

FAGOCITOS EN LOS CONDUCTOS EPIDIDIMARIOS DE *Dina lineata* (Hirudinea, Erpobdellidae)

S. Bonet y M. Molinas

Departament de Biologia Cel·lular i Fisiologia. Col·legi Universitari de Girona (UAB).
Hospital, 6. - 17071 Girona.

RESUM

Aquest treball tracta de l'estructura, l'ultraestructura i la funció dels fagòcits presents en els conductes epididimaris de *Dina lineata*, sangonera d'aigües dolces, hermafrodita i proteràndrica, de fecundació traumàtica hipodèrmica.

Les mostres han estat fixades en formol i incloses en glicol metacrilat per a la seva observació al microscopi òptic; i fixades en líquid de Karnovsky, postfixades en tetraòxid d'osmi, i incloses en resina Spurr per a la seva observació al microscopi electrònic de transmissió.

Els fagòcits de l'epidídim són cèl·lules lliures, monucleades, intensament actives en la funció macrofàgica. Es troben relativament abundants entre els feixos d'espermatozoides. A diferència dels fagòcits lliures dels sacs testiculars, no s'observa el nucli bilobulat característic ni la presència de cèl·lules plurinucleades. La funció dels fagòcits de l'epidídim està limitada a l'eliminació d'espermatozoides, en els quals no s'han observat morfologies aberrants.

RESUMEN

Este trabajo trata de la estructura, la ultraestructura y la función de los fagocitos presentes en los conductos epididimarios de *Dina lineata*, sanguijuela de agua dulce, hermafrodita y proterándrica, de fecundación traumática hipodérmica.

Las muestras han sido fijadas en formol e incluidas en glicol metacrilato para su observación al microscopio óptico; y fijadas en líquido de Karnovsky, postfijadas en tetraóxido de osmio e incluidas en resina Spurr para su observación al microscopio electrónico de transmisión.

Los fagocitos del epidídimo son células libres mononucleadas y de función macrofágica. Se encuentran regularmente entre los haces de espermatozoides. A diferencia de los fagocitos libres de los sacos testiculares no se observa el núcleo bilobulado característico ni la presencia de células plurinucleadas. Su función está limitada a la eliminación de espermatozoides en los que, si bien no se han observado aberraciones morfológicas, no puede descartarse la presencia de anomalías funcionales no detectables en un estudio morfológico.

ABSTRACT

This paper describes the structure, ultrastructure and function of phagocytes in epididymary ducts of *Dina lineata*, a freshwater leech, proterandric and hermafrodite with traumatic hypodermal fertilization.

The specimens have been fixed with formaldehyde and included in glycol metacrylate for observation by optical microscopy; and fixed with Karnovsky solution, postfixed with osmium tetroxide and included in Spurr for observation by electron microscopy.

Epididymary phagocytes are mononucleated cells actively immersed in macrophagic function. They are found mixed with sperm inside the ducts. In contrast with testicular phagocytes the characteristic bilobated nucleus and the binucleated cells are not observed. The role of the macrophagic cells seems to be the phagocytosis of gametes in which no morphological anomalies have been detected.

Key words: Phagocytes, phagocytosis, ultrastructure, epididymis, spermatozoa, hirudinea, leeches.

INTRODUCCIÓN

La presencia de fagocitos libres en el interior de los sacos testiculares de *Dina lineata* y su relación con el proceso de espermatogénesis y espermiogénesis han sido descritas por los autores en un trabajo anterior (Bonet y Molinas, 1985). La función principal atribuida a estas células es la eliminación del citóforo y de los restos celulares de la espermatogénesis, encargándose también de la fagocitosis de células germinales, probablemente innecesarias o funcionalmente defectuosas, en las que no se han observado anomalías morfológicas.

Brumpt (1900), en su estudio sobre la reproducción de los hirudíneos, describe junto con el contenido espermático de los conductos epididimarios unas células ameboides a las que denomina células intersticiales responsables de procesos de fagocitosis. Muy posteriormente Damas (1968), en sus estudios en *Glossiphonia complanata* (Hirudinea, Rynchoabdellae), cita tres tipos de células intersticiales en el conducto epididimario a las que atribuye la secreción de substancias mucoides neutras de carácter aglutinante e hidratante; el trabajo se limita a los datos aportados por la microscopía óptica.

