

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

FACULTAD DE CIENCIAS
INSTITUTO DE EMBRIOLOGÍA

**ULTRAESTRUCTURA DE LA ESPERMIOGÉNESIS Y MORFOLOGÍA
ESPERMÁTICA DE *Ostrea chilensis* (Philipi, 1845).**

Memoria de Título presentada como parte de
los requisitos para optar al TÍTULO DE
MÉDICO VETRINARIO.

ERIKA ALEJANDRA ROJAS ERBETTA

VALDIVIA-CHILE

2004

PROFESOR PATROCINANTE:

Orlando Garrido O.

Nombre

_____ Firma

PROFESOR COPATROCINANTE:

Roberto Jaramillo

Nombre

_____ Firma

PROFESORES CALIFICADORES:

Jorge Correa S.

Nombre

_____ Firma

Carlos Farias R.

Nombre

_____ Firma

FECHA DE APROBACIÓN:

Con todo amor a mis padres, mi
hermana y mi pololo.

INDICE

CAPITULO	Página
1. RESUMEN	1
2. SUMARY	2
3. INTRODUCCION	3
4. MATERIAL Y METODOS	10
5. RESULTADOS	13
6. DISCUSION	23
7. CONCLUSIONES	27
8. BIBLIGRAFIA	28
9. ANEXOS	32
10. AGRADECIMIENTOS	37

1. RESUMEN.

La ostra chilena, *Ostrea chilensis*, es un molusco bivalvo que no presenta características sexuales secundarias y tiene una sexualidad de tipo hermafrodita simultánea. La descripción del ciclo reproductivo (Winter y col., 1982), permitió conocer la existencia de distintos tipos de células gaméticas durante el proceso de espermatogénesis.

Los espermatozoides de los moluscos en general son bastante simples en su estructura pero muy variados en forma y se han descrito el tipo I o primitivo y el tipo II o modificado. Por esto se realizó el estudio de la ultraestructura del espermatozoide de *Ostrea chilensis*.

Para ello se analizaron individuos maduros provenientes del banco natural del estuario del río Quempillén, Ancud, Chiloé. A cada ejemplar se le extrajo un trozo de gónada la que fue procesada para microscopía electrónica, tanto de transmisión (MET) como de barrido (MEB).

Durante la espermiogénesis de *Ostra chilensis* se pueden observar tres fases: espermátidas en periodo inicial que son células esféricas y en cuyo núcleo comienza la condensación de la cromatina. Las espermátidas intermedias que aún son células esféricas en las que comienza la formación del acrosoma y en el núcleo continúa la condensación granular de la cromatina, al final de la fase el núcleo adquiere forma ovalada, se produce la reducción del citoplasma, polarización completa de la célula y el nacimiento del flagelo. Las espermátidas tardías presentan núcleos ovalados, la cromatina casi ha completado su condensación y compactación, en la base del mismo se ubican cinco mitocondrias esféricas.

Los rasgos morfológicos ultraestructurales del espermatozoide siguen un patrón general con una cabeza cónica/oval, un complejo acrosomal, una pieza media formada por un anillo simple alrededor de un par de centriolos y un flagelo típico (axonema de 9+2 microtúbulos), rodeados por membrana plasmática, cuya longitud total es de 30,15 μm aproximadamente.

El espermatozoide de *Ostra chilensis* se puede clasificar dentro del grupo de tipo I o primitivo (Franzén, 1955) para los invertebrados acuáticos. Este tipo de espermatozoide es característico de las especies con fecundación externa.

Palabras claves: *Ostrea chilensis*, espermátidas, espermatozoide, tipo I o primitivo y tipo II o modificado.

2. SUMMARY

The Chilean oyster (*Ostrea chilensis*) is a bivalve molusc which has no external secondary sexual organs however is recognized as a simultaneous hermaphrodite species. Studies on the reproductive cycle (Winter et al., 1982) described a number of different maturation stages on the spermatogenesis.

Molusc spermatozoa are quite simple on its external structure but with a wide variety of shape thus, a type I or primitive and type II or modified have been described. These particular features of bivalves spermatozoa makes interesting to study the ultrastructure of the Chilean oyster since no previous studies have been done.

Mature individuals from the Quempillen river, Ancud, Chiloe were studied. Gonads were processed for Transmission and Scanning Electron Microscopy.

During the spermiogenesis of *Ostrea chilensis*, three different phases has been shown. An early stage with spheric cells whose nucleus started chromatin condensation. The middle stage, is still characterized by spherical cells but the acrosome formation have started, the chromatin is more condensed than previous stage. Late spermatids exhibited nucleus with rounded shape and the chromatin condensation is almost completed. The cell cytoplasm has been reduced, the spermatid has a polarized structure since the acrosome is opposite to the tail, which has already started its formation and in the base of the tail five round mitochondria are located.

The ultrastructural characteristic of the mature spermatozoa of the Chilean oyster follows the pattern for spermatozoa type I, meaning head with rounded to conical shape, an acrosome, a middle piece formed by a simple annulus with 5 mitochondria around a simple tail with (9+2) axoneme all covered by a plasmatic membrane.

The Chilean oyster spermatozoa can be classified as a Type I or primitive spermatozoa (Franzen, 1955) which is characteristic for species having external fertilization.

Keywords: *Ostrea chilensis*, bivalve, spermatids, spermatozoa, primitive.

3. INTRODUCCIÓN

Los moluscos son animales invertebrados de cuerpo blando, protegidos por una concha de naturaleza calcárea y de forma diferente según la clase a la que pertenezcan. Una de las clases más importante de este fillum son los bivalvos o pelecípodos, que son animales que presentan pie en forma de hacha como su nombre lo indica (griego *pelekys*= hacha y *pous*= podos, pie). En este grupo se incluyen especies tales como: *Chlamys purpurata* (ostión), *Eurhomalea rufa* (almeja), *Mesodesma donacium* (macha), *Ensis macha* (Huepos), *Mytilus chilensis* (chorito), *Ostrea chilensis* (ostra), entre otros.

Uno de los moluscos bivalvos de importancia comercial en nuestro país es la "Ostra" *Ostrea chilensis*. Esta especie se encuentra distribuida geográficamente (según Dall, 1908; en Solis y Eberhard, 1979), desde la Isla de Chiloé en Chile hasta las costas del Ecuador, mientras que batimétricamente se le sitúa entre el mareal inferior hasta los ocho metros de profundidad (Solis y Eberhard, 1979). Su extracción se realiza principalmente entre la Isla de Chiloé y las Islas Guaitecas, en Chile (Solis y Eberhard, 1979).

La mayoría de los bivalvos son gonocóricos (sexos separados), éstos no presentan caracteres sexuales externos que permitan establecer si los individuos son machos o hembras, existen algunas especies que son hermafroditas protándricos (los individuos primero maduran como machos y luego como hembras). *Ostrea chilensis* (Solis, 1967) no es una excepción y el establecimiento de la condición sexual de las ostras sólo es posible mediante observación de la gónada madura. Solis (1967), señala que la gónada en el macho presenta un color blanquecino, de textura lisa o con granulaciones finas, en tanto en las hembras, la coloración es blanco cremoso y de aspecto granuloso o reticular. Gleisner (1981) y Götting y col. (1985) señalan que *Ostrea chilensis*, tendría, en general una sexualidad consecutiva rítmica. Aunque estudios recientes sugieren que esta especie presentaría un comportamiento hermafrodita simultáneo (Saavedra, 2002).

Las características histológicas del sistema gonadal de *O. chilensis*, muestra que las gónadas izquierda y derecha se ubican entre la masa visceral del sistema digestivo y el epitelio del manto, encontrándose inmersas en tejido conectivo. El tejido gonadal consiste de folículos tubulares, que se ramifican debajo del manto. Los folículos se abren hacia los ductos localizados en la periferia del manto, debajo de una capa de tejido conectivo que tiene un grosor variable. Los ductos confluyen a los gonoductos izquierdo y derecho, desembocando en las cámaras suprabranquiales a través de los poros genitales. Tanto la parte más distal de las paredes foliculares como los ductos y gonoductos, constan de un epitelio ciliado que ayuda a evacuar los gametos maduros. El epitelio germinativo es plano y adelgaza progresivamente en el tiempo, a medida que disminuye la multiplicación de las células germinales primordiales. En estudios recientes se detectó que dentro de un mismo acino folicular se presenta maduración simultánea de gametos masculinos y femeninos,

emitiendo al mismo tiempo gametos de ambos sexos en un mismo individuo (Saavedra, 2002).

La descripción del ciclo reproductivo de *O. chilensis* (Winter y col. , 1982), permitió conocer la existencia de distintos tipos de células gaméticas durante el proceso de la espermatogénesis, las que incluyen:

1. Células germinales primordiales: de forma globular con claro núcleo vesicular, de gran tamaño, con uno o dos nucléolos. Al dividirse mitoticamente dan origen a las espermatogonias.
2. Espermatogonias: de forma globular y de tamaño menor que las células germinales primordiales debido a la reducción del citoplasma. El núcleo, es más basófilo que el de las células anteriores. Las espermatogonias primarias crecen y se dividen dando origen a las espermatogonias secundarias, que se diferencian en espermatocitos primarios.
3. Espermatocitos primarios: son algo más pequeños que las espermatogonias, de forma globular y con núcleo grande muy basófilo. La cromatina se dispone en la periferia del núcleo y toma aspecto de herradura. Por división meiótica dan origen a los espermatocitos secundarios.
4. Espermatocitos secundarios: son comparativamente más pequeños que los anteriores, por reducción del tamaño nuclear, de forma globular, con muy poco citoplasma y con núcleo muy basófilo y la cromatina formando grumos densos. Estos al dividirse meioticamente dan origen a las espermátidas haploides.
5. Espermátidas: son muy pequeñas, con núcleo globular muy basófilo, que ocupa la mayor parte de la célula. Estas deben ingresar a un proceso de espermiogénesis, eso es, la diferenciación en espermatozoides maduros.
6. Espermatozoide: el cuerpo celular es muy pequeño y marcadamente basófilo. Forman agrupaciones esféricas; con sus flagelos visibles, orientados hacia el centro del lumen folicular. De acuerdo a observaciones hechas por Coe (1932 a) en *O. lurida*, de Riffo y Avilés (1974) en *O. chilensis*, es posible que cada una de estas agrupaciones de espermatozoides se originen por sucesivas mitosis de una espermatogonia inicial.

