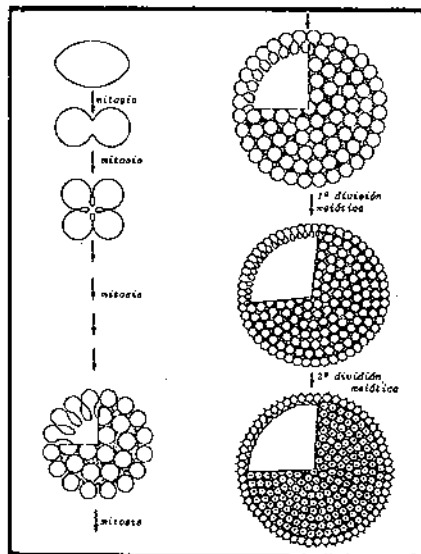


Figura 2. Esquema que ilustra el proceso espermatogénico seguido por una espermatogonia primitiva en el interior de un saco testicular hasta llegar a formar un poliplasto integrado por 512 espermátidas.

condrial y axonemática. Este proceso ha sido descrito por Bonet (1986). En la formación del espermatozoide los residuos citoplasmáticos que no formaran parte de la célula germinal madura son eliminados mediante una pequeña expansión citoplasmática que se expulsa hacia la luz del saco testicular. Una vez la espermiogénesis se ha completado, el citóforo queda libre e inicia un proceso de degeneración.

Durante todo el período de actividad testicular se puede observar la presencia, en el interior de los sacos, de fagocitos libres y activos cuya proporción se mantiene constante aunque varíe el predominio de las distintas etapas de maduración germinal. La observación de cortes histológicos permite localizar la presencia de estos fagocitos. Su aspecto es parecido al de un monocito, núcleo oval y poco denso, y citoplasma débilmente eosinófilo.

Morfología del fagocito testicular

La observación al microscopio electrónico permite reconocer los detalles estructurales propios del macrófago: abundancia de microvellosidades y pseudópodos, núcleo bilobulado muy característico, y un citoplasma activamente inmerso en la actividad heterofágica (Figs. 3 y 4).

El núcleo, generalmente excéntrico, presenta una profunda escotadura que lo divide en dos lóbulos desiguales de 2,5 y 1,5 micrómetros de diámetro transverso respectivamente. En el interior de la escotadura, profunda y estrecha, se alojan fragmentos de retículo y, en su base, es muy característica la presencia de una mitocondria bacilar-filamentosa de unos

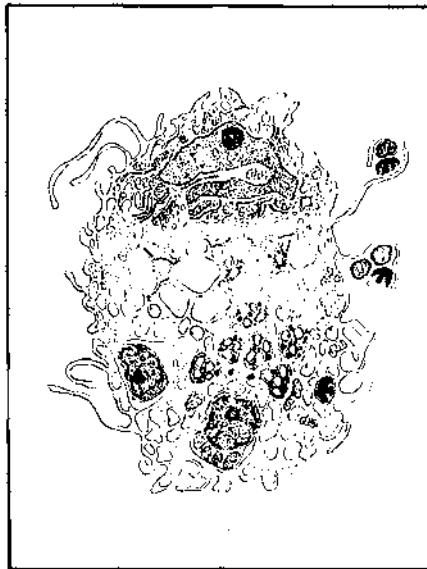


Figura 3. Dibujo esquemático de un fagocito testicular.

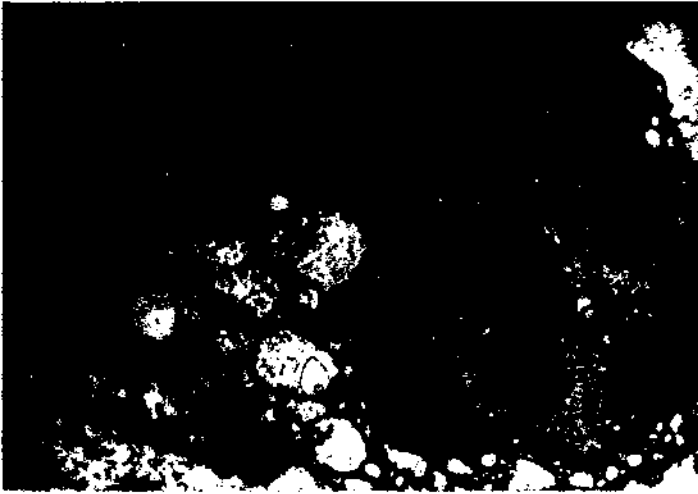


Figura 4. Fagocito testicular. Obsérvese su característica morfología nuclear y la vesiculización de su citoplasma. 7.200 \times .

0,5 micrómetros de diámetro. La heterocromatina es poco abundante, de distribución perinuclear y con granos finos dispersos en el interior. La eucromatina es finamente granular. El nucleolo, muy visible, se caracteriza por un nucleolonema muy denso y sin parte amorfa. La envoltura nuclear bilaminada tiene escasos nucleoporos (Fig. 5).