En los oligoquetos, la presencia de células somáticas libres entre el esperma del llamado canal eyaculador ha sido citada por Richards (1981) en *Sparganophyllus tamesis* y por Block (1981) en *Limnodrillus hoffmeisteri*. Ambos autores coinciden en su actividad macrofática pero, mientras Richards (1981) observa morfologías aberrantes en los productos germinales fagocitados, Block encuentra células de morfología normal.

En los conductos epididimarios de *Dina lineata* (Hirudinea, Erpobdellidae) se pueden observar células ameboides con capacidad fagocitaria cuya descripción se realiza en este trabajo. Las características ultraestructurales de estas células y su relación con las células germinales del epidídimo son

interesantes para conocer su función, más aún cuando pueden observarse diferencias morfológicas con respecto a los amebocitos testiculares de esta misma especie (Bonet y Molinas, 1985).

MATERIAL Y MÉTODOS

Ejemplares de *Dina lineata* capturados en el río Ter a su paso por Camprodon (Girona) durante los meses de octubre a diciembre, es decir, con el aparato genital masculino maduro, fueron anestesiados en agua de Seltz.

Para la microscopia óptica, fragmentos de la región epididimaria, comprendidos entre los segmentos XIX i XI, fueron fijados en una solución de formalina al 5% tamponada a pH 7,2 y, previa deshidratación en serie alcohólica, incluidos en glicol metacrilato (GMA) (Bonet y Molinas, 1983). Los cortes semifinos obtenidos fueron teñidos con diversas técnicas histológicas e histoquímicas adaptadas al material de inclusión (Bonet y Huguet, 1985).

Para la microscopia electrónica, fragmentos del conducto epididimario fueron fijados en líquido de Karnowsky (Santander, 1968), postfijados con tetraóxido de osmio e incluidos en resina Spurr ERL 4206 (Spurr, 1969). Los cortes ultrafinos fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo (Reynolds, 1963), y observados en un HITACHI HV 12A del Servicio de Microscopia Electrónica de la Universidad Autónoma de Barcelona.

OBSERVACIONES

Dina lineata es una sanguijuela dulceacuícola, hermafrodita y proterándrica, que se reproduce por fecundación traumática hipodérmica mediante la inyección del contenido de los espermátóforos en el tejido conjuntivo dérmico de la pared del cuerpo de la pareja. Su aparato genital masculino está formado por la región testicular en la que se encuentran los sacos testiculares y los conductos eferentes y deferentes; la región epididimaria formada por los dos conductos epididimarios; y la región atrial responsable de la síntesis y expulsión del espermátóforo.

Los conductos epididimarios discurren con un recorrido helicoidal dextrógiro a ambos lados de la cadena nerviosa, extendiéndose desde el metámero XIX al XI. Están revestidos de un epitelio glandular con estereocilios y dotados de una vaina músculo-conectiva muy desarrollada. En su interior se almacena progresivamente el esperma procedente de sendos conductos deferentes hasta el momento de la formación de los espermátóforos durante el apareamiento.

En la luz del conducto se acumulan los haces de espermatozoides, entre los cuales se disgregan los granos de secreción liberados por las células glandulares del epitelio, observándose además la presencia de células fagocitarias.

Microscopia óptica

Los fagocitos epididimarios son células redondeadas o alargadas de unos 25 por 6 micrómetros de diámetro, distribuidas de un modo bastante homogéneo entre los haces de espermatozoides.

Su núcleo es redondeado, de unos 5 micrómetros de diámetro, la cromatina es fina y difusa, y el nucleolo, único, toma una posición central o paracentral.

El citoplasma ligeramente acidófilo, tiene un aspecto fibro-granuloso muy característico con algunas zonas vacuoladas de intensa basofilia. En ocasiones se observan zonas cianófilas que se corresponden con los núcleos de los espermatozoides fagocitados.

