

Capítulo 2

Origen del espermatozoide

*Miguel Walter Fornés, Alfonsina Morales y
Elisa Olivia Pietrobon*

El espermatozoide se origina a través de uno de los procesos más espectaculares que tienen lugar en el organismo. Partiendo de una célula madre¹ se culmina en una célula haploide² altamente diferenciada funcional y morfológicamente. Estos cambios se producen dentro de los túbulos seminíferos alojados en el testículo. Veamos brevemente la organización del testículo para comprender el tema.

2.1 Organización general del testículo

El testículo es un órgano ovoide y par que se aloja dentro del escroto en la mayoría de los mamíferos. La localización extra corporal le permite estar a una temperatura inferior en 2 a 3°C a la corporal siendo ésta la temperatura ideal para la espermatogénesis³. Está delimitado por una cápsula firme de tejido conectivo denso denominada “Albugínea”. Desde esta cápsula se desprenden tabiques de tejido conectivo que separan la cavidad en espacios denominados “lobulillos”.

¹ Se denomina así a una célula que es capaz de generarse a sí misma y a su vez diferenciarse en células con funciones específicas. Luego de cada mitosis una de las células hijas queda como célula madre y la otra se diferencia en un linaje típico.

² Se aplica a las células que tienen la mitad del material genético; también se puede decir que sus cromosomas son simples, en lugar de dobles como en las células somáticas, o decir que tiene n moléculas de ADN en lugar de $2n$ (el doble de cantidad de ADN) de las células somáticas.

³ Patologías que comprometen la circulación o el ascenso del testículo a la cavidad abdominal que modifican la temperatura promueven una detención de la espermatogénesis.

Dentro de estas cavidades se encuentran los túbulos seminíferos. Los túbulos son largos cilindros en forma de herradura. Ambos extremos se unen a la *rete testis* (red testicular) que se ubica en el polo superior del órgano. Esta red es un sistema de tubos interconectados que reciben, por un lado, el producto de todos los túbulos seminíferos y, por su extremo superior, originan otros conductos que salen del testículo por orificios en la albugínea denominados “túbulos eferentes”. Estos túbulos desembocan en el epidídimo (Fig. 1).

Entre los túbulos seminíferos quedan espacios dentro de los lobulillos que se conocen como “intersticios”. Estos espacios contienen células del tejido conectivo y las células de Leydig o intersticiales. Las células intersticiales producen testosterona, esencial para el sostenimiento de la espermatogénesis.

2.2 Túbulo seminífero y espermatogénesis

El túbulo seminífero está delimitado por una membrana basal continua conformada por colágeno y, por fuera de ella, células como fibroblastos y mioideas. Estas últimas con función contráctil y una abundancia de elementos del citoesqueleto (Lossino y col. 2012).

La espermatogénesis se produce en el epitelio seminífero. Este epitelio estratificado es un tipo especial de epitelio donde las células germinales se dividen y diferencian hasta formar los espermatozoides que finalmente se liberan hacia la luz tubular. El espermatozoide descamado continúa siendo vital. En otros epitelios estratificados, la última capa de células puede desprenderse normalmente, pero lo hacen como células no viables.

En los epitelios, las células basales son las que sostienen, mediante sucesivas divisiones mitóticas, el envío de células a las capas superiores. En el túbulo seminífero, las

