

# Microanatomía de los testisacos y espermatogénesis de *Helobdella michaelsoni* (Hirudinea, Glossiphoniidae)

## Testisacs microanatomy and spermatogenesis of *Helobdella michaelsoni* (Hirudinea, Glossiphoniidae)

Bettina Sandra Gullo<sup>1</sup>  
bgullo@fcnym.unlp.edu.ar

### Resumen

Se realizó un estudio histológico detallado de los testisacos y espermatogénesis de *Helobdella michaelsoni*. El sistema reproductor masculino está constituido por siete pares de testisacos esféricos localizados entre los somitos XIII/XIV a XIX/XX. Los espermiductos alcanzan los somitos XVII/ XVIII o XIX/XX. Atrio en forma de huso. Poro masculino localizado en el segmento XII a<sub>1</sub>/a<sub>2</sub>. La espermatogénesis se produce en el interior de sacos celómicos llenos de fluido. Cada testisaco está tapizado por mesotelio. En su interior las células germinales permanecen unidas por el citóforo y desarrollan poliplastos germinales. Los espermatozoides maduros son liberados a la luz de los testisacos con posterioridad a la reabsorción del citóforo. Se describieron cinco estadios durante la espermatogénesis teniendo en cuenta la maduración de los elementos germinales y los cambios en el citóforo.

**Palabras clave:** microanatomía, testisacos, *Helobdella michaelsoni*, espermatogénesis.

### Abstract

A detailed preliminary histological analysis of *Helobdella michaelsoni* Blanchard 1900 testisacs is described. The male reproductive system is composed of seven pairs of spherical testisacs found intersegmentally from somites XIII/XIV to somites XIX/XX. Spermiducts reach the back of somites XVII/ XVIII or XIX/XX. Spindle form atria. Male pore at somite XII a<sub>1</sub>/a<sub>2</sub>. The spermatogenesis occurs in the lumen of fluid-filled coelomic sacs. Each testisacs is clothed by mesotelium. Inside it, the germinal cells are connected to the cytophore and develop functional units called polyplasts. The spermatozoo are released into testisacs after the cytophore reabsorption. Five stages of spermatogenesis are described taking into account the successive maturation stages of germinal cells and the changes in the cytophore.

**Key words:** microanatomy, testisacs, *Helobdella michaelsoni*, spermatogenesis.

<sup>1</sup> Cátedra Zoología Invertebrados I. Facultad de Ciencias Naturales y Museo (Universidad Nacional de La Plata). Paseo del Bosque, s/n, 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

## Introducción

*Helobdella michelseni* Blanchard 1900 es una sanguijuela ampliamente distribuida en ambientes lénticos y lóticos de la República Argentina, Brasil, Chile, Uruguay Paraguay y Perú. Según Ringuet (1944), habita fondos limosos y es frecuente en ambientes contaminados. Se la encuentra bajo piedras, en el fango, bajo hojas putrefactas y entre las raíces de hidrófitas.

Varios autores han estudiado en detalle la espermatogénesis y estructura testicular de hirudíneos Rhyncobdellida: Damas (1965, 1966, 1968a, 1968b); Malecha (1975); Martínez Alós y García Corrales (1988); Fernández *et al.* (1992) y Gullo (1995, 2004).

Según Hess (1998), la espermatogénesis es aquel proceso biológico por el cual las células germinales se transforman gradualmente en espermatozoides y puede ser dividida en tres fases: proliferación, meiosis y diferenciación. Cada una de estas etapas está asociada con tipos específicos de células germinales: espermatogonias, espermatozoides y espermátides respectivamente.

Los hirudíneos poseen un hermafroditismo protándrico y secuencial. La fase de proliferación está caracterizada por la presencia de espermatogonias que se dividen por mitosis para originar una unidad clonal (grupo de células germinales de desarrollo sincrónico que permanecen unidas debido a una incompleta citocinesis a un citóforo anucleado central). Esta unidad clonal constituye un grupo isogénico o poliplasto germinal (Fernández *et al.*, 1992). Durante la meiosis los espermatozoides se dividen por lo que aumenta considerablemente el número de células, y durante la diferenciación los núcleos se tornan elípticos. La espermatogénesis culmina con la liberación de los espermatozoides a la luz del testisaco.

El objetivo de este trabajo es describir la estructura de los testisacos de *H. michaelseni* y caracterizar las distintas etapas observadas durante el proceso de espermatogénesis teniendo en

cuenta la maduración de los elementos germinales y los cambios en el aspecto y volumen del citóforo.