Microscopia electrónica

Los fagocitos epididimarios son células libres de función macrofágica muy activa cargadas de elementos gaméticos en distintos estadios de digestión enzimática. (Fig. 1)

El núcleo, generalmente oval, puede presentar alguna lobulación estrecha con una o más escotaduras de profundidad variable. La cromatina,

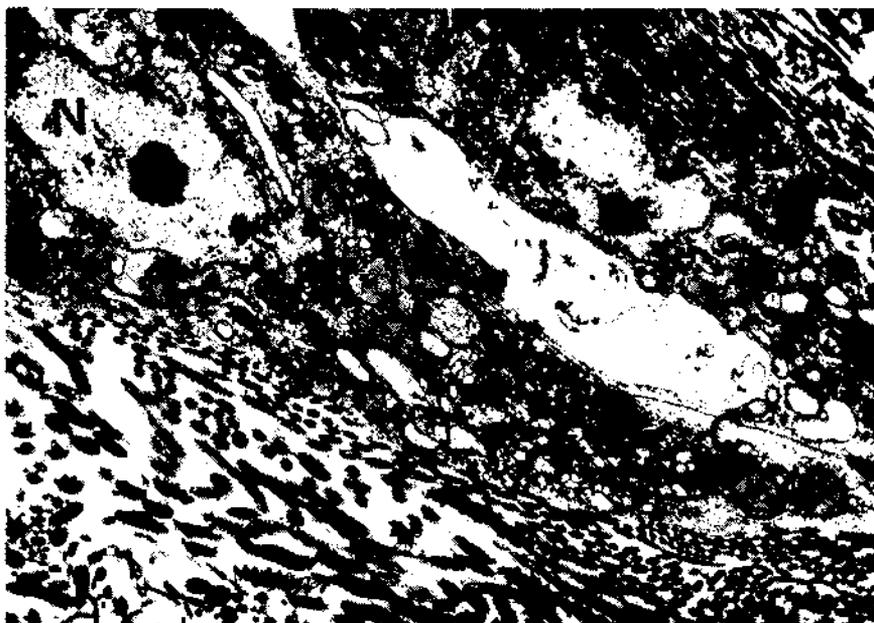


Figura 1. Aspecto general de dos fagocitos epididimarios. El núcleo (N) presenta una cromatina granular, fina y homogéneamente distribuida, y un nucleolo redondo muy prominente. El citoplasma (C) está muy vacuolizado y en él se encuentran elementos gaméticos en distintos estadios de digestión. (6000 X).

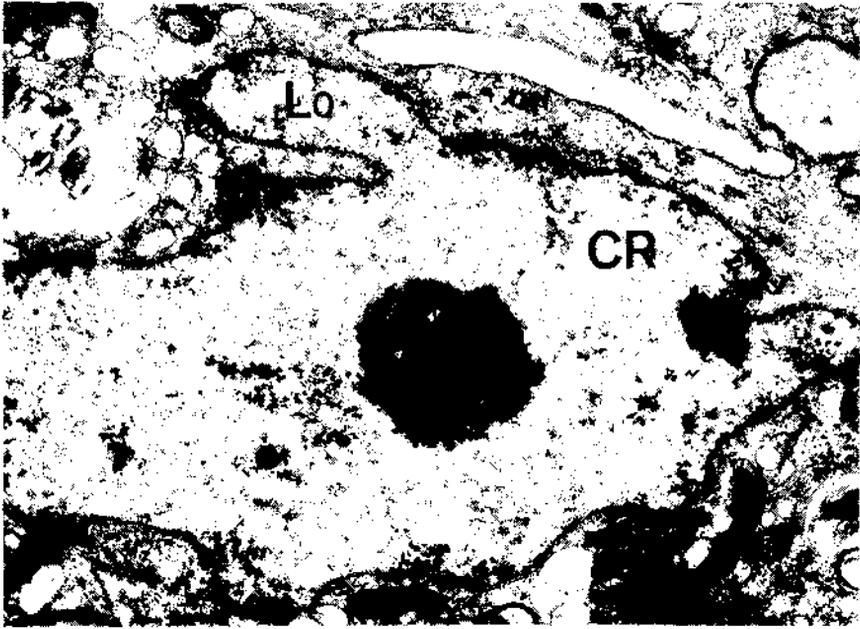


Figura 2. Aspecto general del núcleo. Obsérvese la característica distribución homogénea de la cromatina (Cr). El núcleo puede presentar alguna lobulación (Lo) inconstante de tamaño muy variable. (12000 X).

finamente granular, está homogéneamente distribuida por todo el nucleoplasma, y la heterocromatina, muy poco abundante, aparece formando pequeños gránulos dispersos o asociados a la envoltura nuclear y al nucleolo. El nucleolo, redondo y muy electrodens, alcanza un diámetro de unos 1,5 micrómetros y ocupa una posición paracentral. (Fig. 2).