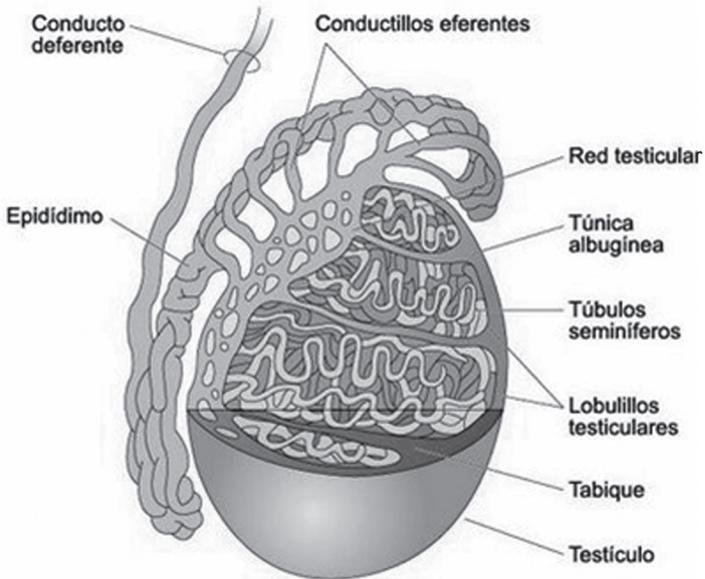


Figura 1. Corte de testículo para mostrar el interior del órgano. (Imagen tomada de internet: <http://3.bp.blogspot.com/-x6E7Qu2pH2s/Tu-8rhbTzjl/AAAAAAAAAJU/iheEAFnOt1U/s1600/Testiculo+y+epididimo+anatomia+8.JPG>), julio 2014).

células basales se denominan “espermatogonias”. Las espermatogonias tienen citoplasma con poca capacidad tintorial, por su pobreza en organelas, y un núcleo relativamente grande (Fig. 2).

Estas células madre se dividen por mitosis generando nuevas células, que pueden continuar siendo células indiferenciadas, las espermatogonias A, o bien quedar comprometidas a entrar en meiosis y en el camino de la diferenciación hacia espermatozoides, que son las espermatogonias B. Tanto las espermatogonias A como las B se encuentran sobre la membrana basal del epitelio.

Las espermatogonias A, a su vez, se denominan “oscuras” o “claras” de acuerdo a la coloración que tome su núcleo debido a la diferente compactación del ADN (Fig. 2).

Las células de Sertoli, columnares altas, se distribuyen entre las espermatogonias a lo largo del epitelio (Fig. 2). Estas células son una de las células más grandes del organismo y poseen una estructura realmente compleja. El núcleo suele ser basal con respecto al epitelio y alargado en sentido perpendicular a la membrana basal. Su membrana nuclear tiene plegamientos o indentaciones y puede tener uno o dos nucléolos muy evidentes

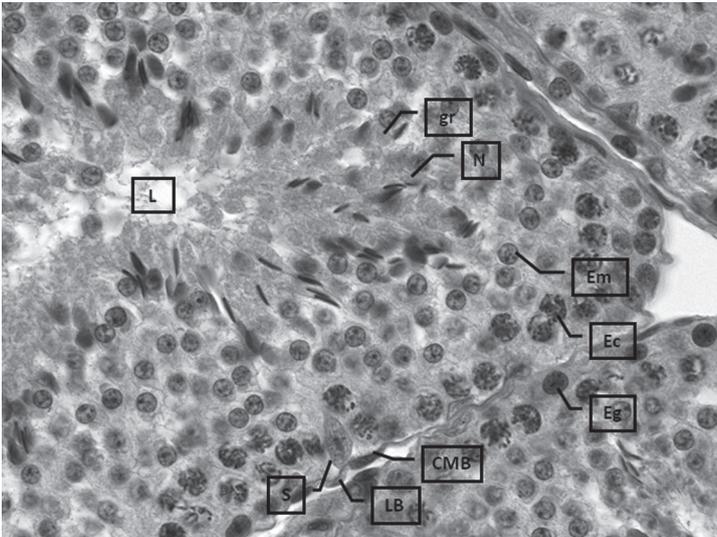


Figura 2. Túbulo seminífero de testículo de conejo. Se puede observar la lámina basal (LB) y las células mioepiteliales (CM). En la zona basal del túbulo se definen espermatogonias (Eg) y células de Sertoli (S). En una zona más cercana al lumen (L) se observan diferentes etapas de la espermiogénesis notándose núcleos de espermátides compactos y alargados (N) y gotas residuales (gr).