## Material y métodos

El material motivo de este estudio proviene de muestreos realizados durante los meses de febrero, marzo y abril de 2004 en un ambiente léntico de carácter temporal ubicado en la localidad de Dolores (Provincia de Buenos Aires) en el Km 15 Ruta Provincial 63 (coordenadas: 36°18'55" S, 57°32'12" O). En cada muestreo se obtuvieron cuatro muestras representativas utilizando un cuadrado de 900cm<sup>2</sup> de área y 0,5mm de abertura de malla con el cual se recogieron muestras de la carpeta vegetal. La vegetación estuvo constituida por *Spirodella intermedia* Koch, *Wolffiella oblonga* (Phil) Hegelmaier, *Lemna* sp (Lemnaceae) y *Azolla filiculoides*, Lamarck (Azollaceae). En el laboratorio se realizó el lavado de la vegetación empleando un tamiz de 200µm. El peso húmedo de los ejemplares se obtuvo utilizando una balanza analítica Ohaus con una precisión de 0,1mg. La talla nuclear y citoplasmática se determinó midiendo con un ocular micrométrico considerando el diámetro menor de las células cuya sección pasa por el núcleo. Para el examen microanatómico fueron procesados un total de 50 especímenes comprendiendo un amplio espectro de pesos (2 a 10mg).

Los ejemplares de *Helobdella michaelseni* fueron fijados en Carnoy 6:3:1 (60cc alcohol absoluto, 30cc cloroformo y 10cc ácido acético glaciar), Gabe (1968) e incluidos en Paraplast. Para realizar la evaluación microanatómica se obtuvieron secciones histológicas seriadas de 10µm que fueron teñidas con Hematoxilina de Meyer y Eosina.

## Resultados

*Helobdella michaelseni* posee siete pares de testisacos localizados entre los somitos XIII/XIV a XIX/XX.