El citoplasma está muy vacuolizado y emite gran cantidad de pseudópodos filiformes dirigidos a englobar elementos gaméticos circundantes. En él abundan vesículas del retículo endoplasmático rugoso, ribosomas libres, dictiosomas, mitocondrias bacilares y filamentosas y, especialmente, todos los orgánulos directamente relacionados con la función fagocítica: lisosomas primarios, heterofagosomas, lisosomas secundarios y cuerpos residuales. En el interior de las vesículas fagocíticas pueden verse abundantes espermatozoides en los que no se han observado morfologías aberrantes. (Figs. 3, 4 y 5)

DISCUSIÓN

Hemos llamado epidídimo a la porción del tracto genital masculino que se extiende desde los conductos deferentes al atrio. Esta misma región ha recibido otras denominaciones: para Brumpt (1900) y Damas (1968) es el canal eyaculador, Van Dame (1974) le da el nombre de vesícula seminal,

mientras Mann (1962) lo denomina epidídimo. La presencia de un epitelio secretor y de una vaina muscular potente nos han inclinado a adoptar esta última denominación.

Las observaciones realizadas confirman el carácter fagocitario de las células libres del epidídimo tal como deducía Brumpt (1900) en sus trabajos. Se trata de células macrofágicas muy activas, cargadas de elementos gaméticos en el interior de sus vesículas fagocíticas, cuya abundancia y homogeneidad de distribución hacen suponer que realizan su función de manera regular.

El espermatozoide de *Dina lineata* es un gameto altamente modificado y extraordinariamente adaptado al peculiar modo de fecundación de esta especie: la fecundación traumática hipodérmica en la que los espermatozoides, inyectados en la dermis por vía subcutánea, deben atravesar los tejidos para alcanzar las células femeninas en el ovario. Estos espermatozoides serán almacenados en el epidídimo desde el momento en que tiene lugar la espermatogénesis hasta la formación del espermatóforo, un período superior a los tres meses. El conducto epididimario debe garantizar la supervivencia de estas células masculinas tan sumamente diferenciadas y a esta finalidad obedece la abundante secreción de las glándulas epiteliales.