Las células de Sertoli poseen prolongaciones laterales que se unen fuertemente unas a otras por uniones ocluyentes⁴, dejando así dos zonas: una superior, el compartimiento adluminal –cerca de la luz tubular donde se desarrolla la espermatogénesis– y el compartimiento basal, por debajo de las prolongaciones/uniones sertolianas. De este modo queda constituida la denominada “Barrera hemato-testicular”⁵, donde las espermatogonias quedan aisladas en el compartimiento basal de las células germinales más diferenciadas.

Las células de Sertoli poseen también prolongaciones hacia el lumen –el centro del túbulo– muy largas, ramificadas y con oquedades, en las que se alojan las células espermáticas en formación.

La meiosis es el proceso que permite la reducción a la mitad del material genético con la formación de las gametas y la variabilidad de la especie. En un momento dado, las espermatogonias tipo B entran en meiosis⁶. Al final de la fase S del último ciclo celular⁷, cuando la célula tiene el doble del ADN de una espermatogonia (4n), entra en la Profase I (la primera profase de la meiosis). En este momento se transforma en espermatocono primario (cito I). Durante la profase, el espermatocono I (leptotene) deberá dejar el compartimiento basal, atravesar la barrera hemato-testicular y ascender al compartimiento adluminal (como zigotene). Las células de Sertoli reconocen señales específicas, desensamblan las

⁴ Estas uniones son similares a las descritas en los epitelios, incluso molecularmente.

⁵ Se denomina así al concepto o la idea que propone que sustancias presentes en la sangre no pueden atravesar estas barreras. Determinando así, un compartimiento separado del resto del organismo.

⁶ Proceso por el cual el material genético se reduce a la mitad pero que también permite la variabilidad ya que en una de sus etapas se intercambian sectores de las cromátidas.

⁷ Se conoce como ciclo las etapas por las que pasa una célula durante su ciclo vital. No es la mitosis solamente sino el proceso por el cual se prepara citoplásmica y nuclearmente para generar dos células hijas.

uniones por arriba y las ensamblan por debajo dejando pasar al cito I. De ahora en más, todas las etapas que se sucedan, cambios morfológicos y funcionales, se darán en las cavidades que las células de Sertoli le ofrecen a estas células. Por ello también se las denomina “nodrizas”, queriendo significar que no es un acompañamiento pasivo sino una interacción estrecha entre ambas células la que permite el desarrollo de la espermatogénesis.

Desde el espermatocito I en adelante se verifican dos divisiones sucesivas de meiosis dentro del compartimiento adluminal, por sobre la barrera hemato-testicular (aislado del organismo) y soportado por la interacción sertoli-gonia.

El cito I sufre la primera división por lo que de $4n$ pasa a $2n$ (reduce el total de moléculas de ADN, por ello llamada “reduccional”) originando los denominados espermatocitos secundarios (citos II), difíciles de visualizar porque inmediatamente entran en la segunda división sin sintetizar DNA, es decir, no tienen fase S en este ciclo celular. Así se generan espermátides con $1n$ de DNA (una copia simple del DNA). Estas espermátides son células redondas y entran en la etapa final que se denomina espermiogénesis.

Espermiogénesis

Como hemos visto, las espermátides son células haploides, redondas y están localizadas en las criptas de las células Sertolianas. Un largo proceso le espera hasta ser un espermatozoide listo para abandonar el testículo. Al menos cuatro grandes cambios se deben realizar en forma coordinada y simultánea: transformación nuclear, formación del acrosoma y flagelo, y redistribución -con pérdida- del citoplasma.

El núcleo celular post meiótico ($1n$) ha sufrido también un recambio de las proteínas nucleares clásicas –histonas– por protaminas. Estas protaminas permiten un enrollamien-