El citoplasma está bien desarrollado. Se puede encontrar retículo endoplasmático relativamente abundante, especialmente rugoso, y también

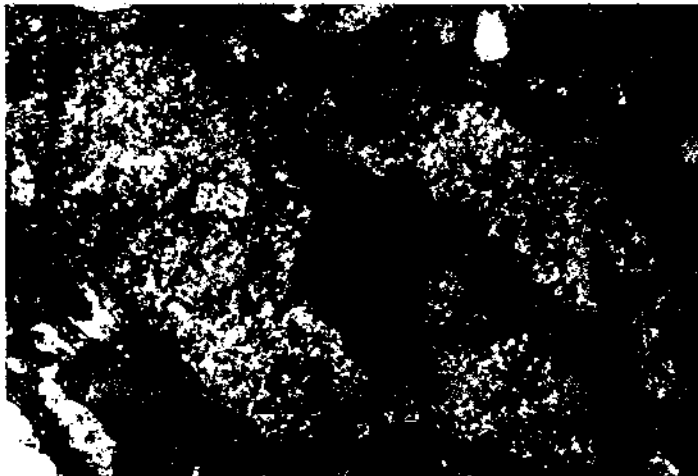


Figura 5. Sección longitudinal del núcleo de un fagocito testicular. Obsérvese su lobulización diferencial y el aspecto finamente granular de la cromatina. 18.000 \times .

ribosomas libres. El complejo de Golgi está presente con varias unidades dictiosómicas. Mitocondrias abundantes, distribuidas homogéneamente, de forma bacilar y con un número moderado de crestas.

El resto de la célula está ocupado por gran cantidad de vesículas heterogéneas relacionadas con las distintas etapas de la digestión heterofágica. Vesículas pequeñas, redondas o elípticas, de contenido relativamente homogéneo se identifican como lisosomas primarios procedentes de las

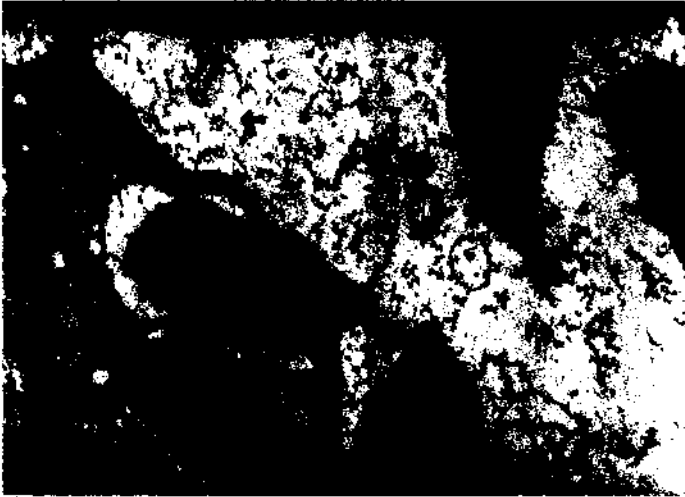


Figura 6. Cuerpos celulares de espermatogonias encerrados en vacuolas fagocíticas. 10.000 \times .

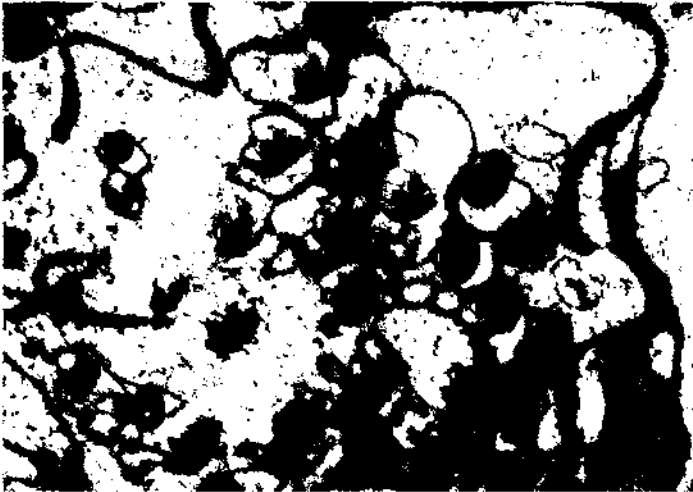


Figura 7. Espermatozoides englobados por finísimas láminas pseudopodiales emitidas por los fagocitos. Obsérvese, en sección transversal, las regiones nuclear y mitocondrial de los espermatozoides. 20.000 \times .

