

## L'ESPERMATOGÈNESI EN ELS CRANCS (CRUSTACEA, BRACHYURA). UN MODEL ATÍPIC DE CONDENSACIÓ DEL NUCLI ESPERMÀTIC

CARLES G. SIMEÓ,<sup>1,4</sup> KATHRYN KURTZ,<sup>2</sup> MANEL CHIVA,<sup>2</sup> GUIOMAR ROTLLANT<sup>1,4</sup> I ENRIC RIBES<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries, Sant Carles de la Ràpita.

<sup>2</sup> Departament de Ciències Fisiològiques II, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona.

<sup>3</sup> Departament de Biologia Cel·lular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.

<sup>4</sup> Xarxa de Referència de Recerca, Desenvolupament i Innovació en Aqüicultura de la Generalitat de Catalunya.

Adreça per a la correspondència: Enric Ribes Mora. Departament de Biologia Cel·lular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona. Av. Diagonal, 645. 08028 Barcelona. Adreça electrònica: [eribes@ub.edu](mailto:eribes@ub.edu).

### RESUM

Els espermatozoides dels crustacis decàpodes es caracteritzen per tenir un nucli amb cromatina poc condensada, un acrosoma complex i un citoplasma reduït sense flagel. Es disposa d'una àmplia informació sobre la ultraestructura i variabilitat morfològica dels espermatozoides dels crustacis decàpodes, i particularment dels braquiürs, ja que la seva especificitat ha permès utilitzar-los com a caràcter filogenètic, però el procés d'espermatogènesi i la naturalesa de les proteïnes associades a la cromatina dels espermatozoides són qüestions encara no resoltes. En aquest treball hem tractat aquestes dues qüestions utilitzant com a model dues espècies de braquiürs: la cabra de mar, *Maja brachydactyla*, i el bou de mar, *Cancer pagurus*. D'aquesta manera, hem realitzat una breu descripció de la morfologia de l'aparell reproductor masculí de *M. brachydactyla*, hem localitzat el lloc on es desenvolupa l'espermatogènesi i hem descrit la formació dels espermatozoides que són transferits a la femella. A continuació, hem comparat el procés d'espermatogènesi de *M. brachydactyla*, amb els estudis fets en altres espècies, considerant de manera preferent la formació de l'acrosoma. Finalment, hem descrit diferents aspectes del nucli dels espermatozoides dels braquiürs, fent un estudi específic de les proteïnes associades al nucli de l'espermatozoide de *C. pagurus*.

**Paraules clau:** aparell reproductor masculí, espermatogènesi, espermatozoide, cromatina, Brachyura.

## SPERMATOGENESIS IN CRABS (CRUSTACEA: BRACHYURA). AN ATYPICAL CONDENSATION MODEL OF THE SPERMATIC NUCLEI

### SUMMARY

Decapods crustacean spermatozoa are characterized by a nucleus containing a low condensed chromatin, a complex acrosome and reduced cytoplasm lacking of flagellum. Large information on ultrastructure and morphological variability of the spermatozoa is available in crustacean particularly, in Brachyuran, since their specificity has been used as a phylogenetic character. However, the spermatogenesis and the nature of the proteins associated to chromatin in the nucleus of the spermatozoa are still unclear. In the present study, we have dealt both topics using two brachyuran species as model: the spider crab, *Maja brachydactyla* and the edible crab, *Cancer pagurus*. Thus, we have briefly described the morphology of the male reproductive system of *M. brachydactyla* in order to locate the spermatogenesis process and to describe the formation of the spermatophore transferred to the female. Finally, we have also described and compared with previous studies, the spermatogenesis process of *M. brachydactyla* with special attention to the acrosomal vesicle. We have finished our study describing the different characters presented in the nucleus of the spermatozoa, with special reference to the proteins associated to chromatin in *C. pagurus*.