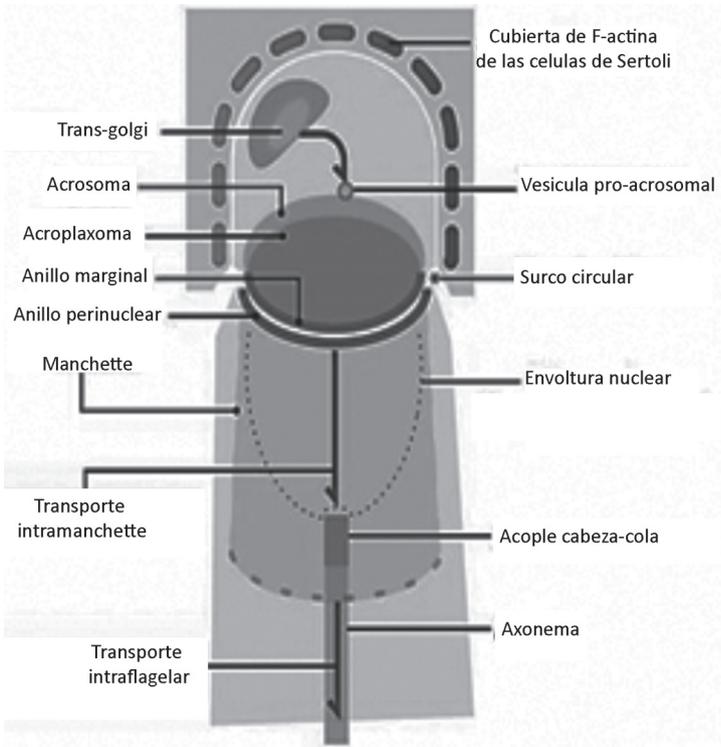


Figura 3. Componentes principales de la transformación de espermatocito a espermátide en elongación -desde una célula y su núcleo- esféricos a una célula alargada- por modificaciones simultáneas de los componentes celulares. La espermátide se representa como una célula alargada con dos zonas: una anterior, que origina el acrosoma y aloja al núcleo, y otra posterior (más ancha y aún más larga) que en parte sale del citoplasma de la célula de Sertoli (superficie punteada en el esquema). Esta última forma el nexo entre cabeza y cuello hasta el flagelo terminal.

to mayor del ADN espermático. Además, también soporta una compactación de todo el material nuclear generando uno de los núcleos celulares más compactos del organismo. Cabe recordar que esta célula será exportada fuera del or-

ganismo por lo que se debe proteger el material nuclear. El núcleo también sufre una transformación propia de cada especie ya que su forma final dentro de la forma que adquiere la cabeza espermática sirve para clasificar especies. El núcleo entra en contacto con un aparato que actualmente se denomina “acroplaxoma” –pero que en trabajos previos se reconocía como “perforatorio”– localizado en la región entre membrana nuclear y acrosoma, específicamente membrana acrosomal interna (Fig. 3). Este medio de unión entre ambas estructuras permite que al ser traccionado por el sistema de microtúbulos, se los moldee hasta que se alcance la forma típica de la especie en cuestión. Entonces, la combinación de la compactación del material nuclear más el modelado por la tracción del citoesqueleto genera un núcleo definitivo (Kierszenbaum y col. 2011).

El acroplaxoma o perforatorio forma parte del citoesqueleto de esta célula. El citoesqueleto en el flagelo tiene un inicio en el centrosoma, en la zona posterior u opuesta al acrosoma. Este centrosoma tiene dos partes: los centriolos y una nube de proteínas asociadas. Los centriolos se colocan uno perpendicular a otro, siendo el que se orienta en el sentido del flagelo, el activo en generar el esqueleto del flagelo. En esta zona de unión entre la cabeza en desarrollo y el futuro flagelo se va estructurando la pieza de conexión entre ambas estructuras. Esta pieza de conexión es variable según la especie pero en general tiene zonas electrón-densas que rodean al par central de la estructura clásica de 9+2 de un flagelo⁸ (véase más arriba). La condensación mayor tiene una aposición con una fosa delimitada por la membrana nuclear en el núcleo. A medida que se sintetiza el material del flagelo

⁸ La estructura celular conocida como flagelo, similar a la de los cilios, es una proyección citoplásmica cubierta por la membrana celular. Posee un esqueleto interno compuesto por un par central de microtúbulos y nueve pares periféricos, uno de ellos incompleto. Estos se insertan en el centriolo distal del par de centriolos localizados en el capitolio.