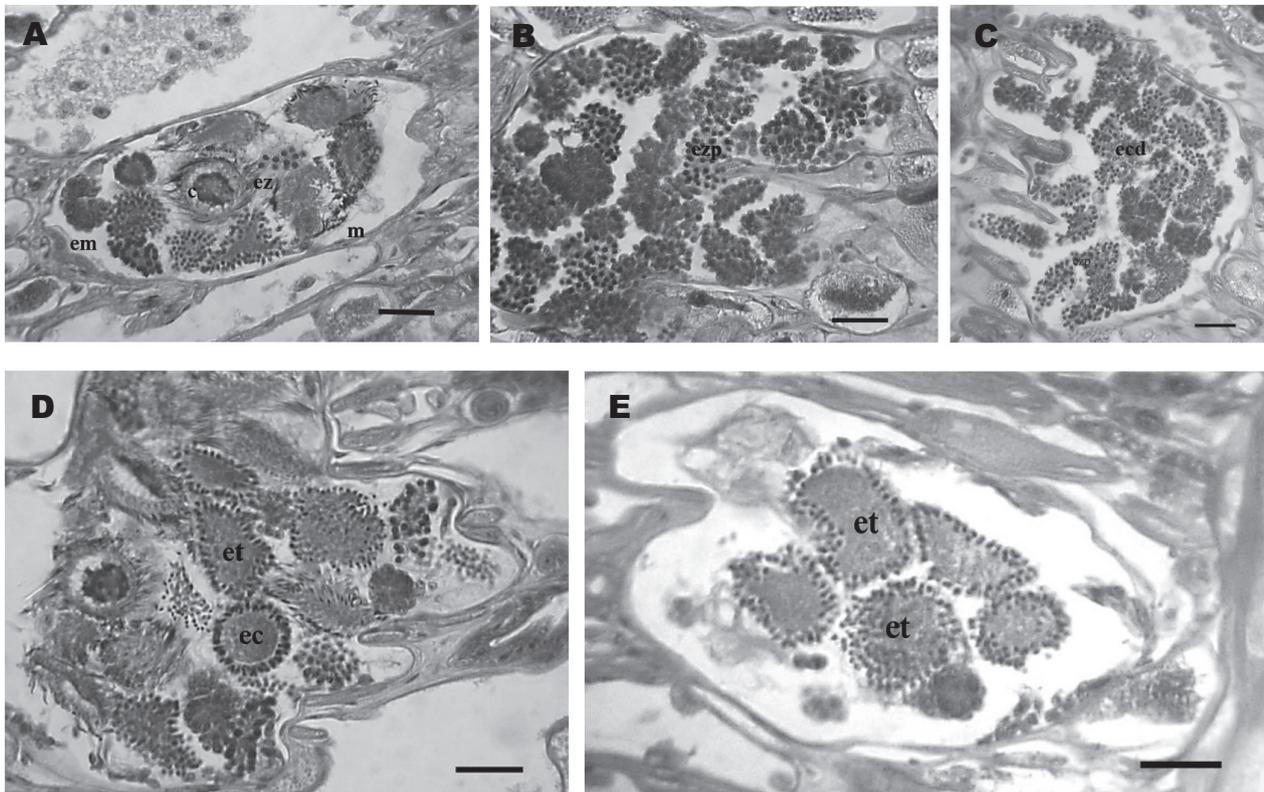
Los testisacos se hallan delimitados

por un epitelio celómico formado por células planas de tipo mesotelial que forman una capa continua. Dichas células se apoyan sobre una membrana basal que las separa del tejido conjuntivo circundante. El citoplasma es acidófilo, el núcleo es oval y su talla varía según el grado de dilatación de los sacos testiculares conforme avanza el proceso de espermatogénesis (talla nuclear 9,73±1,73µm; n=25). El embudo testicular (Figura 1A) comunica cada testisaco con el conducto eferente y presenta un epitelio cúbico cuyas células poseen núcleo esférico (talla nuclear 5,16±0,31 µm y citoplasmática 7,52±0,17, n=25) y se hallan provistas de cilios.

Las espermatogonias de cada unidad clonal presentan un núcleo esférico cuya talla es de 6,15± 0,8µm (n=25). La cromatina es de disposición perinuclear y está adosada a la carioteca. Los espermatozoides primarios se caracterizan por presentar núcleos con cromatina condensada. Dicha condensación indica que los espermatozoides se encuentran en la etapa de zigotene o paquitene correspondiente a la profase de la primera división meiótica (Figuras 1B y 1C). Su talla nuclear es de 4,65±0,48µm, (n=25). Se han observado asimismo espermatozoides primarios en diacinesis (Figura 1C) y espermatozoides en metafase (Figura 1D).

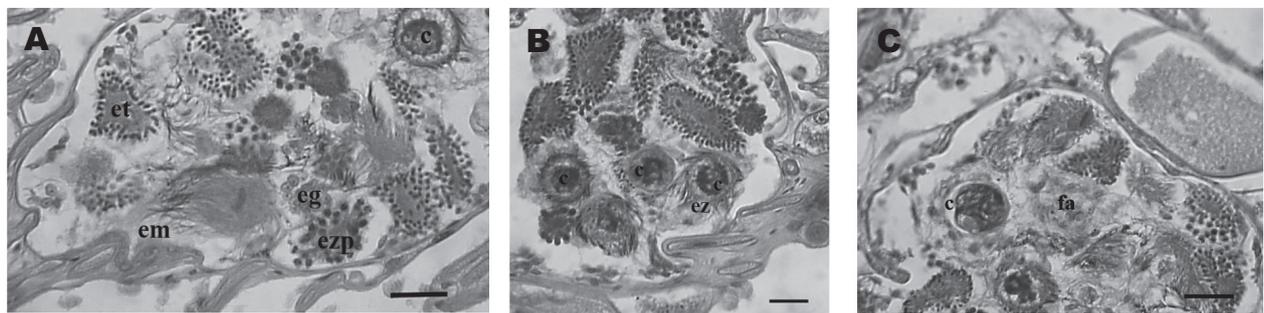
Al completar la segunda división meiótica comienza el proceso de diferenciación (espermiogénesis) que culmina con la formación de los espermatozoides. Durante el proceso el núcleo adopta una forma elíptica característica de las espermátides (Figura 1E). La talla nuclear es de 2,48±0,05µm (n=25). Esta etapa culmina con la formación del flagelo. La talla de los espermatozoides es de 1,09±0,12µm (n=25). Se reconocen tres regiones: una anterior y posterior eosinófilas que corresponden al acrosoma y flagelo respectivamente y una media basófila que corresponde al núcleo (Figuras 2A y 2B).