**Key words:** male reproductive system, spermatogenesis, spermatozoa, chromatin, Brachyura.

### INTRODUCCIÓ

A diferència d'altres grups taxonòmics, els crustacis decàpodes presenten un espermatozoide caracteritzat per la falta de flagel, un nucli amb una cromatina laxa i poc condensada i un acrosoma complex de gran varietat morfològica (Felgenhauer i Abele, 1991). La morfologia de l'espermatozoide dels crustacis decàpodes va despertar gran interès, i va donar lloc lloc a les primeres descripcions de l'espermatogènesi dels braquiürs (Binford, 1913; Fasten, 1918, 1924, 1926; Nath, 1932; Estampador, 1949). La utilització de la microscòpia electrònica va permetre observar la ultraestructura dels diferents components de l'espermatozoide (Yasuzumi, 1960; Langreth, 1969; Reger, 1970; Medina i Rodríguez, 1992a), i va mostrar una gran diversitat morfològica en els

espermatozoides dels crustacis decàpodes, la qual cosa ha estat utilitzada per dur a terme reconstruccions filogenètiques, especialment en els braquiürs (Jamieson, 1991a, 1994b; Jamieson *et al.*, 1995). Tanmateix, la utilització de la microscòpia electrònica va demostrar que la cromatina d'aquests espermatozoides era poc electrodensa, i això indicava una falta de compactació del DNA i va obrir les portes a l'estudi de les proteïnes associades a la cromatina en l'espermatozoide (Chevaillier, 1966a, 1967, 1968; Vaughn i Locy, 1969; Vaughn i Hinsch, 1972; Vaughn i Thomson, 1972).

Els estudis ultraestructurals de l'espermatogènesi van anar perdent interès al voltant de l'any 1970, i alguns aspectes, com ara l'origen de l'acrosoma, el sistema de membranes de l'espermatozoide, la baixa condensació de la cromatina i la naturale-

sa de les proteïnes associades, van quedar sense resoldre. En el present treball tractem el procés de l'espermatogènesi i l'estudi de les proteïnes associades a la cromatina dels nuclis dels espermatozoides.

## L'APARELL REPRODUCTOR DELS BRAQUIÛRS

### La cabra de mar, *Maja brachydactyla*

L'absència del flagel és un dels aspectes més característics en els espermatozoides dels crustacis decàpodes (Felgenhauer i Abele, 1991); per tant, els espermatozoides resten immòbils o tenen una mobilitat reduïda, i és per això que els crustacis decàpodes han desenvolupat diferents estratègies reproductives, que assoleixen la màxima complexitat en els braquiïurs. Els mascles dels crustacis decàpodes transfereixen els espermatozoides en estructures anomenades *espermatofors*, que en els braquiïurs estan formats per espermatozoides envoltats per una capa de material amorf, envoltats de grans quantitats de fluids seminals (Hinsch, 1991; Subramonian, 1991). Els espermatofors i els fluids seminals dels braquiïurs són injectats mitjançant el primer parell de pleopodis modificats per a la funció copuladora (gonopodis) als receptacles seminals de la femella, uns allargaments de l'aparell reproductor connectats als ovaris per uns oviductes (Bauer, 1986; Rotllant *et al.*, 2007). La fecundació és interna i es produeix aprofitant el pas dels oòcits per una cambra dels receptacles seminals de la femella abans de ser alliberats pels gonopors i ser adherits als pleopodis (Diesel, 1991).

L'aparell reproductor masculí dels braquiïurs consta de dos testicles, dos vasos deferents i dos conductes ejaculadors situats sobre l'hepatopàncrees (vegeu la figura 1a).