Los espermatozoides de los moluscos son bastantes simples en su estructura, sin embargo, son muy variados en forma. En la monografía de Bacetti y Afzelius (1976) acerca de la morfología espermática, se distinguen cuatro tipos de espermatozoides maduros: primitivo, modificado, biflagelado y aflagelado. En el caso de los moluscos se

han descrito los tipos primitivo y modificado. El espermatozoide primitivo esta formado por la cabeza de forma cónica que contiene al acrosoma y el núcleo; la pieza media que consiste en unas pocas mitocondrias que forman un solo anillo alrededor de dos centriolos y la cola es de forma convencional (compuesta por un axonema, 9+2 microtúbulos). Este tipo de espermatozoides es producido por especies que liberan sus gametos al agua, en donde ocurre la fecundación (Franzén, 1955); como en los Pelecípoda, arqueogastropodos y escafofoda.

El espermatozoide de tipo modificado consta de una cabeza alargada con una pieza media formada por varios anillos mitocondriales y la cola compuesta por un axonema (9+2 microtúbulos), la que además contiene un set extra de nueve elementos accesorios, las fibras densas. Este tipo de espermatozoide es producido por especies que tienen fecundación interna (Franzén, 1955); como en las clases Gastropoda y Cefalopoda.

En general, el espermatozoide maduro de los moluscos exhibe:

1. Complejo acrosomal: compuesto por la vesícula acrosomal y la substancia subacrosomal. La vesícula acrosomal se origina generalmente de un gránulo proacrosomal, que deriva de uno o más complejos de Golgi. El gránulo se hace visible en la espermátida. El acrosoma esta usualmente situado en la cabeza del espermatozoide.

En el espermatozoide de tipo primitivo, el acrosoma es generalmente largo y de forma cónica e incluye en su estructura un cuerpo axial externo, que penetra en la membrana acrosomal anterior. Sin embargo, en algunas especies de *Mytilus*, *Crassostrea*, *Spisula* y *Dreissenia*; ésta no se extendería dentro de la masa nuclear.

En los espermatozoides de tipo modificado existe una fosa centriolar que se extiende hacia la punta del núcleo, en ella se puede extender la sustancia subacrosomal, por ejemplo en *Haliotis* (Lewis et al., 1980).

2. Núcleo: durante la espermiogénesis la cromatina es condensada, los poros de la envoltura nuclear desaparecen, las dos láminas de la membrana se adhieren y la forma del núcleo puede cambiar considerablemente.

En los espermatozoides primitivos de los bivalvos, el núcleo no es homogéneamente electro-denso, puede variar desde formas casi esféricas, ovoides, cónicas, figura de barril o figura de lápiz hasta formas alargadas, estrechas y curvas (Popham, 1979). En el espermatozoide modificado, se han encontrado formas de columna, enrollados helicoidalmente o núcleos cilíndricos (Koike y Nishiwaki, 1980). En el núcleo cilíndrico, la fosa centriolar se extiende hacia la verdadera punta del núcleo, formando un

canal intranuclear. Este tipo fue encontrado en *Littorina* (Buckland-Nicks and Chia, 1976) y en algunos bivalvos (Popham, 1979).

Los procesos más comúnmente sugeridos de ser responsables de la forma del núcleo son: la condensación de la cromatina (Fawcett et al., 1971; West, 1978) y la formación de un 'manchette' de microtúbulos alrededor del núcleo, el que puede extenderse anteriormente sobre el acrosoma y posteriormente dentro de la pieza media (Shileiko y Danilova, 1979; Kohnert, 1980). Dan y Takaichi (1979), argumentan que la función del manchette es incluir y mantener en su lugar los organelos esenciales mientras el material superfluo es desechado durante la espermiogénesis.

Existen tres patrones de condensación de cromatina: granular, fibrilar y lamelar (Yasuzumi, 1974). En la primera el estado usual es una granulación fina en el núcleo y esta limitada a aquellas especies donde el núcleo tiene forma columnar como en *Mytilus*, *Crassostrea* y *Dreissenia*.

El segundo tipo de condensación de cromatina presente en Prosobranchia, como *Patella vulgata* y *Chorus giganteus* (Jaramillo et al., 1986), y puede ser observado en Cefalópoda, en que primero ocurre la fase granular seguida por la formación de fibras o filamentos orientadas longitudinalmente dispuestos en forma irregular que gradualmente engrosan por fusión de los mismos en laminas radiales al canal endonuclear, en la agregación final la cromatina lamelar pierde su apariencia radial y se cambia para formar laminillas densas concéntricas al canal endonuclear, presentando un estado electro-denso homogéneo en el espermatozoide maduro.

Finalmente la tercera forma de condensación se presenta en las espermátidas de Neogastropoda y Mesogastropoda, donde la cromatina pasa por las dos fases anteriores, primero formando fibras orientadas longitudinalmente dentro de la cromatina y luego laminillas transitorias orientadas radialmente entre las dos porciones de la envoltura nuclear. Las laminillas después son dispuestas longitudinalmente de forma helicoidal, posteriormente son adheridas más estrechamente de modo que el espacio intranuclear desaparece y el diámetro se reduce progresivamente, pasando así el núcleo de forma de columna a una forma trihelicoidal donde la forma lamelar se pierde y el núcleo maduro presenta una estructura homogéneamente electro-densa.

El 'manchette' es un anillo de microtubúlos que rodea el núcleo y que aparece durante algunos de los estados de desarrollo de los espermatozoides modificados. En los moluscos, el 'manchette' no está presente en los espermatozoides modificados de los Neogastropoda y Mesogastropoda en que la elongación del núcleo ocurre sin la presencia de estructuras accesorias externas aparentes. Se observa su presencia en la espermátida de Cefalópoda, durante los estados finales de elongación nuclear y con cromatina fibrilar típica. En *Octopoda* y *Eledone* el núcleo maduro tiene forma helicoidal, y durante los estados finales de maduración nuclear el 'manchette' originalmente orientado

longitudinalmente también asume una disposición helicoidal exactamente similar a la del núcleo.

3. Mitocondrias: en el espermatozoide de tipo primitivo, la pieza media contiene una o pocas mitocondrias, las cuales son probablemente formadas por la fusión de varias mitocondrias pequeñas.

En el espermatozoide de tipo modificado, las mitocondrias se desarrollan dentro de una estructura más elaborada llamada el condrioma (André, 1962), la formación de éste comienza con la fusión de las mitocondrias durante la etapa de espermatida, las que posteriormente se elongan y pueden formar uno o más espirales alrededor del axonema flagelar o una vaina cilíndrica.

En moluscos se pueden distinguir seis patrones de organización mitocondrial. La forma simple ocurre en el espermatozoide de tipo primitivo de los bivalvos, gastrópodos y probablemente otros grupos con espermatozoide primitivo. En los Octopoda, Decapoda y Nautiloidea se muestra un patrón diferente de reorganización mitocondrial en cada uno, mientras los dos tipos de gastrópodos con espermatozoides modificados muestran también dos patrones de reorganización.

En la espermatida de los bivalvos y arqueogastrópodos, las mitocondrias están dispersas en el citoplasma. Como resultado de la condensación nuclear, un número de mitocondrias son agregadas en el polo nuclear posterior y fusionadas para formar cuatro o cinco mitocondrias globulares grandes; conservando su organización en el espermatozoide, como es documentado en *Mytilus* (Longo y Dornfield, 1967; Galangau, 1969) y *Crassostrea* (Galstoff y Philpott, 1960).

Un modelo simple de organización ocurre en los Decapoda, como es mostrado en *Eusepia*, *Loligo* y *Alloteuthis* (Maxwell, 1975b); no implica modificación de la estructura mitocondrial, sino una reubicación dentro de la célula y se desarrolla una membrana plasmática especializada unida a la pieza media, en la base del núcleo en la espermatida. En los Octopodos hay una marcada fusión mitocondrial durante la espermiogénesis.

4. Centríolos: en el comienzo de la espermiogénesis, están presentes dos centriolos. En el espermatozoide primitivo, ambos centriolos se conservan y están posicionados en el ángulo derecho; el centriolo proximal está orientado perpendicular al axonema y el distal en línea con el axonema formando el cuerpo basal del flagelo. En el espermatozoide de tipo modificado, en cambio, el centriolo proximal se ha desintegrado en muchas especies. En *Octopus* y *Eledone* está presente un centriolo simple (Longo y Evertt, 1970), que se ubica en una fosa centriolar basal, del centriolo emergen las fibras del axonema que se extiende posteriormente.

En ostras, las fibras que se extienden desde el centriolo distal aparentemente actúan como un aparato que ancla el centriolo a la membrana citoplasmática (Galstsoff and Philpott, 1960). En *Crassostrea* sólo el centriolo distal está presente (Galstsoff and Philpott, 1960).

5. Flagelo: el espermatozoide típico de los moluscos posee un flagelo. El axonema dentro del flagelo consiste de un par de microtúbulos centrales rodeados por nueve dobletes, limitados por la membrana celular, la organización característica de los microtúbulos es perdida cerca de la punta flagelar, en los espermatozoides de tipo primitivo. Pocas desviaciones de este patrón general han sido reportadas en los moluscos.

En el espermatozoide modificado el flagelo es típico con un axonema (9+2 fibras) rodeado por nueve fibras gruesas que son envainadas por una capa de gránulos de glucógeno y finalmente por la membrana celular, las fibras son perdidas distalmente cerca de la punta, primero las gruesas y luego las del axonema; por ejemplo en algunos gastrópodos, como *Helix* (Anderson y Persone, 1969), en Decapoda y Nautilus.