comienza a elongarse la estructura de 9+2. Simultáneamente, el aparato de Golgi se desplaza a la zona que será el extremo anterior de la cabeza opuesta al flagelo. Lo producido en las cisternas del aparato se vehiculiza por vesículas cargo que se fusionan a la membrana del futuro acrosoma y descargan su contenido. Esta cisterna gigante asociada al acroplaxoma y traccionada por los microtúbulos se “amolda” a la forma del núcleo quedando comprimida entre la membrana nuclear y la citoplásmica generando el acrosoma.

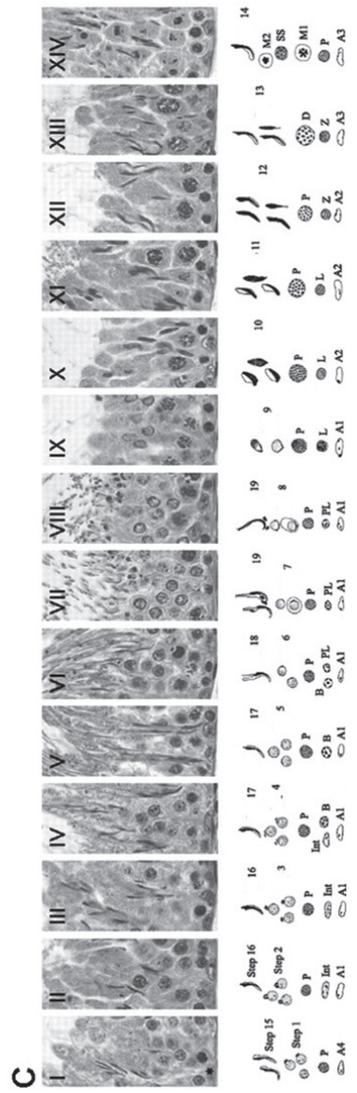
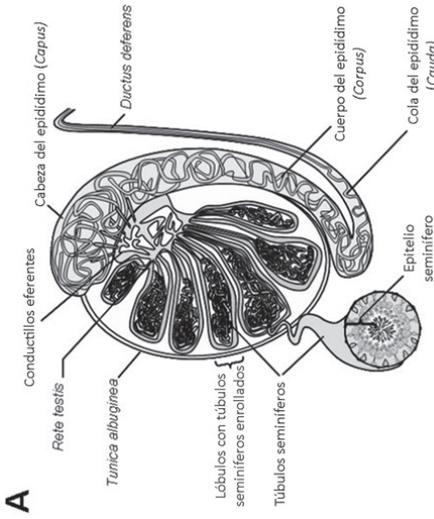
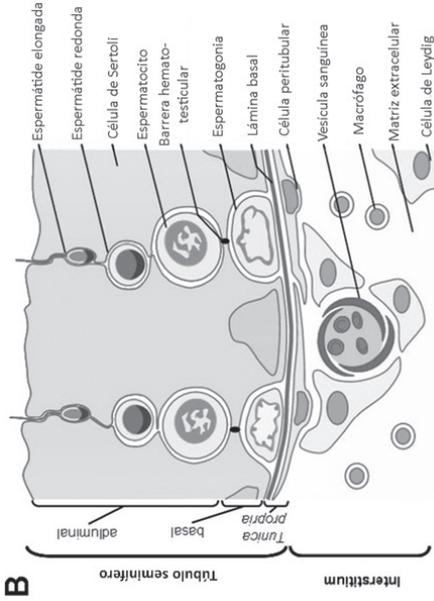
Las células de la serie espermática que sucesivamente se van originando conforman un mosaico de células que se asocian siguiendo un patrón. Así, por ejemplo, en la rata se reconocen catorce asociaciones de células de la serie (Fig. 4). Esta progresión y su duración fueron descritas por Clermont y colaboradores en la década del 50 (Clermont y col., 1959). Es interesante que también el tipo de proteínas reconocidas por Maltidoff tiene un patrón típico (Lagarrigue y col., 2011). Esta distribución celular debe ser tomada en cuenta al momento de evaluar biopsias o estados nutricionales porque pueden modificarse o malinterpretarse, ya que hay estadios normales que sin embargo no muestran espermatozoides luminales, y no significan una detención de la espermatogénesis.