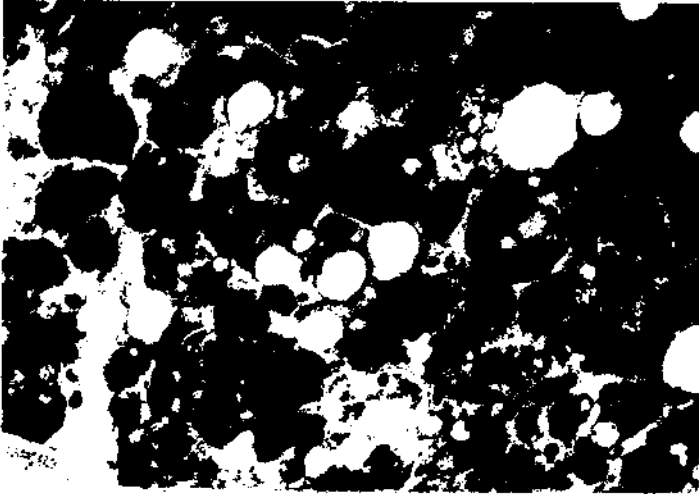


Figura 8. Citoplasma cargado de cuerpos residuales en un fagocito maduro. 9.600 x.

cisternas de Golgi; y vesículas polimorfas y heterogéneas que son lisosomas secundarios, vacuolas heterofágicas o cuerpos residuales mielínicos o amorfos. En el interior de las vacuolas fagocíticas se pueden ver células germinales en distintas etapas del proceso de maduración (Figs. 6 y 7) y restos aún identificables del citóforo (Fig. 4). Las células que engloba un fagocito están en el mismo estadio pues, tal y como puede apreciarse en cortes histológicos, se fagocitan polioplastos o grupos isogénicos de espermatozoides. No se ha podido verificar la presencia de anomalías morfológicas en los productos fagocitados.

A medida que avanza el proceso de digestión heterofágica aumenta la cantidad de vesículas relacionadas con la digestión. El número de lisosomas primarios disminuye mientras aumenta el de los cuerpos residuales, especialmente los de tipo amorfo con dos gránulos claros en su interior (Fig. 8).

En muy pocas células fagocíticas pueden apreciarse dos núcleos que mantienen las características morfológicas descritas. Estas células son algo mayores y, probablemente, se originan a partir de la coalescencia de dos mononucleadas. (Fig. 9).

DISCUSIÓN

En esta familia de hirudínidos erpobdélidos la fecundación se realiza por vía hipodérmica mediante la inyección de espermátóforos. Los fagocitos tisulares se encargan de eliminar a los espermatozoides en exceso en el parénquima corporal o en las cavidades celómicas.



Figura 9. Fagocito testicular en el que se observan dos núcleos 4.800 x.

La presencia de fagocitos libres y activos en los sacos testiculares ha sido citado por varios autores en los oligoquetos y parece un fenómeno común en los anélidos. El papel de estas células está en discusión ya que si bien en algunos casos, como el de *Sparganophilus tamesis* estudiado por Richards et al (1981), se pueden observar grandes aberraciones morfológicas en las células germinales fagocitadas, en otros, como en el caso de *Limnodrillus* estudiado por Block et al (1981) o en el que nosotros estudiamos, esto no es posible.

Al parecer el papel primario que se puede atribuir a la presencia abundante de macrófagos testiculares es de destrucción de los residuos celulares y de los restos del citóforo. De hecho esta función se mantiene en los vertebrados y es llevada a cabo por las células de Sertoli. Parece obvio que la destrucción de las enzimas, ahora inservibles, debe ser favorable para la protección de los espermatozoides producidos.

Aunque no puede descartarse la fagocitosis de espermatozoides normales, lo más probable es que los productos fagocitados sean defectuosos aunque la longitud de esta célula dificulte la comprobación o que se trate de defectos fisiológicos no detectables morfológicamente. Como tales son reconocidos y fagocitados actuando de mecanismo protector de la especie al eliminar a los portadores de anomalías que de otro modo habrían competido con los espermatozoides normales.

Bibliografía

- BLOCK, E.M., MATHEWS, J. and GOODNIGHT, Cl. V. 1981. Spermiogenesis in *Limnodrillus hoffmeisteri* (Oligochaeta, Tubificidae): the role of phagocytes in the sperm sac. *Int. J. Inv. Pathol.* 42: 8-19.

- BONET, S. i MOLINAS, M. 1983. Utilitat del glicol metacrilat (GMA) en l'obtenció de seccions semifines en histologia. *Ann. Sec. Cien. Col. Univ. Girona (UAB)*. 9: 21-29.
- BONET, S. i MOLINAS, M. Tècniques habituals de coloració de seccions semifines de material inclòs en glicol metacrilat. *Scientia gerund. 10* (en premsa).
- BONET, S. and MOLINAS, M. Testicular spermatozoa and male germ cells evolution in *Dina lineata* (O.F. Müller, 1774) (Hirudinea, Erpobdellidae) studied by scanning electron microscopy. *Bull. Inst. Cat. Hist. Nat.* (en premsa).
- COOPER, E.L. 1974. Phylogeny of leukocytes earthworm coelomocytes in vitro and in vivo. A: Lindhall, K.L. et al. «Lymphocyte recognition and effector mechanisms». *Acad. Press*.
- RICHARDS, S., FLEMING, T.P., and JAMIESON, B.G.M. 1981. Aberrant spermatozoa and spermatids and observations on phagocytosis in *Sparganophilus tamesis* (Sparganophilidae, Oligochaeta): ultrastructural study. *Int. J. Inv. Reprod.* 4: 181-191.
- VOLKMAN, A. 1984. *Mononuclear phagocyte biology*. Dekker.