La revisión bibliográfica previamente presentada nos permite ver que aunque existe mucha información respecto a la diferenciación espermatocítica de los moluscos, los antecedentes respecto a nuestra especie son escasos. Es por esta razón que se propone el estudio de la ultraestructura del espermatozoide maduro de *O. chilensis*, en donde la hipótesis es:

“Los eventos que se producen en la espermiogénesis serían similares a la de otros moluscos bivalvos, originando un espermatozoide tipo I o primitivo. Este espermatozoide tendría características específicas, aún cuando, seguiría el patrón general de los moluscos bivalvos que fecundan en el medio acuático.”

Basándose en esta hipótesis se proponen los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Caracterizar la espermiogénesis y la morfología espermática de *Ostrea chilensis*, considerando aspectos adaptativos y taxonómicos del gameto masculino.

Objetivos específicos:

Estudiar los cambios de la morfología de las espermatidas durante la etapa de maduración hacia espermatozoide (espermiogénesis) de *Ostrea chilensis*.

Determinar los rasgos morfológicos ultraestructurales primitivos y derivados del espermatozoide maduro de *Ostrea chilensis*.

Clasificar el espermatozoide maduro de *Ostrea chilensis*, según Franzén (1955)

Establecer las implicaciones morfofuncionales, filogenéticas y taxonómicas de este gameto.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1. AREA DE ESTUDIO.

El estudio se realizó, utilizando especímenes provenientes del banco natural de *Ostrea chilensis*, ubicado en el estuario del Río Quempillén, en el norte de la Isla de Chiloé (41° 52' S; 73° 46' O).

4.2. PROCEDIMIENTO EN LABORATORIO.

Los ejemplares colectados fueron transportados en cajas termoestables, hasta el laboratorio de Histología del Instituto de Embriología de la Universidad Austral de Chile en Valdivia.

En el laboratorio, cada ejemplar de *Ostrea chilensis* fue desconchado para posteriormente proceder a extraer las gónadas. Estas fueron cortadas en pequeños trozos para realizar el procedimiento histológico correspondiente.

4.2.1. Procedimientos histológicos.

4.2.2. Microscopía electrónica de transmisión (MET) (Mercer, 1974).

Para obtener las preparaciones histológicas, se fijaron pequeños trozos de gónada en glutaraldehído 2% por 24 horas, para luego ser procesadas según protocolo N° 1 (anexos), para finalmente ser observadas en el microscopio electrónico de transmisión.

4.2.3. Microscopía electrónica de Barrido (MEB).

Para obtener las preparaciones histológicas, se obtuvo muestras de espermatozoides a partir del sobrenadante de las muestras fijadas en glutaraldehído 2%. Posteriormente se realizaron frotis de los espermatozoides en un cubreobjetos, éstos fueron tratados según el protocolo N° 2 (anexos), para su posterior análisis en el microscopio de barrido.

4.2.4. Microscopía óptica.

Con el propósito de visualizar el DNA y la tubulina de los espermatozoides, se realizó un frotis sobre portaobjetos, los que fueron teñidos con DAPI (4,6 diamino- 2-fenilindol), para microscopía de epifluorescencia (Thombes y col., 1992), procedimiento realizado según protocolo N° 3 (anexos).

4.3. ANALISIS DE LAS MUESTRAS.

4.3.1. Microscopía electrónica de transmisión.

Con la finalidad de poder determinar la ultraestructura de los espermatozoides de *Ostrea chilensis*, después de incluidas las muestras se obtuvo cortes semifinos de 1µm de espesor, en un ultramicrotomo SORVAL MT-1, que fueron teñidos con azul de toluidina-bórax para ser observados en microscopio óptico corriente para ubicar las zonas de interés. Una vez ubicadas estas zonas se obtuvo cortes finos de 60-90µm de espesor, en el mismo ultramicrotomo, los que fueron montados en grillas de cobre descubiertas y luego teñidas con acetato de uranilo 2% por 2 minutos, después se tiñeron con citrato de plomo (Glauter, 1965) por 2 minutos y finalmente observadas en un microscopio electrónico Phillips 300 o Hitachi H-700, procediendo a tomar las placas correspondientes a las zonas de interés en los cortes.

4.3.2. Microscopía electrónica de barrido.

Para determinar la morfología externa de los espermatozoides maduros de *Ostrea chilensis*, una vez listos los preparados histológicos para MEB, se llevaron al Instituto de Histología donde fueron observados en el microscopio electrónico de barrido Mod. LEO 420, procediendo a tomar las placas de interés para el estudio.

4.3.4. Mediciones con pie de metro.

Para la estimación de las medidas tanto de las espermátidas como de los espermatozoides maduros de *Ostrea chilensis*, se realizaron mediciones con un pie de metro en las fotografías de MET, para lo que se realizaron cálculos tomando las ampliaciones totales en las fotos y las medidas tomadas con el pie de metro de modo que el resultado obtenido se entrega en µm, siendo el resultado el promedio como dato aproximado.

Formulas:

MET Hitachi H-700:

$$\frac{\text{Medida en mm foto}}{\text{Medida en mm negativo}} = \text{Veces aumento imagen}$$

$$\text{Veces aumento imagen} * \text{aumento en negativo} = \text{Aumento total}$$

$$\frac{\text{Medida en mm foto}}{\text{Aumento total}} = \text{Medida en } \mu\text{m.}$$

MET Phillips 300:

$$\frac{\text{Medida en mm foto}}{\text{Medida en mm negativo}} = \text{Veces aumento imagen}$$

$$\text{Veces aumento imagen} * \text{medida escala} = \text{Aumento total}$$

$$\frac{\text{Medida en mm foto}}{\text{Aumento total}} = \text{Medida en } \mu\text{m}$$

La información de aumento en las fotos del MET Hitachi H-700 se encuentra en los negativos y la información de aumento de las fotos del MET Phillips 300 se encuentra en una tabla en el anexo (tabla N° 1).

5. RESULTADOS

5.1 CAMBIOS MORFOLOGICOS DURANTE LA ESPERMIOGENESIS.

En la figura 1 se observan espermátocitos donde la célula es redonda y el núcleo es grande ocupando casi la totalidad del tamaño celular, con un diámetro aproximado de $2,73\mu\text{m}$, la cromatina en el interior se presenta formando grumos densos heterogéneamente distribuidos.

La espermiogénesis en gónadas de *Ostrea chilensis* fue estudiada ultraestructuralmente y el proceso fue dividido en tres fases:

Fase 1: espermátidas en periodo inicial, caracterizado por una célula pequeña y esférica con un diámetro aproximado de $8,46\mu\text{m}$, con abundante citoplasma en el que sobresale la presencia de un gran núcleo ovalado que ocupa la mitad del tamaño celular, tiene aproximadamente un diámetro de $3,75\mu\text{m}$. En su interior la cromatina comienza el proceso de condensación desde la periferia del núcleo tomando aspecto de herradura. También puede observarse la presencia de mitocondrias ubicadas en la cercanía del núcleo y vacuolas dispersas en el citoplasma (fig.2 A).

Al continuar el proceso de maduración las espermátidas muestran células esféricas con un núcleo redondo que tiene un diámetro aproximado de $2,13\mu\text{m}$, y ocupa casi la totalidad de la célula. Continúa la condensación de la cromatina, observándose una fina granulación y dispersión homogénea de la misma. En el citoplasma se nota la presencia de las mitocondrias dispersas y cercanas al núcleo (fig.2 B).

Fase 2: espermátidas intermedias, continúan siendo células esféricas pero de menor tamaño con un diámetro aproximado $3,21\mu\text{m}$, debido a una fuerte reducción del citoplasma. En esta fase comienza la formación del acrosoma con la aparición de un granulo proacrosomal sobre el núcleo, pero aún no se observa polarización celular ya que podemos notar las mitocondrias dispersa en el citoplasma. El núcleo ocupa casi la totalidad del tamaño celular, de forma esférica con un diámetro aproximado de $2,27\mu\text{m}$ y en su interior prosigue la condensación de la cromatina de forma granular (fig. 3 C), notándose una mayor cohesión entre los gránulos de manera que se observan algunas zonas más oscuras que parecen manchas en el centro y periferia del mismo.

Las espermátidas continúan su maduración mostrando células esféricas con un diámetro aproximado de $3,57\mu\text{m}$; con un núcleo redondo de mayor tamaño que en las células anteriores y que tiene un diámetro de $2,46\mu\text{m}$ aproximadamente, en su interior

sigue la condensación de la cromatina observándose ahora una mayor densidad del material que se torna electrodenso, en forma de herradura en el borde del mismo y que en la región central deja zonas claras donde puede observarse una fina granulación distribuida en forma homogénea. La formación del acrosoma prosigue ubicándose en el futuro extremo apical del núcleo, observándose una pequeña invaginación del núcleo justo bajo el granulo proacrosomal, esta invaginación dará origen posteriormente a la fosa subacrosomal. Podemos notar la polarización celular ya que tanto el proacrosoma como las mitocondrias se ubican en polos opuestos, las mitocondrias son agrupadas en la vecindad de la base nuclear formando un anillo simple correspondiente al desarrollo de la pieza media. También se puede observar la presencia de los dos centriolos ubicados en el mismo polo de la célula que las mitocondrias y que tienen una orientación perpendicular uno respecto del otro; del centriolo distal que se encuentra en línea con el axonema comienza el nacimiento del flagelo (fig. 3 D).

En el final de esta fase comienzan su paso a espermátidas tardías; donde las células toman una forma ovalada, ya que la membrana citoplasmática sigue la forma del núcleo debido a la reducción del citoplasma. Los núcleos son ovalados con un diámetro de $2,06\mu\text{m}$ aproximadamente, en su interior la cromatina muestra una mayor condensación y compactación pero aún se observan zonas claras, el material se distribuye de forma homogénea y es más electrodenso. El desarrollo del acrosoma muestra la formación de dos compartimentos, una fosa subacrosomal y la vesícula acrosomal. La célula muestra polarización completa, con el acrosoma y mitocondrias en polos opuestos y su posición definitiva, además vemos a los dos centriolos ubicados en medio del anillo mitocondrial (fig. 3 E).