2.3 Intersticio testicular

El espacio entre los túbulos seminíferos y los tabiques que separan los lobulillos intratesticulares son también un espacio linfático que se conecta con los vasos linfáticos que abandonan los testículos y que tienen relevancia en la diseminación de los cánceres de origen testicular. Dentro de estos espacios se localizan las células intersticiales de Leydig junto a otros tipos como fibroblastos, células de Cajal y macrófagos (Fig. 4). Las células de Leydig son productoras de testosterona y por

ello tienen las estructuras típicas de las células que producen hormonas de tipo esteroideas, un retículo endoplásmico liso muy desarrollado en íntima relación a las mitocondrias y vacuolas que acumulan colesterol, por un lado, y secreciones por otro. Las mitocondrias tienen un desarrollo de sus crestas muy marcado, denominadas tubulares, y espacios intramitocondriales bien definidos.

Figura 4. Ciclo del epitelio seminífero. En A se puede observar un corte de testículo. En B se muestra el citoplasma de la célula de Sertoli y en sombreado más oscuro, el núcleo. Se muestran las células de la espermatogénesis. En la mitad del dibujo se delinea la lámina basal. Desde ésta hacia abajo se representa el intersticio. La serie de fotos (I a XIV) del panel C y la representación de las mismas células en la línea inferior permiten definir qué células se encuentran en cada estadio. Esta clasificación se basa en la morfogénesis del acrosoma. Se esquematizan espermatogonias (A1, A2, A3, A4), estadios intermedios (Int y B) y espermatozoides (preleptotene (PL), leptotene (L), zigotene (Z), paquitene (P), diplotene (D), M1, y M2). Imagen adaptada (<http://www.mcponline.org/content/10/3/M110.005991.full.pdf+html>, Fig 2A).



2.4 Avances en el conocimiento del desarrollo del flagelo

Maria Eugenia Cabrillana

Las Fibras Densas Externas (ODF, del inglés “Outer Dense Fibers”) son el mayor componente citoesquelético del flagelo. Encontramos nueve de ellas en la pieza media y siete en la pieza principal; cada una posee una forma y tamaño característico y se distingue por microscopía electrónica una región cortical más electrondensa y una región medular, menos electrondensa. Del análisis en geles de poliacrilamida, se deduce que al menos seis polipéptidos mayoritarios componen las fibras densas externas, y sus pesos moleculares oscilan entre los 11 a 87 kDa (Eddy 2006, Oko 1988).

La primera proteína en conocer su identidad fue ODF1, cuya localización es medular. Ésta tiene un peso molecular de 27 kDa, posee dos dominios funcionales, uno amino terminal anfipático que presenta una estructura alfa hélice, tipo cremallera de leucina, que funcionaría como cebo para la interacción con otras proteínas. En la porción media de ODF1, entre los aa 129 y 203, se determinó un dominio conservado alfa cristalino característico de Heat Shock Proteins (Kappé y col. 2003). La porción carboxilo terminal es una repetición de cisteína, glicina y prolina (Van der Hoorn y col. 1990; Bhullar y col. 2003; Rosales y col. 2007). Por otro lado, su elevado contenido en cisteínas la convierte en blanco de cambios redox durante el tránsito epididimario (Calvin y col. 1971). Además, espermatozoides de ratones heterocigotas (+/-) para el gen *odf1*, poseen alterada su capacidad de moverse progresivamente (Yang y col. 2011).

La oxidación de los sulfhidrilos durante el tránsito epididimario genera un aumento en los puentes disulfuro,

lo que se traduce en una mayor estabilidad de la proteína. Esta disminución en tioles disponibles se ha evidenciado por la disminución en la solubilidad de la proteína al SDS y por la disminución en la afinidad a marcadores específicos de tioles, como lo es el monobromobimane (mBBr). Éste es un fluoróforo permeable a la membrana plasmática de células vivas (Kosower y col. 1987).