La espermatogénesis se dividió en



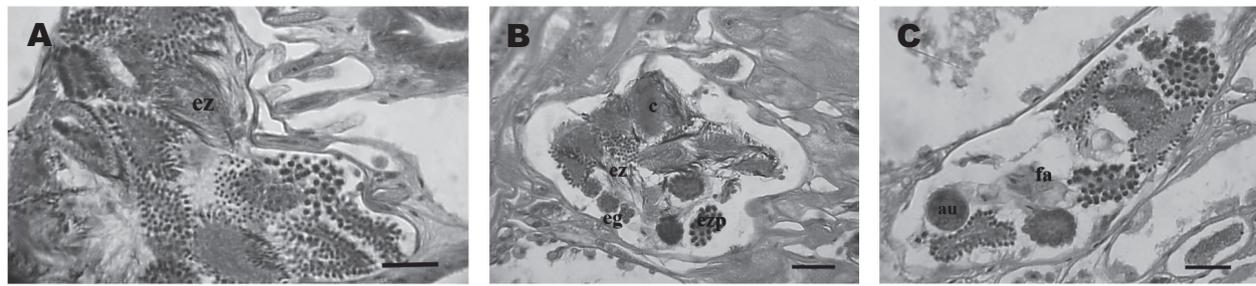
**Figura 1.** *Helobdella michaelsoni*: (A) Corte transversal del testisaco; (B) y (C) Etapa II de la espermatogénesis con espermatocitos en profase de la primera división meiótica; (D) Etapa II: espermatocitos primarios en metafase; (E) Etapa III: espermátides en la luz del testisaco. Obsérvese el aspecto granular del citóforo y el incremento de su talla al progresar la espermatogénesis. Célula mesotelial (m); embudo testicular (em); citóforo (c); espermatogonias (eg); espermatocitos en metafase (ec), espermatocitos en paquitene (ezp); espermatocitos en diacinesis (ecd); espermátides (et); espermatozoides (ez). Escala 50µm.

**Figure 1.** *Helobdella michaelsoni*: (A) Cross section of testisac; (B) y (C) Stage II of spermatogenesis with spermatocyte in prophase of the first meiotic division; (D) Stage II metaphase of primary spermatocytes; (E) Stage III spermatids in the lumen of testisacs. Look at the granular appearance of the cytophore and its size increasing as the spermatogenesis progresses. Mesotelial cells (m); testicular funnel (em); cytophore (c); spermatogonias (eg); metaphase of spermatocytes (ec), pachytene of spermatocytes (ezp); diakinesis of spermatocytes (ecd); spermatids (et); spermatozoo (ez). Escala 50µm.



**Figura 2.** *Helobdella michaelsoni*: (A) Etapa IV: citóforo antes y después de la reabsorción directa (autólisis); (B) Etapa IV: citóforo en autólisis con espermatozoides unidos al mismo; (C) Etapa V: testisaco postpuesta con procesos de reabsorción reaccional. Nótese los cambios del citóforo al culminar la espermatogénesis. Espermatogonias (eg); citóforo (c); embudo testicular (em); espermatozoides (ez); fagocitos (fa); autólisis (au); espermátides (et): Escala 50µm.

**Figure 2.** *Helobdella michaelsoni*: (A) Stage IV: cytophore before and after the direct reabsorption (autolysis); (B) Stage IV: cytophore autolysis process and spermatozoo connected to it; (C) Stage V: after spawn testisacs with reactive reabsorption process. Take notice of the cytophore changes at spermatogenesis end. Spermatogonias (eg); cytophore (c); testicular funnel (em); spermatozoo (ez); phagocytes (fa); autolysis (au); spermatids (et): Escala 50µm.



**Figura 3.** *Helobdella michaelsoni*: (A) y (B); Etapa V: Testisaco con espermatozoides unidos al citóforo y libres en la luz testicular; (C) Etapa V: testisaco post-puesta con citóforo en reabsorción. Nótese la presencia de fagocitos al culminar los procesos de reabsorción directa. Espermatogonias (eg); citóforo (c); espermatozoides (ez); fagocitos (fa); autólisis (au). Escala 50µm.

**Figura 3.** *Helobdella michaelsoni*: (A) y (B); Stage V: The testisacs shows some spermatozoo connected to cytophore and others free in its lumen; (C) Stage V: after spawn testisacs with reabsorption of the cytophore. The photo shows the presence of phagocytes at the end of direct reabsorption. Spermatogonias (eg); cytophore (c); pachytene of spermatocytes (ezp); spermatozoo (ez); phagocytes (fa); autolysis (au). Escala 50µm.

cinco etapas teniendo en cuenta la maduración de los elementos germinales y los cambios en el aspecto y volumen del citóforo. Al inicio de la espermatogénesis el diámetro del citóforo es menor a 10µm y se observan elementos inmaduros en división. A medida que progresa la espermatogénesis se produce un incremento gradual de su talla y cuando se inician los procesos de reabsorción, alcanza un diámetro de 50µm.