Fase 3: espermátidas tardías, se observan núcleos ovalados que tienen un alto de $1,59\mu\text{m}$ y un diámetro de $1,63\mu\text{m}$ aproximadamente; en su interior la cromatina casi ha completado su condensación y compactación, mostrando el material electrodenso. En el complejo acrosomal que mide $0,76\mu\text{m}$ de alto aproximadamente (desde la base de la fosa subacrosomal), podemos distinguir los dos compartimentos, la fosa subacrosomal cuya base tiene un ancho aproximado de $0,26\mu\text{m}$ y su ancho superior aproximado es de $0,45\mu\text{m}$, y la vesícula acrosomal. En la base del núcleo se ubican las mitocondrias esféricas que tienen un diámetro de $0,49\mu\text{m}$ aproximadamente, formando un anillo simple compuesto de cinco mitocondrias distinguiéndose entre ellas los centriolos distal y proximal, con su orientación perpendicular. Se puede observar que el flagelo esta constituido por el típico arreglo de 9+2 microtúbulos, descrito para los moluscos bivalvos (fig.4 F).

5.2 RASGOS MORFOLOGICOS ULTRAESTRUCTURALES.

5.2.1 ESPERMATOZOIDE DE *Ostrea chilensis*.

La ultraestructura del espermatozoide maduro de *Ostrea chilensis* presenta un patrón general que consiste en una cabeza que contiene el complejo acrosomal en el extremo apical, pieza media y región de la cola o flagelo, encontrándose estas estructuras rodeadas por la membrana plasmática, la que se encuentra adherida a la superficie del espermatozoide, cuya longitud total es de 30,15 μm , con un rango entre 30,1-30,2 μm , aproximadamente (Fig. 5 G).

La **cabeza** es de forma semiesférica y mide aproximadamente 1,88 μm , con un rango entre 1,78-1,92 μm , en su eje más largo (desde la base del núcleo hasta la punta del acrosoma) y 1,63 μm de diámetro (Fig. 5 H y I, 8 N). En su parte superior presenta el **complejo acrosomal** compuesto por una **fosa subacrosomica** y el **acrosoma** de forma cónica y que se ubica en el extremo apical del espermatozoide. La **fosa subacrosomica** mide 0,38 μm aproximadamente en su parte superior y 0,2 μm aproximadamente en la base o su parte inferior y contiene la substancia subacrosomal. El **acrosoma** mide 0,52 μm de alto (desde la base de la fosa subacrosomal) aproximadamente, se observa que está compuesto por dos vesículas unidas mediante una estructura compuesta de laminillas, se encuentra separado de la substancia subacrosomal gracias a la membrana que rodea la vesícula acrosomal (Fig. 5 H).

El **núcleo** mide aproximadamente 1,29 μm de alto y 1,63 μm de diámetro, ocupando todo el espacio de la cabeza, el aspecto del contenido nuclear es compacto y homogéneo, la cromatina se observa fuertemente condensada y electrodensa (Fig. 5 H). En la parte basal del núcleo se observa una pequeña depresión equivalente a una fosa que aloja el complejo centriolar, compuesto de dos centriolos uno proximal y otro distal que corresponde al cuerpo basal del flagelo, y al axonema (fig.5 H y I).

La **pieza media** está constituida por cinco mitocondrias esféricas y que no se encuentran fusionadas, formando un anillo simple, periférico y completo alrededor de un par de centriolos del mismo tamaño y el axonema (Fig.6 J); la **pieza media** tiene aproximadamente un diámetro de 1,1 μm y un largo de 0,48 μm (Fig.5 G), cada mitocondria tiene un diámetro aproximado de 0,43 μm en promedio. Se observan gránulos de glucógeno en el espacio intermitocondrial y perimitocondrial (Fig.6 J y K)

El **flagelo** tiene la organización típica eucariótica, compuesta por el axonema de 9+2 microtúbulos, con un diámetro aproximado de 0,2 μm y una longitud de 27,84 μm (Fig.2 B, 5 G y fig.6 J).

En algunos casos se observó la liberación de grupos de espermatozoides a la cavidad paleal, unidos a nivel de la cabeza, que se orientan hacia el centro del grupo y con los flagelos libres. Estos últimos presentaban alta motilidad. (Fig. 7 y 8 M).

En la figura 8 M se observan cabezas de espermatozoides muy marcadas y agrupadas y no se observan los flagelos dado que poseen una gran cantidad de tubulina en su estructura.

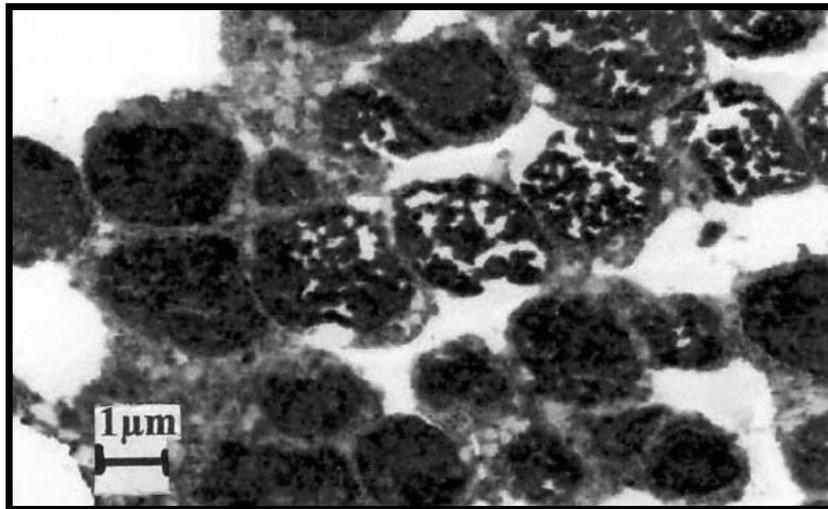


Figura 1. Ultraestructura de espermatocitos de *O. chilensis*. Corte transversal. MET. A 4000 X. Obsérvese la cromatina dispuesta en gránulos al interior del núcleo.

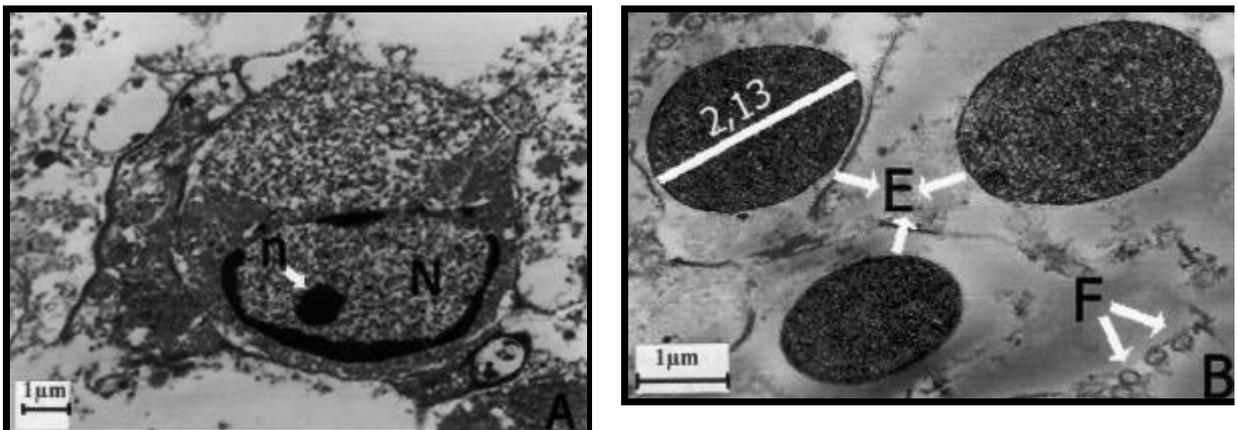


Figura 2. Cambios durante la espermiogénesis en *O. chilensis*, espermatidas en periodo inicial. A. Corte transversal. MET. A 8400 X; núcleo (N), nucleolo (n). B. Corte transversal a nivel de núcleo. MET. A 10000 X; obsérvese la reducción en el tamaño nuclear, espermatidas (E), flagelos (F).