La especificidad de mBBr por ODF1 fue determinada por espectrometría de masas, a través de la cual se conocieron las cisteínas involucradas en la reacción. Finalmente, si se observan espermatozoides móviles en presencia de mBBr se puede detectar una disminución en el movimiento progresivo de los mismos (Cabrillana y col. 2011).

Referencias

Bhullar B., Zhang Y., Junco A., Oko R., van der Hoorn F.A. (2003). "Association of kinesin light chain with outer dense fibers in a microtubule-independent fashion". *J. Biol. Chem.* 278, 16159-16168.

Cabrillana, M.E., Monclus, M.A., Saez Lanzelotti, T.E., Boarelli, .PV., Clementi M.A., Vincenti, A.E., Yunes, R.M.F., Fornés, M.W. (2011). "Characterization of flagellar cysteine-rich sperm proteins, involved in motility, by the combination of cellular fractionation, fluorescence detection and mass spectrometry analysis". *Cytoskeleton (Hoboken)*, 68, 9, 491-500.

Calvin H.I., Bedford J.M. (1971). "Formation of disulphide bonds in the nucleus and structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis". *J Reprod Fertil Suppl* 13, 65-75.

Clermont Y., Leblond C.P., Messier B.(1959) "Duration of the cycle of the seminal epithelium of the rat". *Arch Anat Microsc Morphol Exp.* 48, Suppl, 37-55.

Eddy, E.M. (2006) "The spermatozoon". In: Neill, JD. editor. *Physiology of Reproduction.* 1–54.

Fibers of rat spermatozoa". *Biology of Reproduction* 39, 169-182.

Kappé G., Frank E., Verschuure P., Boelens W.C., Leunissen J.A.M., de Jong W.W. (2003). "The human genome encodes 10 α -crystallin-related small heat shock proteins: HspB1-10". *Cell stress and Chaperones*, 8, 1, 53-61.

Kierszenbaum A.L., Rivkin E., Tres L.L. (2011) "Cytoskeletal track selection during cargo transport in spermatids is relevant to male fertility". *Spermatogenesis* 1, 3,221-230.

Kosower N.S., Kosower E.M. (1987). "Thiol labeling with bromobimanes". *Methods Enzymol* 143, 76-84.

Lagarrigue M., Becker M., Lavigne R., Deininger S.O., Walch A., Aubry F., Suckau D., Pineau C. (2010) "Revisiting rat spermatogenesis with MALDI imaging at 20-microm resolution". *Mol Cell Proteomics.* 10, 3,M110.005991.

Losinno, A.D., Morales A., Fernandez D., Lopez L.A. (2012) "Peritubular Myoid Cells from Rat Seminiferous Tubules Contain Actin and Myosin Filaments Distributed in Two Independent Layers". *Biol. Reprod.*, 86, 5, 150.

Oko, R. (1988). "Comparative Analysis of Proteins of Fibrous Sheath and Outer dense fibers of rat spermatozoa". *Biol. Reprod.*; 39 (s): 169-82.

Rosales JL, Sarker K, Ho N, Broniewska M, Wong P, Cheng M, van der Hoorn FA, Lee KY. (2007) ODF1 phosphorylation by Cdk5/p35 enhances ODF1-OIP1 interaction. *Cell Physiol Biochem*; 20(5): C311-C318, 2007.

Van der Hoorn F.A., Tarnasky H.A., Nordeen S.K. (1990). "A new rat gene RT7 is specifically expressed during spermatogenesis". *Dev. Biol.* 142, 147–154.

Yang, K., Meinhardt A., Zhang, B., Grzmil, P., Adham, I., Hoyer-Fender S. (2012). "The Small Heat Shock Protein ODF1/HSPB10 Is Essential for Tight Linkage of Sperm Head to Tail and Male Fertility in Mice". *Mol. Cell. Biol.*, 32, 1,216.