**Etapa I:** se caracteriza por la proliferación de elementos goniales. Las espermatogonias se dividen mitóticamente constituyendo poliplastos germinales. Las espermatogonias permanecen unidas al citóforo central que presenta un aspecto granular y no es muy voluminoso.

**Etapa II:** los espermatozoides inician la profase de la primera división meiótica. Sus características nucleares corresponden a las etapas de zigotene, paquítene y diacinesis. Por la división de los elementos germinales, el citóforo incrementa su volumen, tornándose más granular. En esta etapa, asimismo, se pueden observar espermatozoides con sus cromosomas en metafase o anafase (Figuras 1B y 1C).

**Etapa III:** se diferencia de la etapa precedente por la presencia de espermátides como los elementos más maduros del testisaco. En el inicio de esta

etapa, los núcleos de las espermátides se observan elípticos y la etapa culmina con el esbozo flagelar. El volumen del citóforo se estabiliza. Aún no se observan procesos de reabsorción directa.

**Etapa IV:** finaliza la espermiogénesis y los espermatozoides se liberan a la luz de los testisacos. Al comienzo de esta etapa los espermatozoides permanecen unidos al citóforo (Figuras 3A y 3B). Posteriormente, el citóforo experimenta un proceso de reabsorción que tiene lugar en dos etapas. Durante la primera (fase directa) se observan cuerpos acidófilos como consecuencia de los procesos de autólisis (Figuras 2A y 2B). En la segunda (fase reaccional) los remanentes de citóforo son reabsorbidos por los fagocitos configurando la reabsorción reaccional (Figura 2C). Los fagocitos son células de núcleo esférico basófilo y citoplasma con granulaciones eosinófilas (talla nuclear  $10,07 \pm 2,53 \mu\text{m}$  y citoplásmica de  $17,8 \pm 2,08 \mu\text{m}$ ). Los procesos de reabsorción directa y reaccional pueden también afectar a los elementos germinales no viables originados durante las sucesivas etapas de la espermatogénesis.

**Etapa V:** se desarrolla con posterioridad a la puesta. La espermatogénesis continúa pero sin llegar a formar nuevos espermatozoides ya que los nuevos poliplastos germinales son reabsorbidos por acción de los fagoci-

tos, de manera que no es posible la restauración gonadal (Figura 3C).

## Conclusiones y discusión

Durante la espermatogénesis de *Helobdella michaelsoni* no se observó la formación de espermatogonias a partir del epitelio del testisaco. La presencia de espermatogonias en individuos recién eclosionados permite sugerir un origen temprano a partir del cordón germinal primordial como sugiere Van Damme (1974) para *Erpobdella octoculata*, Bonnet y Molinas (1988) para *Helobdella stagnalis*, Fernández *et al.* (1992) para *Haementeria depressa* y Gullo (1995, 2004) para *H. triserialis* y *H. hyalina*. Con excepción de *Glossiphonia complanata* (Damas, 1968b), *Placobdella costata* (O'Donovan y Abraham, 1987) y *H. stagnalis* (Martínez Alós y García Corrales, 1988) en ninguna otra especie se había descrito la formación de elementos germinales por desdiferenciación de otras células especializadas.

Los cambios en el aspecto y volumen del citóforo observados en *H. michaelsoni* han sido descritos en otras especies: *G. complanata* (Damas, 1968b), *Dina lineata* (Bonnet y Molinas, 1988), *H. stagnalis* (Martínez Alós y García Corrales, 1988), *H.*

*triserialis* y *H. hyalina* (Gullo, 1995, 2004) y están vinculados a la maduración de los elementos germinales. A medida que se suceden las divisiones nucleares, el volumen de los núcleos disminuye incrementándose el volumen del citóforo y tornándose más granular. Según Fernández *et al.* (1992), el citóforo contiene numerosas organelas y su función es sincronizar la proliferación y diferenciación de los elementos germinales. Los procesos de reabsorción del citóforo en *Helobdella michaelsoni* comprenden dos fases: durante la primera (fase directa) se observaron cuerpos acidófilos fruto de autólisis, y los espermatozoides quedan libres en la luz de los testisacos. En la segunda (fase reaccional) los remanentes de citóforo son reabsorbidos por los fagocitos configurando la reabsorción reaccional. Estas observaciones fueron realizadas también en *H. triserialis* y *H. hyalina* (Gullo, 1995, 2004). A excepción de las tres especies citadas no se han descrito procesos de reabsorción directa en otras especies de hirudíneos. Por el contrario, varios autores (Bonnet y Molinas, 1988; Martínez Alós y García Corrales, 1988; Fernández *et al.*, 1992) reconocen la función macrofágica de los fagocitos en la remoción de los remanentes de citóforo.