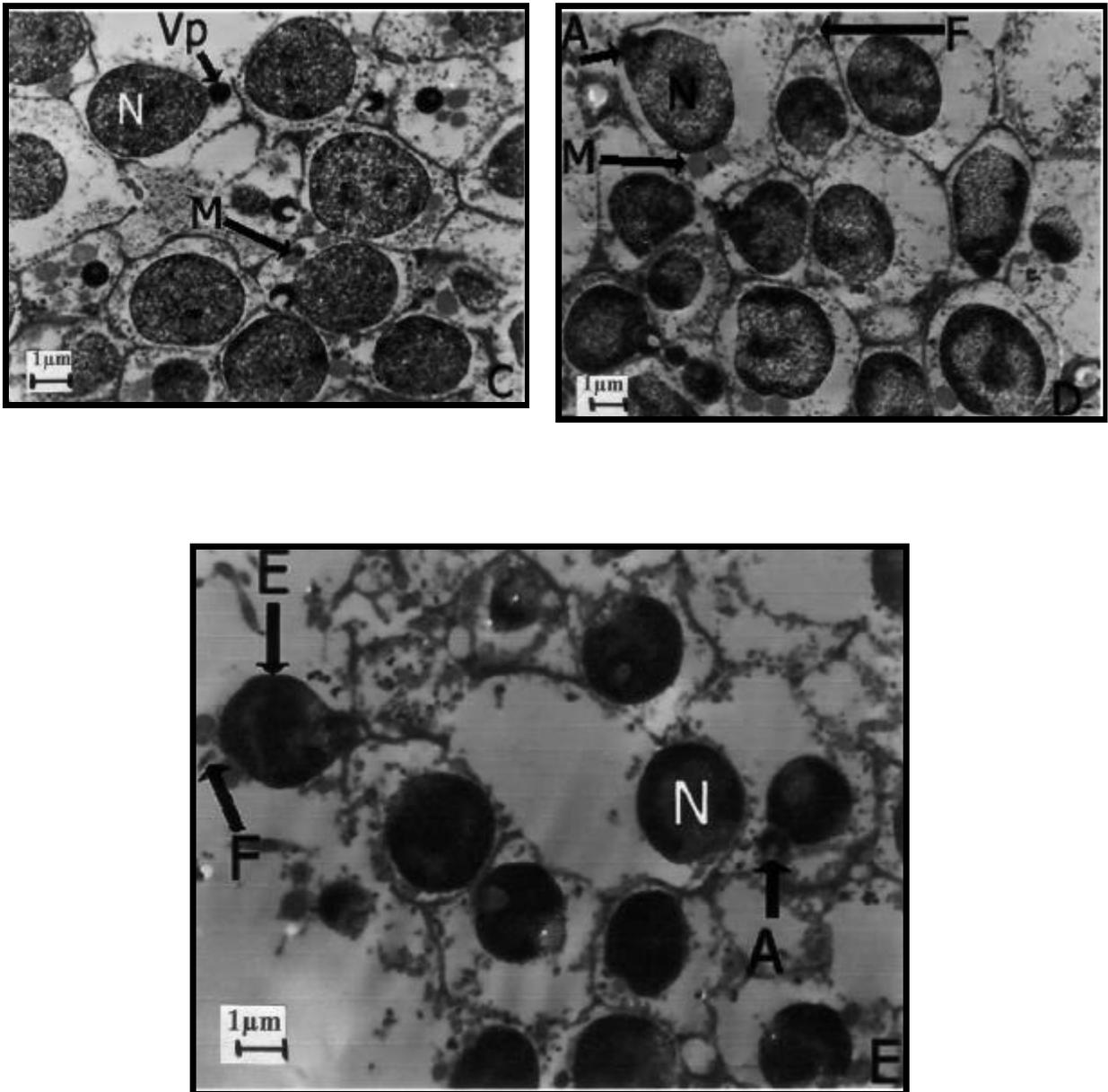


Figura 3. Espermátidas en periodo intermedio. **C.** Sección de gónada. MET. A 8560 X; obsérvese la presencia de la vesícula proacrosomal (Vp), núcleo (N) y mitocondrias (M) dispersas en el citoplasma. **D.** Corte transversal. MET. A 8680 X; notese la polarización celular. Acrosoma (A), núcleo (N), mitocondrias (M) y la presencia de flagelos (F). **E.** Corte longitudinal. MET. A 8120 X; observese la mayor condensación de la cromatina en el núcleo (N), acrosoma (A),espermio (E) y el nacimiento del flagelo (F).

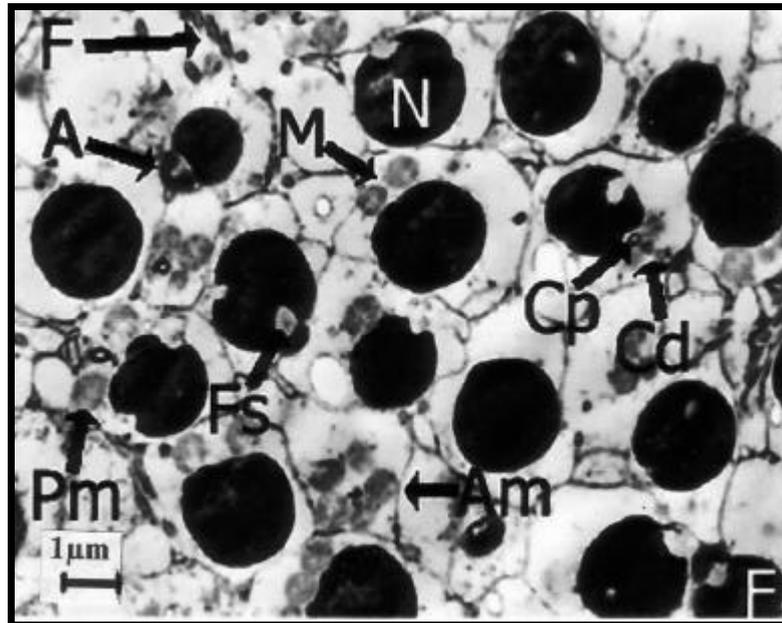


Figura 4. Espermátidas tardías. F. MET. A 10360 X; acrosoma (A), fosa subacrosomal (Fs), note se la condensación de la cromatina en el núcleo (N), el material se torna electrodenso; la pieza media (PM) esta constituido por el anillo mitocondrial (Am), las mitocondrias (M) son esféricas; centriolo proximal (Cp), centriolo distal (Cd) y flagelos (F).

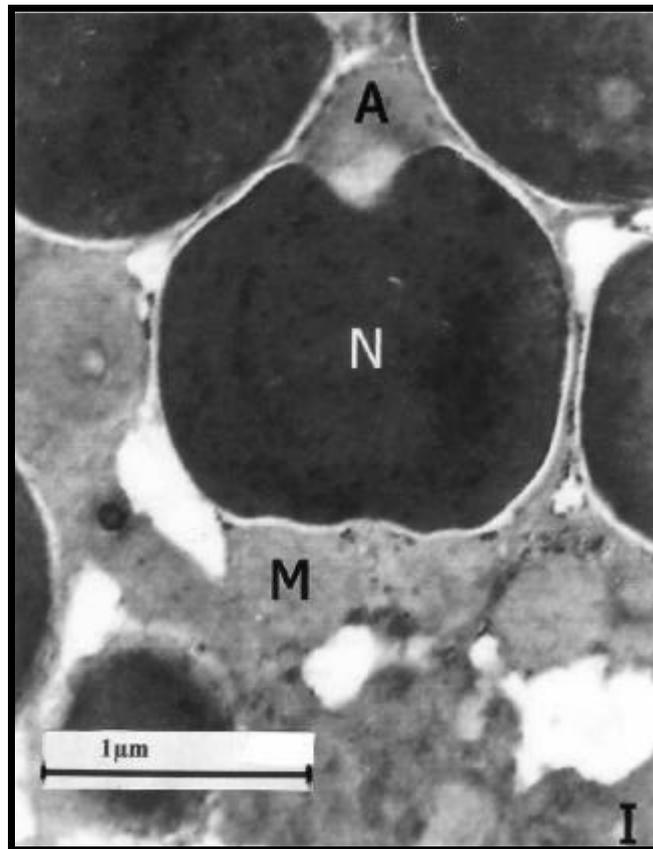
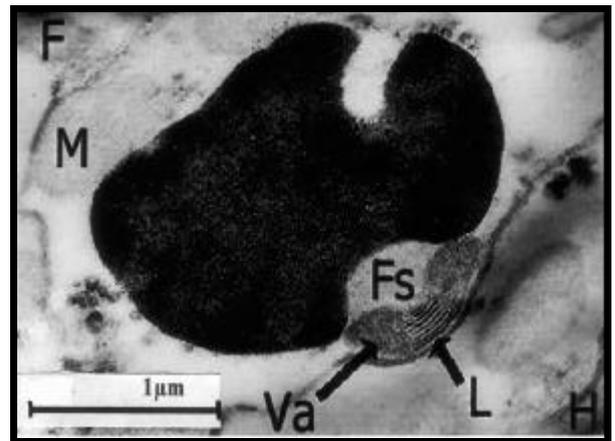
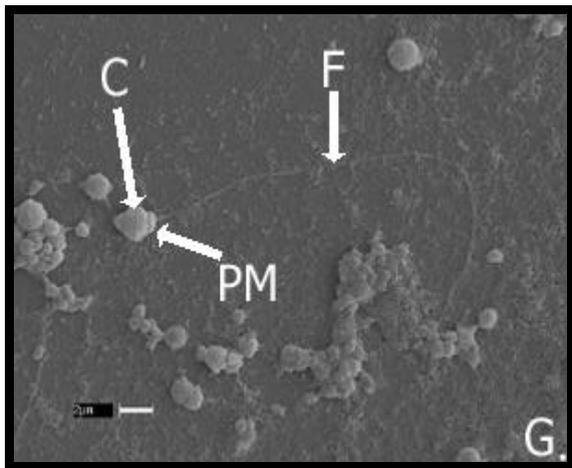


Figura 5. Ultraestructura del espermatozoide de *Ostrea chilensis*. **G.** Frotis de espermatozoides. MEB. Cabeza (C), pieza media (PM) y flagelo (F). **H.** Corte longitudinal de espermatozoide a nivel de cabeza y pieza media. MET. A 18000 X; vesícula acrosomal (Va), fosa subacrosomal (Fs), laminillas (L), núcleo (N), mitocondrias (M) y flagelo (F). **I.** Corte longitudinal. MET. A 33370 X; acrosoma (A), núcleo (N) y mitocondrias (M).

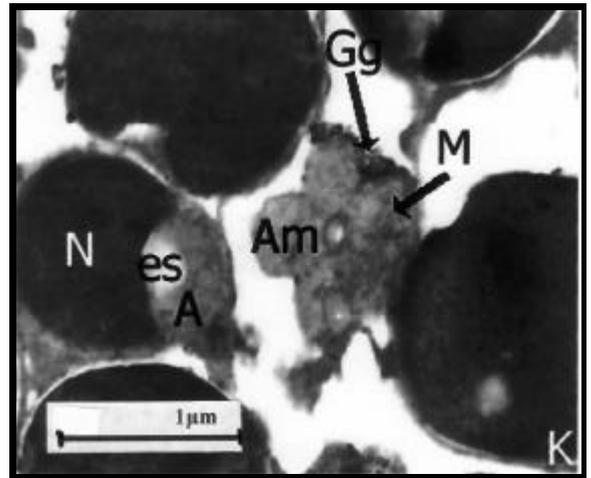
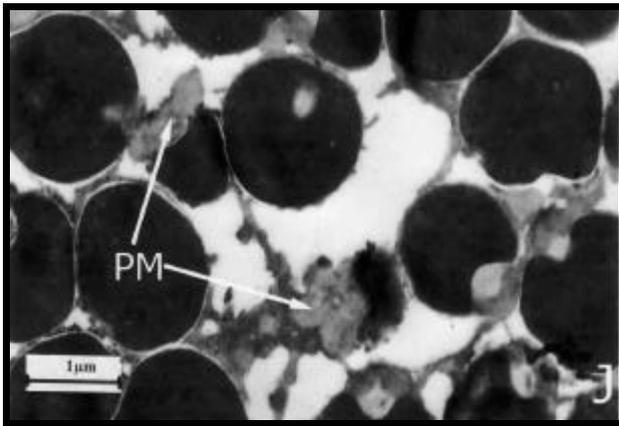


Figura 6. Ultraestructura de la pieza media del espermatozoide de *O. chilensis*. **J.** Corte transversal. MET. A 14200 X; pieza media (PM). **K.** Corte transversal. MET. A 34080 X; acrosoma (A) espacio subacrosomal (es), núcleo (N), anillo mitocondrial (Am), mitocondrias (M) y gránulos de glicogeno (Gg).