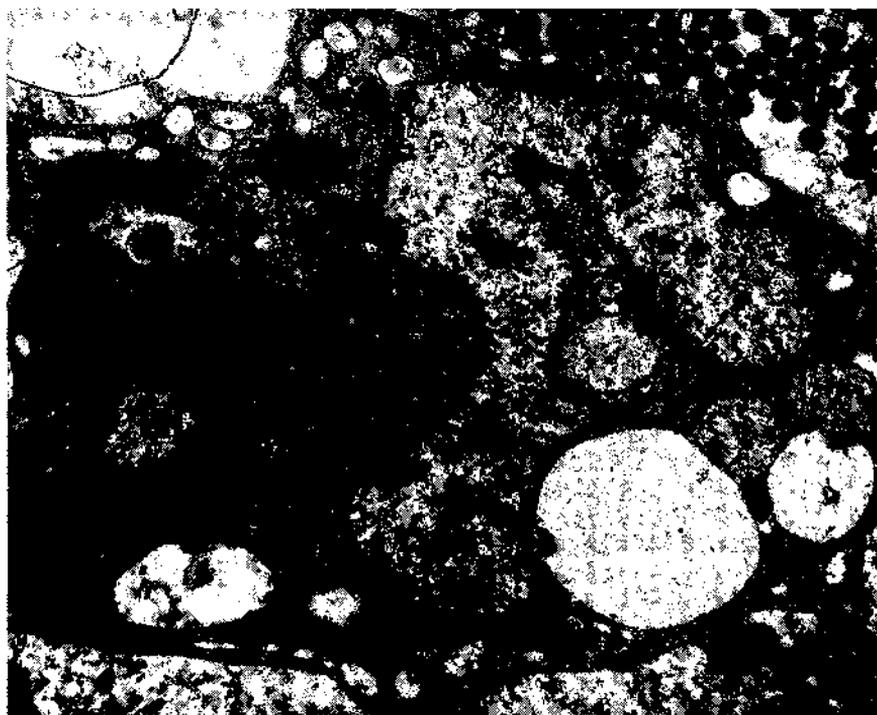


Figura 3. Citoplasma perinuclear del fagocito en el que abundan las mitocondrias (M) y las cisternas del retículo ergastoplásmico. (14000 X).

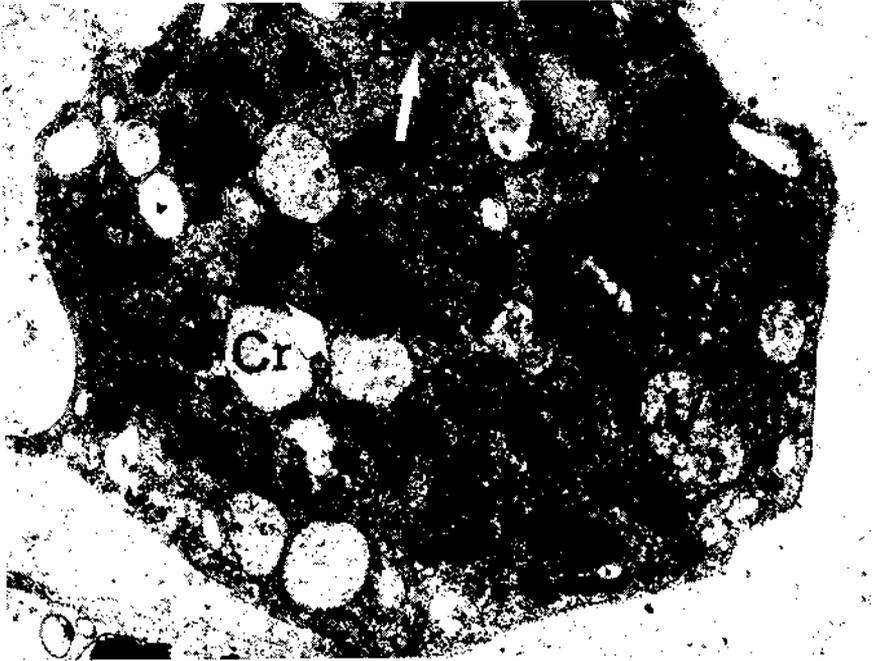


Figura 4. Citoplasma del fagocito. Se trata de un citoplasma denso, debido a la abundante población ribosómica y de vesículas del retículo endoplasmático rugoso, en el que pueden hallarse mitocondrias bacilares y filamentosas, lisosomas (L), vacuolas heterofágicas (V) y cuerpos residuales (Cr). (14000 X).