Els testicles es localitzen a la part anterior del cefalotòrax, i s'estenen anteriorment i lateralment en forma de banyes. En algunes espècies, ambdós testicles estan units per una comissura localitzada entre l'estómac i el cor (Mouchet, 1931). Els braquiïurs presenten dos tipus de testicles (Nagao i Munehara, 2003): els de forma lobular, que també es troben en la resta de decàpodes, i estan formats per uns àcins o lòbuls connectats per un conducte collector, i els de forma tubular, exclusius dels braquiïurs, que estan formats per un únic tub seminífer molt recaragolat. Malgrat les diferents morfologies, la fisiologia del testicle sembla equivalent en ambdós casos. Les espermatogònies es troben a la perifèria del lòbul o del tub seminífer i els diferents estadis de l'espermatogènesi ocupen l'espai central. A l'extrem oposat de les espermatogònies es troba generalment la zona collectora testicular, que transporta els espermatozoides al conducte deferent. En el cas de *M. brachydactyla*, els testicles s'estenen descrivint un arc des de la base de l'epipodi del maxil·lípede fins a la part anterior del cor. Cada testicle està format per un únic tub seminífer altament recaragolat, i per això ha estat classificat com a testicle tubular (Simeó *et al.*, en revisió) (vegeu la figura 1b). El tub seminífer de *M. brachydactyla* es troba organitzat en tres zones: germinal, de transformació i d'evacuació (Simeó *et al.*, en revisió) (vegeu la figura 1c). La zona germinal està localitzada en un pol del tub, i conté espermatogònies i cèl·lules accessòries. Aquesta zona és una fina capa durant la major part de l'espermatogènesi i augmenta de mida en el moment en què la zona de transformació presenta espermatozoides. La zona de transformació ocupa la zona central i és on es produeix la maduració dels espermatozoides fins arribar als espermatozoides. És en aquesta zona on les cèl·lules gamètiques es troben acompanyades per prominents cèl·lules accessòries

(vegeu la figura 1c). La zona d'evacuació, al pol oposat al de la zona germinal, conté exclusivament els espermatozoides produïts a la zona de transformació i els trasllada fins al conducte deferent, on són empaquetats en espermatoïfors.

El conducte deferent dels braquiürs està situat a la part posterior del cefalotòrax, i es divideix en tres regions: anterior, mitjana i posterior, d'acord amb criteris morfològics

i funcionals (Krol *et al.*, 1992). El conducte deferent anterior és un tub on es produeix la formació de l'espermatoïfor mitjançant les secrecions de l'epiteli de la paret del conducte. Les regions mitjana i posterior del conducte deferent són els llocs d'emmagatzematge dels espermatoïfors i de la producció dels fluids seminals que els engloben durant l'ejaculació (Diesel, 1991). Aquestes dues regions presenten expansions laterals