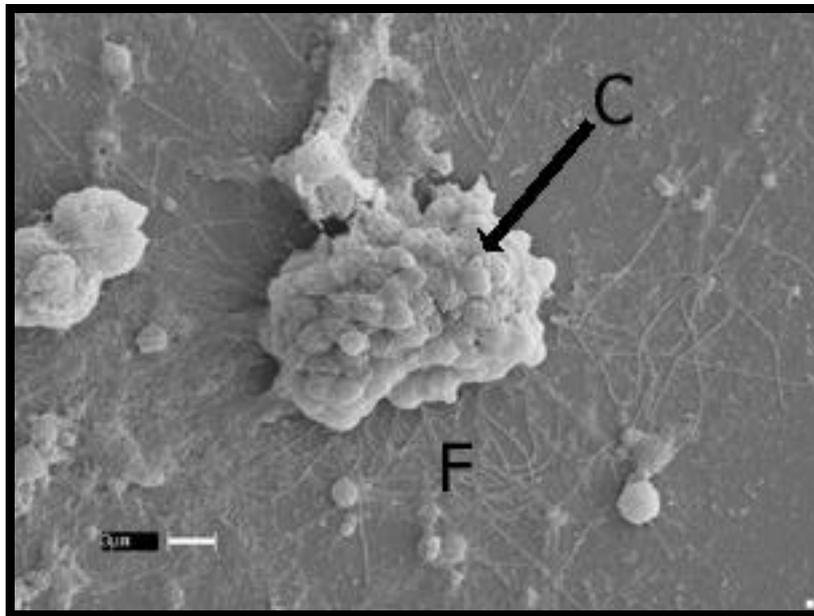


Figura 7. Ultraestructura del espermatozoide de *O. chilensis*. Frotis de espermatozoides. MEB. Espermatozoides liberados en grupo a la cavidad paleal. Cabeza (C) y flagelos (F).



Figura 8. Espermatozoides de *Ostra chilensis*. Frotis de espermatozoides teñidos con DAPI. **M.** Se visualiza una alta fluorescencia al nivel de las cabezas de un grupo de espermatozoides liberados a la cavidad paleal. **N.** Cabezas de espermatozoides, se destaca la forma esférica de sus cabezas, no se visualiza el flagelo.

6. DISCUSION

El molusco bivalvo *Ostrea chilensis* es un fertilizador externo, lo que predice espermatozoides primitivos con adaptaciones a la existencia libre en el agua. El presente estudio permite discutir lo descrito sobre el espermatozoide en cuestión comparándolo con espermatozoides de otras especies de bivalvos.

La espermiogénesis en *Ostrea chilensis* muestra características similares a la de otros moluscos, en que los grandes cambios morfológicos en la célula ocurren durante la etapa de espermátida, con la condensación granular de la cromatina nuclear, que es típica de los moluscos bivalvos (Maxwell et al., 1983); la formación del acrosoma a partir de un granulo proacrosomal y la organización de las mitocondrias en la base del núcleo para el posterior desarrollo de la pieza media.

En cuanto al espermatozoide, este se caracteriza por presentar un patrón morfológico de tipo I o primitivo, típico de las especies con fecundación externa de acuerdo con la clasificación de Franzén (1955) para invertebrados acuáticos y el cual ha sido definido como acuaespermatozoide según Jamieson (1987). La estructura general del gameto se ajusta además al patrón morfológico descrito por Pophan (1979) para los moluscos bivalvos (núcleo cónico/oval, acrosoma de complejidad variable, pieza media compuesta de 4 - 5 mitocondrias rodeando un par de centriolos y la presencia de un flagelo simple).

Al comparar la morfología del espermatozoide de *O. chilensis* con los espermatozoides de otros moluscos bivalvos, podemos observar que presentan características similares, pero también algunas que le son propias a cada especie.

El tamaño del espermatozoide de *O. chilensis* es más pequeño que el de otros bivalvos, por ejemplo en *Crassostrea virginica* tienen una longitud de 40µm (Galtsoff y Philpott, 1960), 58µm en *Nucula sulcata*; 50µm en mitilidos como *Chorus chorus*, 66.6µm *Aulacomya ater* y 33.3µm de longitud en *Mytilus chilensis*.

La forma de la cabeza del espermatozoide de *O. chilensis* es casi esférica, contiene el complejo acrosomal (compuesto por 2 compartimentos: la vesícula acrosómica y la fosa subacrosomal) de forma cónica ubicado en el extremo apical del espermatozoide y el núcleo presenta una forma oval; además la vesícula acrosomal presenta una estructura compuesta por laminillas que unen ambas porciones de la vesícula, lo que no es descrito en otros moluscos bivalvos, siendo esta entonces una característica propia de la especie. En los espermatozoides de mitilidos como en *Ch. chorus* la cabeza es de forma cónica y con un promedio de 4,3µm de longitud, cuyo acrosoma está formado por tres compartimentos:

un anillo anular basal, una vesícula cónica plana y una vesícula apical; en *A. ater* la cabeza también tiene forma cónica y mide 6,3µm de longitud. En el espermatozoo de *Mytilus chilensis* se puede observar un acrosoma desarrollado compuesto por dos compartimentos: vesícula acrosómica o vesícula plana y el anillo basal. En las ostras espinosas (Spondylidae, bivalvia) el núcleo exhibe una forma de círculo piriforme y en su parte superior presenta una depresión sobre la cual se ubica el acrosoma, en el que la vesícula acrosómica es cónica y tiene una invaginación basal (Healy y col., 2001).

En los moluscos con espermatozoide tipo I primitivo el acrosoma posee una estructura llamada rod axial o perforatorium externo, que en *Mytilus* se origina en la pieza media y se incluye dentro de un canal endonuclear extendiéndose a través del núcleo hasta el margen apical del espacio subacrosómico, siendo similar en *Crassostrea*, *Spisula* y *dreissenia* (Galtsoff y Philpott, 1960; Longo y Dornfield, 1967; y Galangau, 1969). Puede ocurrir también en especies de bivalvos que el rod axial este presente por instantes como en *Nucula hartvigiana* (Popham y Marshall, 1977); *Anomia descripta* y *Myodora brevis* (Popham, 1979). Un amplio número de bivalvos carecen de esta estructura, dentro de estas se encuentran las ostras espinosas (spondylidae). En el espermatozoide de *O. chilensis* no se observó la presencia de esta estructura. Popham y Marshall (1977) y Popham (1979) sugieren que la ausencia del rod axial en el acrosoma representa una condición de bivalvo primitivo.

El núcleo del espermatozoide de tipo primitivo no es homogéneamente electrodenso. En el caso de *O. chilensis* en el núcleo se observa la cromatina homogéneamente electrodenso y fuertemente condensada. En mytilidos el núcleo posee condensación de la cromatina de tipo granular, típica de los moluscos bivalvos; *Chorus chorus* el núcleo es esférico con 1,7µm en diámetro y esta compuesto de gruesos gránulos de heterocromatina. El núcleo de *Aulacomya ater* posee una muy baja opacidad electrónica y mide 2,4µm en longitud y 2,1µm de diámetro máximo en su región media. En *S. Algosus* el núcleo tiene forma de pera, mide 1,4µm de diámetro máximo.

La pieza media del espermatozoide de los moluscos bivalvos esta compuesta por un anillo de 4 -5 mitocondrias generalmente esféricas alrededor de un par de centriolos. Las mitocondrias dejan impresiones marcadas en la superficie nuclear con una elevación leve en la región de los centriolos; lo anterior lo podemos observar claramente en el espermatozoide de *Ostrea chilensis*. Las ostras espinosas presentan en la base del núcleo 4 depresiones donde se acomoda la pieza media compuesta por 4 mitocondrias esféricas y los centriolos proximal y distal, que están orientados perpendicularmente el uno al otro, una corta banda conecta el centriolo proximal a la fosa nuclear, mientras que el centriolo distal, que forma el cuerpo basal del axonema flagelar es anclado a la membrana plasmática por nueve fibras satélite. Sin embargo, en *Crassostrea* sólo esta presente el centriolo distal (Galtsoff y Philpott, 1960), asociado a este último se encuentran brazos de material irradiado formando el complejo centriolar satélite pero su desarrollo no es marcado como en otras especies.

En mitilidos como *Chorus chorus* la pieza media esta poco desarrollada pero posee la estructura típica de los espermatozoides primitivos compuesta por un anillo de 4-5 mitocondrias esféricas (cada una con un diámetro de 1,2 μ m y rodeadas por una doble membrana) con un diámetro de 1,94 μ m, que rodean ambos centriolos y complejo pericentriolar. En *Aulacomya ater* la pieza media también consiste de 45 mitocondrias (diámetro total de 1,8 μ m) rodeando un par de centriolos. En *Mytilus chilensis* la pieza media tiene un diámetro de 1,3 μ m y cada mitocondria un diámetro de 0,88 μ m. En *P. purpuratus* la pieza media tiene un diámetro de 1,6 μ m, pero las mitocondrias son radialmente aprisionadas y en los cortes transversos ellas aparecen con forma triangular a diferencia de los otros gametos donde su forma es típicamente esférica. Un hallazgo similar fue descrito por Hodgson y Foster (1992) en espermatozoides examinados de moluscos gastrópodos del género *Fissurella*. Este patrón de arreglo puede ser relacionado con un incremento en la superficie de contacto e intercambio entre ellas. En mitilidos de aguas salobres la pieza media tiene 6 mitocondrias esféricas, se pueden observar gránulos de glicógeno entre las mitocondrias mientras en el centro del anillo se ubican los centriolos proximal y distal.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente en relación a la cantidad de mitocondrias que componen la pieza media de los diferentes gametos nombrados, podríamos presumir que los espermatozoides que actúan en el medio acuático prescinden de un sistema de producción energética (mitocondrias) más desarrollado y de un aparato motor más complejo, ya que las condiciones físicas de un medio de baja densidad permitirían un desplazamiento más fácil.