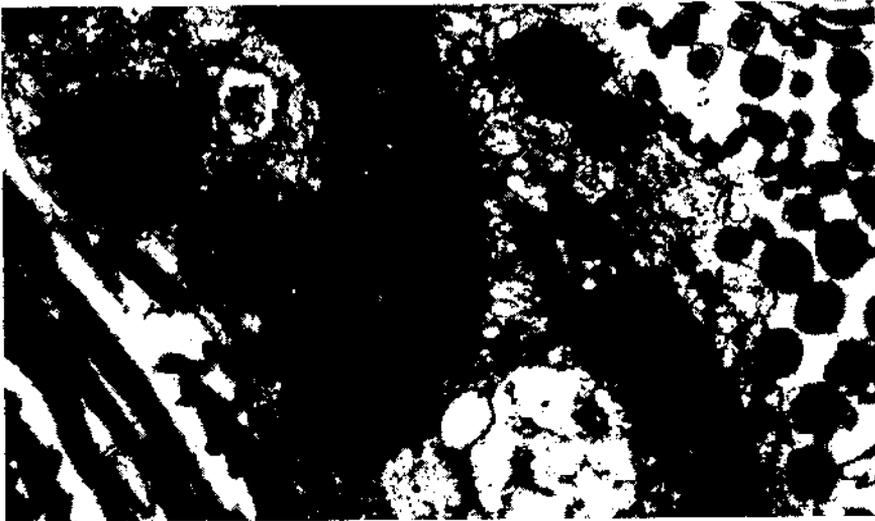


Figura 5. Citoplasma de un fagocito epididimario en el que pueden hallarse elementos gaméticos capturados. La microfotografía muestra, en sección transversal, los niveles axonemático (Ax) y nuclear (N) de los espermatozoides fagocitados. (16000 X).

Los espermatozoides englobados por los fagocitos del epidídimo no presentan anomalías estructurales, al igual que ocurría con los elementos germinales capturados por los macrófagos testiculares (Bonet y Molinas, 1985). Sin embargo, la función más razonable que se puede atribuir a estos fagocitos es la eliminación de los gametos defectuosos que se producen durante el largo período de almacenamiento y cuya disfunción no se detecta morfológicamente.

Al comparar la morfología de los fagocitos del epidídimo con las células macrofágicas libres de los sacos testiculares se observan algunas diferencias. El núcleo bilobulado característico del fagocito testicular, tan frecuente en los macrófagos, no aparece, al menos de modo específico y constante. El núcleo es oval y, sólo ocasionalmente, presenta alguna lobulación reversible de dimensiones variables. Tampoco se observan células plurinucleadas parecidas a las células gigantes que pueden encontrarse en los sacos testiculares. Estas observaciones confirman el polimorfismo que caracteriza al macrófago que, por otra parte, es una célula bien definida por su función y por los orgánulos característicos de su citoplasma.

Bibliografía

- BLOCK, E.M.; MATHEWS, J y GOODNIGHT, C.L.V. (1981). Spermogenesis in *Limnodrillus hoffmeisteri* (Oligochaeta, Tubificidae): the role of phagocytes in the sperm sac. *Int. J. Inv. Pathol.* 42: 8-19.
- BONET, S y MOLINAS, M. (1983). Utilitat del Glicol metacrilat en l'obtenció de talls semifins per a histologia. *Ann. Sec. Cien. Col. Univ. Girona (UAB)*, 9: 21-29.
- BONET, S. y HUGUET, G. (1985). Tècniques habituals de coloració per a seccions semifines de material inclòs en glicol metacrilat. *Scientia gerundensis* 10: 23-32.
- BONET, S y MOLINAS, M. (1985). Estudio ultraestructural del fagocito testicular de *Dina lineata* (Hirudinea, Erpobdellidae). *Scientia gerundensis* 11: 29-37.
- BRUMPT, E. (1900). Reproduction des Hirudinées. *Mem. Soc. Zool. Fr.* 13: 286-430.
- DAMAS, D. (1968). Histochemie des canaux éjaculateurs de *Glossiphonia complanata* (Hirudinée, Rhyncobdelle). *Ann. Histochem.* 13: 111-122.
- MANN, K.H. (1962). *Leeches (Hirudinea): their structure, physiology, ecology and embryology*. Ed. Pergamon Press.
- REYNOLDS, E.S. (1963): The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 17: 208-216.
- RICHARDS, S.; FLEMING, T.P. y JAMIESON, B.G.M. (1981). Aberrant spermatozoa and spermatids and observations of phagocytosis in *Sparganophyllus tamensis* (Sparganophilidae, Oligochaeta): Ultrastructural study. *Int. J. Inv. Reprod.* 4: 181-191.
- SANTANDER, G. (1968). *Técnicas de Microscopia Electrónica*. Ed. Aguilar.
- SPURR, A.R. (1969). A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultras. Res.* 26: 31-43.
- VAN DAMME, N. (1974). L'organogénèse de l'appareil génital chez la sangsue *Erpobdella octoculata* L. (Hirudinée, Pharyngobdelle). *Arch. Biol. (Bruxelles)* 85: 373-397.