## Referencias

- BONNET, S.; MOLINAS, M. 1988. Anatomía e histología del aparato reproductor de *Dina lineata* (Müller, 1974) (Hirudinea, Erpobdellidae). *Boletín Real Sociedad Española Historia Natural (Biología)*, **84**(1-2):73-89.
- DAMAS, D. 1965. Mode de nutrition des cellules mâles et femelles de *Glossiphonia complanata* L. (Hirudinée) durant la spermatogenèse et l'ovogenèse. *Bulletin de la Société zoologique de France*, **90**:337-338.
- DAMAS, D. 1966. Anatomie et histologie des canaux éjaculateurs de *Glossiphonia complanata* L. (Hirudinée, Rhyncobdelle). *Archives de Zoologie Experimentale et generale*, **107**:325-336.
- DAMAS, D. 1968a. Histochemie des canaux éjaculateurs de *Glossiphonia complanata* L. (Hirudinée, Rhyncobdelle). *Annals Histochemistry*, **13**:111-122.
- DAMAS, D. 1968b. Les cellules germinales mâles de *Glossiphonia complanata* (Hirudinée, Rhyncobdelle): Origine, evolution et structure. *Bulletin de la Société zoologique de France*, **93**:375-385.
- FERNÁNDEZ, J.; TÉLLEZ, V.; OLEA, N. 1992. Hirudinea. In: F.W. HARRISON; S.L. GARDINER (eds.), *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. New York, Willey-Liss Inc., vol. 7, p. 323-394.
- GABE, M. 1968. *Techniques histologiques*. Paris, Masson et Cie., 1113 p.
- GULLO, B.S. 1995. Microanatomía de la gónada y vías de evacuación masculinas de *Helobdella triserialis* (Hirudinea, Glossiphoniidae). *Neotropica*, **41**(105-106):67-75.
- GULLO, B.S. 2004. Histología del sistema reproductor masculino de *Helobdella hyalina* (Hirudinea, Glossiphoniidae) en Argentina. *Iheringia Serie Zoologia*, **94**(1):13-18.
- HESS, R.A. 1998. Spermatogenesis, Overview. In: E. KNOBIL; D. NEILL (eds.), *Encyclopedia of Reproduction*. San Diego, Academic Press, vol. 4, p. 539-545.
- MALECHA, J. 1975. Etude ultrastructurale de la espermiogenèse de *Psicola geometra* L. (Hirudinea Rhyncobdelle). *Journal Ultrastructure Research*, **51**(2):188-203.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5320\(75\)80147-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5320(75)80147-X)
- MARTÍNEZ ALÓS, S.; GARCÍA CORRALES, P. 1988. Anatomía e histología del aparato reproductor de *Helobdella stagnalis* L. (Annelida, Hirudinea, Rhyncobdellida, Glossiphoniidae). *Boletín Real Sociedad Española Historia Natural (Biología)*, **84**(1-2):15-31.
- O'DONOVAN, P.; ABRAHAM, M. 1987. Somatic tissue-male germ cells barrier in three hermaphrodite invertebrates: *Dugesia biblica* (Platyhelminthes), *Placobdella costata* (Annelida) *Levantina hierosolyma* (Mollusca). *Journal Morphology*, **192**(3):217-227.  
<http://dx.doi.org/10.1002/jmor.1051920304>
- RINGUELET, R. 1944. Revisión de los hirudíneos argentinos de los géneros *Helobdella*, *Batrachobdella*, *Cylicobdella* y *Semiscolex*. *Revista del Museo de La Plata (Nueva Serie). Sección Zoología*, **4**:5-94.
- VAN DAMME, N. 1974. Organogénèses de l'appareil genital chez la sangsue *Erpobdella octoculata* L. (Hirudinées; Pharyngobdelle). *Archives de Biologie*, **85**(3):373-397.

Submitted on September 29, 2009.  
Accepted on August 13, 2010.