El flagelo del espermatozoide de tipo primitivo es simple y se origina desde el centriolo distal que forma su cuerpo basal. Se encuentra formado por un par de microtúbulos centrales rodeado de 9 pares de microtúbulos, limitado por la membrana celular. Este patrón se presenta en los moluscos bivalvos antes mencionados. En mytilidos como *Chorus chorus* tiene un diámetro de 0,27 μ m, en *Aulacomya ater* un diámetro de 0,29 μ m y *Mytilus chilensis* 0,23 μ m.

Diversos autores (Popham, 1979; Bacetti, 1979; Adiyodi y Adiyodi, 1983; Franzén, 1983) sugieren que cuando se realiza una correcta evaluación de la ultraestructura del espermatozoo, esta puede ser utilizada para propósitos taxonómicos o como una ayuda para la identificación de invertebrados. Algunos trabajos sobre dos especies estrechamente relacionadas de *Mytilus*, *Mytilus edulis* (Linnaeus) y *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck); esto ha mostrado ser así (Hodgson y Bernard, 1986), pero aunque estos mytilidos son difíciles de separar en base ha características de su concha ellos son fácilmente separados utilizando la morfología de sus espermatozoides.

Finalmente debemos referirnos a la sexualidad de bs moluscos bivalvos y como sabemos estos en su mayoría son gonocóricos, es decir, presentan sexos separados. Sin embargo en *Ostrea chilensis* se ha observado una sexualidad de tipo hermafrodita simultáneo ya que la gónada de ambos sexos aparece madura y por lo tanto funcional al

mismo tiempo y en un mismo individuo. Este tipo de sexualidad también ha sido observada en otros bivalvos mytilidos. El hermafroditismo simultáneo ha sido explicado por algunos autores a través del llamado "modelo de baja densidad" (Ghiselin, 1969, 1987). Dicho modelo asume que el hermafroditismo simultáneo sería adaptativo bajo condiciones en las cuales es difícil para un individuo encontrar una pareja del sexo opuesto (por ejemplo, especies sésiles con individuos de distribución discontinua o en parches, o especies con poblaciones poco densas y de baja movilidad de sus miembros). Gerritsen (1980) propone que la densidad poblacional mínima para la reproducción sexual exitosa en una especie hermafrodita, es la mitad de aquella para una población bisexual; incrementos en la tasa de mortalidad pueden afectar fuertemente esta densidad crítica y favorecer así la evolución de hermafroditismo.

Al presentarse hermafroditismo simultáneo en *Ostrea chilensis*, se plantea la posibilidad de que exista autofecundación (Saavedra, 2002), lo cual abre una gran interrogante respecto a la reproducción de este recurso y con ello el desafío de realizar futuras investigaciones que permitan dilucidar las respuestas a este enigma. Además sería de gran interés tanto científico como para los productores de esta especie en forma comercial, los que podrían verse beneficiados con los datos que arrojen futuros estudios en relación con la reproducción de esta especie nativa.

7. CONCLUSIONES

- Los principales cambios morfológicos en la célula germinal masculina ocurren durante el proceso de espermiogénesis en la etapa de espermatida, con la condensación granular de la cromatina nuclear, formación del acrosoma y desarrollo de la pieza media.
- La ultraestructura del espermatozoide de *Ostrea chilensis* muestra un espermatozoide de 30,15 μm en promedio de longitud, cabeza oval/cónica cuyo eje más largo mide aproximadamente 1,88 μm , un complejo acrosomal, una pieza media formada por un anillo simple alrededor de un par de centriolos y un flagelo típico (axonema de 9+2 microtúbulos).
- El complejo acrosomal está formado por el acrosoma que se compone de dos vesículas, las cuales se encuentran unidas mediante una estructura compuesta de laminillas, y una fosa subacrosomal.
- El espermatozoide de *Ostrea chilensis* dada sus principales características morfológicas se enmarca dentro del grupo de los espermatozoides tipo I o primitivos según la clasificación de Franzén (1955) para los invertebrados acuáticos.
- El espermatozoide de *Ostrea chilensis* corresponde a un gameto de tipo I o primitivo, si bien sigue un patrón general posee características que le son propias, lo cual permite el estudio comparativo con otras especies similares dentro del género al que pertenece, lo que facilitaría su diferenciación por ejemplo con *Ostrea lurida* y además permite realizar una mejor diferenciación taxonómica del recurso bivalvo.

8. BIBLIOGRAFIA

- ADIYODI, K. G.; ADIYODI, R. G. 1983. Reproductive Biology of Invertebrates. Volume II: Spermatogenesis and Sperm Function.
- ANDRE, J. 1962. Contribution a la connaissance du chondriom: Etude de ses modifications ultrastructurales pendant la spermatogenese. J. Ultrastruct. Res. Suppl. 3, 1-85.
- ANDERSON, W.; PERSONE, P. 1969. Structure and histochemistry of the basal body, neck and axoneme of spermatozoa of *Helix aspersa*. J. Microsc. Biol. Cell. 8: 87-96.
- BACCETTI, B.; AFZELIUS, B. A. 1976. "The biology of sperm cell". Monogr. Dev. Biol. Vol. 10. Karger. Basel.
- BACCETTI, B. 1979. The evolution of the acrosomal complex. Pp.: 305-329. In: D. W. Fawcett and J. M. Bedford (eds.), The spermatozoon. Urban and Swartzenberg: Baltimore.
- BUCKLAND-NICKS, J.; CHIA, F. 1976. Spermatogenesis of a marine snail, *Littorina sitkana*. Cell. Tissue. Res. 170, 455-475.
- DAN, I.; TAKAISHI, S. 1979. Spermiogenesis in the pulmonate snail, *Euhadra hickonis*. III. Flagellum formation. Dev. Growth Differ. 21, 71-86.
- FAWCETT, D. W.; ANDERSON, W.; PHILLIPS, D. 1971. Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head. Dev. Biol. 26, 220-251.
- FRANZEN, A. 1955. Comparative morphological investigations into the spermiogenesis among Mollusca. Zool. Biol. Anim. 13, 135-143.
- FRANZEN, A. 1983. Ultrastructural studies of spermatozoa in three bivalve species with notes on evolution of elongated sperm nucleus in primitive spermatozoa. Gamete. Res. 7: 199-214.
- GALANGAU, V. 1969. 'Étude en microscopie électronique de la gamétogenèse de *Milax gagates* Draparnaud 1801 (Gastéropodes—Pulmonés—Limacidae); Evolution des ultrastructures au cours de la spermatogenese chez different types de mollusques', Doctoral thesis, University of Montpellier, Faculty of Science.
- GALTSOFF, P.; PHILPOTT, D. 1960. Ultrastructure of the spermatozoon of the oyster, *Crassostrea virginica*. J. Ultrastruct. Res. 3, 241-253.
- GERRITSEN, J. 1980. Sex and parthenogenesis in sparse populations. The American Naturalist, 115: 718 - 742.

- GHISELIN, M. T. 1969. The evolution of hermafroditism among animals. *The Quarterly Review of Biology*, 44: 189-208.
- GHISELIN, M. T. 1987. Evolutionary aspects of marine invertebrate reproduction. In: *Reproduction of Marine Invertebrates, Vol. IX: General Aspects; Seeking Unity in Diversity*, A. C. Geise et al. (eds.), Blackwell Scientific Publications, California, pp.609-665.
- GLAUTER, A. M.; R. H. GLAUTER. 1958. Araldite as an embedding for electron microscopy. *J. Biolophys. Biochem. Cytochem.* , 4: 191.
- GLAUTER, A. M. 1965. Section staining cytology, autoradiography and immunochimistry For biology specimens. In.: B. Kay. (Ed.). *Techniques for electron microscop.* Oxford y Edinburg. 254-310.
- GLEISNER, A. 1981. Ciclo reproductivo y desarrollo larval de *Ostrea chilensis* Philippi (Bivalvia, Ostreidae) en el estuario de Quempillén, Chiloé. Tesis Med. Veterinaria. Univ. Austral de Chile. 43 pp.
- GÖTTING, K. J., J. TORO und J. WINTER. 1985. Biotische und abiotische grundlagen für massenkulturen der Chilenischen austed (*Ostrea chilensis* PHIL.) im Südem Chiles. *Verh Dtsch. Zool. Ges.* 78: 181 pp.
- HEALY, J. M.; BUCKLAND-NICKS, J.A.; J AMIESON, B. G. M. 2001. Spermatozoal ultrastructure of spiny oyster (Spondylidae, Bivalvia) including a comparison with other bivalves. *Invertebrate reproduction and development.* 40 (1): 27-37.
- HODGSON, A. N. and R. T. F. BERNARD. 1986. Observations on the ultrastructure of the spermatozoon of two mytilids from the south-west coast of England. *Jour. Mar. assoc. U. K.* 66: 385-390.
- HODGSON, A. N.; FOSTER, G. G. 1992. Structure of the sperm of some South African archaeogastropods (Mollusca) from the superfamilies Haliotoidea, Fissurelloidea and Trochoidea. *Mar. Biol.* 113: 89-97.
- JAMIESON, B. G. M. 1987. A biological classification of sperm types, with special reference to Annelids and Mollusc, and an example of spermiocladistics. In: *New Horizons in Sperm Cell Research*, Mohri, H. (ed.), Japan Scientific Societies Press. Tokyo, pp. 311 - 332.
- JARAMILLO, R.; GARRIDO, O. y JORQUERA, B. 1986. Ultrastructural analysis of Spermiogenesis and Sperm Morphology in *Chorus giganteus* (Lesson, 1829) (Prosobranchia: Muricidae). *The Veliger* 29 (2): 217-225.
- KOHNERT, R. 1980. Zum spermiendimorphismus der Prosobranchier: spermiogenese und ultrastrukturelle Aufbauder spermien von *Bithynia tentacula* (L.). *Zool. Anz.* 205, 145-161.

- KOIKE, K.; NISHIWAKI, S. 1980. The ultrastructure of dimorphic spermatozoa in two species the *Stombidae* (Gastropoda: Prosobranchia). *Venus* (Jnp. J. Malacol.). 38, 259-274.
- LEWIS, C.; LEIGHTON, D.; VACQUIER, V. 1980. Morphology of Abalone spermatozoa before and after the acrosome reaction. *J. Ultrastruct. Res.* 72, 39-46.
- LONGO, F. J.; DORNFIELD, E. 1967. The fine structure of the spermatid differentiation in the mussel, *Mytilus edulis* *J. Ultrastr. Res.* 20, 462-480.
- LONGO, F. J.; EVERTT, A. 1970. Structural and cytochemical features of the sperm of the cephalopod *Octopus bumaculatus*. *J. Ultrastr. Res.* 32, 94 -106.
- MAXWELL, W. L. 1975 b. Spermiogenesis of *Eusepia officinalis* (L.), *Loligo forbesi* (Steenstrup) and *Alloteuthis subulata* (L.) (Cephalopoda, Decapoda). *Proc. roy. Soc. London B.* 191, 527-535.
- MAXWELL, W. L. 1983. Mollusca. In: *Reproductive Biology of Invertebrates, Vol. II, Spermatogenesis and Sperm Function*, K. G. Adiyodi and R. G. Adiyodi (eds.), Wiley, New York, pp. 275 – 319.
- MERCER, E. H.; M. S.CC. BIRBECK. 1974. *Manual de microscopía electrónica para biólogos*. 1ª Ed., Ed. Blume. Barcelona.
- POPHAM, J. D. 1979. Comparative spermatozoon morphology and bivalve phylogeny. *Malacol. Rev.* 12, 1-120.
- POPHAM, J. D.; MARSHALL, B. 1977. The fine structure of the spermatozoon of the protobranch bivalve *Nucula hartvigiana* Pfeiffer. *Veliger*, 19: 431-433.
- RIFFO, M.; AVILES, S. 1974. Estructura gonádica y madures sexual de *Ostra chilensis* Philipi. XVII Reunión Anual de la Sociedad Biológica de Chile. Concepción, Chile. Pag. 39.
- SAAVEDRA, Y. 2002. Estudio del ciclo gonadal y determinación de la fecundidad potencial de *Ostrea chilensis* en el estuario de Quempillén Ancud, Chiloé. Tesis Med. Veterinaria. Univ. Austral de Chile. 44 pp.
- SHELEIKO, L.; DANILOVA, L. 1979. Ultrastructure of spermatozoa in pulmonate mollusc. *Trichia hispida* y *Succinea putris*. *Ontogenez.* 10, 437-447.
- SOLIS, I. 1967. Observaciones biológicas en ostras (*Ostrea chilensis*, Philipi) de Pullinque. *Biol. Pesq. Chile.* 2: 51-82.
- SOLIS, L.; EBERHARD, P. 1979. Ostra. *Ostra chilensis*, Philipi Lamellibranchia Anisomyaria Ostreidae. 1-30. In. Corfo-Infop (Ed.) Estado actual de las principales pesquerías nacionales. Bases para un desarrollo pesquero. Moluscos.

- THOMBES, R.; SIMERLY, C.; SCHATTEN, G. 1992. Meiosis egg activation, and Nuclear envelope breakdown are differentially reliant on Ca⁺⁺. Whereas germinal vesicle breakdown is Ca⁺⁺ independent in the mouse oocyte. J. Cell Biol. 117: 799 - 811.
- WEST, D. L. 1978^a. Reproductive biology of Colus stimpsoni (Prosobranchia: Buccinidae). II. Spermiogenesis. Veliger. 21, 1-9.
- WINTER, J., GALLARDO, C.; TORO, J.; GLEISNER, A.; ARAYA, J. 1982. Estudios biológicos básicos para el cultivo de Ostrea chilensis en el estuario de Quempillén, Chiloé. Parte II: ciclo reproductivo y desarrollo larval.

9. Anexos

PROTOCOLO N° 1.

1. Fijación de la muestra: Glutaraldeído 2% por 24 horas.

Calculo: Glutaraldeído 25%	0,8 cc
Buffer fosfato 0,2M.	<u>9,2 cc</u>
Glutaraldeído 2%	10,0cc

2. Lavado en buffer fosfato 2 veces por 10 min. (2 cambios).

3. Postfijación en tetróxido de osmio (OsO₄) 1% (50% buffer cacodilato y 50% osmio) por 2 horas o hasta que el tejido tomara la dureza suficiente y coloración negra.

4. Batería de deshidratación.

Alcohol 80° por 15 minutos (una vez).

Alcohol 96° por 15 minutos (una vez).

Alcohol 100° por 15 minutos (alcohol puro MERCK, 2 veces).

Acetona pura por 10 minutos y otra por 15 minutos.

5. Inclusión.

a) 50% araldita (Glauter y col. , 1958) y 50% acetona por 2 horas a temperatura ambiente.

b) Araldita (plástico puro) por 2 horas a temperatura ambiente.

c) Araldita (plástico puro) por 24-48 horas en estufa a 56° C, para la polimerización del plástico.

Mezcla estándar.

Compuesto	Cantidad
Araldita CY 212(M)	20ml (23,0g).
DDSA	22ml (22,0g).
BDMA (C.3%)	1,1ml (1,2g).

PROTOCOLO N° 2

1. Una vez fijadas las muestras se prepararon frotis de espermatozoides en cubreobjetos.

2. Batería de deshidratación

Alcohol 80° por 5 minutos.

Alcohol 90° por 5 minutos.

Alcohol 100° por 5 minutos y por 10 minutos.

Acetona pura por 5 minutos y otra por 15 minutos.

3. Secar las muestras al aire.

4. Metalizar las muestras por ionización, para lo cual se montan en un porta especímenes.

Cubrir con película de oro de 100 Armstrong de espesor por medio de un ionizador (marca Eiko IB - 2) en una cámara de vacío.

PROTOCOLO N° 3

1. Una vez fijadas las muestras se prepararon frotis de espermatozoides en un porta objetos.

2. Secar al aire.

3. teñir por 5 minutos en solución de 2,5 µg/ml de DAPI en buffer fosfato 0,2 M pH 7,2.

4. Montar un cubreobjetos, sin secar.

5. Observar inmediatamente en el microscopio de epifluorescencia con luz ultravioleta transmitida.

Las preparaciones pueden ser guardadas hasta por 48 horas si se toma la precaución de sellar los bordes del cubreobjetos con algun barniz.

TABLA N° 1. Escala de medidas de aumento del MET Phillips 300.

POSICION	MEDIDA
1	2800
2	3400
3	4000
4	4900
5	6000
6	7100
7	9000
8	11000
9	14000
10	18000
11	22000
12	28000
13	35000
14	45000
15	53000
16	70000

TABLA N° 2: Calculo de medidas en micras, de las espermátidas y el espermatozoide de *O. chilensis*.

Células	Partes	Medidas en micras (µm)	N° muestras	Promedio
Espermatocitos		54,6	20	2,73
Espermátidas iniciales				
Figura 2 A	diámetro celular	169,2	20	8,46
	diámetro nuclear	75	20	3,75
figura 2 B	diámetro nuclear	42,6	20	2,13
Espermátidas intermedias				
Figura 3 C	diámetro celular	64,2	20	3,21
	diámetro nuclear	45,4	20	2,27
Figura 3 D	diámetro celular	71,4	20	3,57
	diámetro nuclear	49,2	20	2,46
Figura 3 E	diámetro nuclear	41,2	20	2,06
Espermátidas tardías	diámetro nuclear	32,6	20	1,63
	alto nuclear	31,8	20	1,59
	compl. Acrosomal	15,2	20	0,76
	Ancho sup. Fosa	9	20	0,45
	Ancho inf. Fosa	5,2	20	0,26
	mitocondrias	7,369	15	0,49126667
Espermatozoide				
	longitud total	602	20	30,1
		604	20	30,2
Cabeza	alto cabeza	35,6	20	1,78
	diámetro cabeza	32,6	20	1,63
	alto núcleo	25,9	20	1,295
	diámetro núcleo	32,6	20	1,63
	acrosoma	10,4	20	0,52
	Ancho sup. Fosa	7,6	20	0,38
	Ancho inf. Fosa	4	20	0,2
Pieza media	largo	9,6	20	0,48
	diámetro	22	20	1,1
Mitocondrias	diámetro	6,58	15	0,43866667
Flagelo	longitud total	556,8	20	27,84
	diámetro	4	20	0,2

10. AGRADECIMIENTOS

A mis amigas por su gran apoyo y su incondicional amistad.

A todos quienes laboran en el Instituto de Embriología, donde se realizó esta tesis, por su apoyo y paciencia, en especial a don Valentin por su gran ayuda y por acompañarme en esas largas tardes de trabajo, a don Luis y a Magali.

A mi profesor patrocinante por su apoyo y disposición.

A mi profesor copatrocinante por su paciencia y apoyo en la ejecución de esta tesis.

A Luis Navarro por su incondicional apoyo y por darme fuerza en los momentos difíciles.

A mis padres que siempre me han apoyado y confiado en mi capacidad para alcanzar esta meta.

A Anita por su apoyo en este periodo que se realiza fuera de la escuela.

Y a todos los que de una u otra forma prestaron apoyo y estuvieron a mi lado para alcanzar esta gran meta.