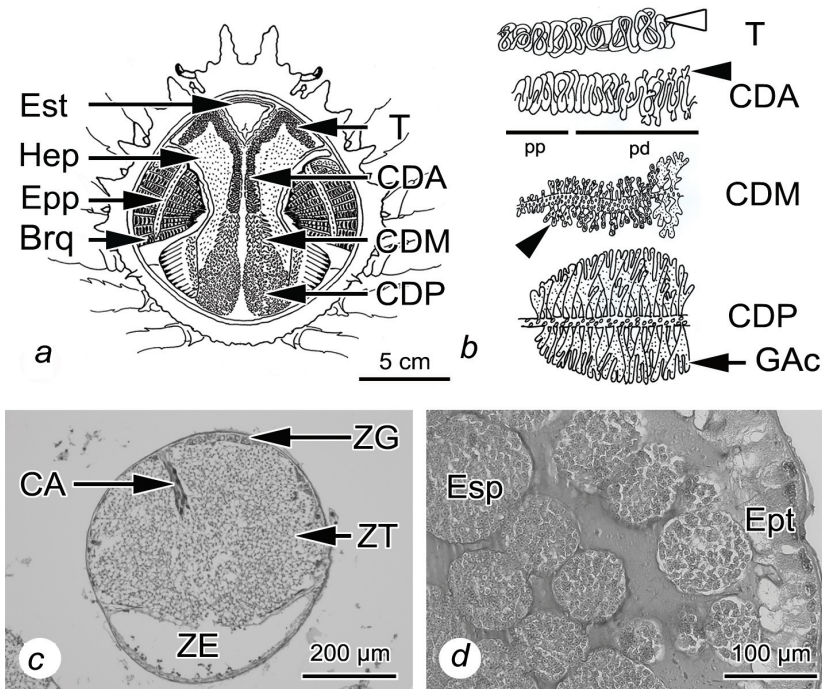


FIGURA 1. *Maja brachydactyla*. a) Diagrama de l'anatomia interna; es mostra l'aparell reproductor localitzat en el cefalotòrax. b) Diagrama que representa la morfologia externa del testicle (amb un únic tub seminífer (cap de fletxa blanca) i del conducte deferent amb la presència de diverticles que van augmentant des del conducte anterior fins al mitjà (cap de fletxa negra); el conducte deferent posterior és un tub que té associada una glàndula accessòria formada per diverticles molt ramificats. c) Secció transversal del tub seminífer (MO, tinció de Mallory); el tub seminífer es troba dividit en tres zones: germinal, de transformació i d'evacuació. d) Porció distal del conducte deferent anterior (MO, hematoxilina i eosina); els espermatoïfors ja formats es troben envoltats per les secrecions produïdes per l'epiteli. Brq: brànquies; CA: cèl·lula accessòria; CDA: conducte deferent anterior; CDM: conducte deferent mitjà; CDP: conducte deferent posterior; Epp: epipodi; Ept: epiteli; Esp: espermatoïfor; Est: estómac; GAc: glàndula accessòria; Hep: hepatopàncrees; pd: porció distal del conducte deferent anterior; pp: porció proximal del conducte deferent anterior; T: testicle; ZE: zona d'evacuació; ZG: zona germinal; ZT: zona de transformació.

o diverticles que augmenten la superfície de secreció i el volum d'emmagatzematge, i assoleixen mides considerables (Mouchet, 1931; Adiyodi i Anilkumar, 1988).

En *M. brachydactyla*, tal com s'ha descrit en la resta de braquiürs, el conducte deferent també s'ha dividit en tres regions (Simeó *et al.*, en revisió) (vegeu la figura 1b). El conducte deferent anterior és un tub doblegat dividit en dues porcions: proximal i distal; la porció proximal, propera al testicle, és un tub llis, mentre que la distal presenta uns petits diverticles aïllats (vegeu la figura 1b). Al llarg del conducte deferent anterior es produeix la formació de l'espermatofores, de manera que els espermatozoides provinents dels testicles s'agrupen en petites masses mitjançant dues secrecions de l'epiteli secretor de la paret del conducte deferent (vegeu la figura 1d). El conducte deferent mitjà és un tub enrotllat helicoidalment que presenta un gran nombre de diverticles localitzats en un pol del tub (vegeu la figura 1b); tant a la llum d'aquest conducte com als diverticles es troben grans quantitats d'espermatofores envoltats per noves secrecions elaborades per l'epiteli d'aquesta regió del conducte (vegeu la figura 1d). El conducte deferent posterior té associada una gran glàndula accessòria, formada per diverticles altament ramificats que produeixen i emmagatzemen un fluid seminal secretat per l'epiteli de la seva paret (vegeu la figura 1b), que és abocat al conducte deferent posterior i engloba els espermatofores provinents del conducte deferent mitjà durant l'ejaculació.

El conducte ejaculador de *M. brachydactyla* està situat entre la musculatura de la coxa de la cinquena pota marxadora. En la seva paret per sota de l'epiteli mostra una capa de musculatura esquelètica molt desenvolupada, que és la responsable de l'extrusió dels espermatofores i del fluid seminal fins al gonopore (Simeó *et al.*, en revisió).

## L'ESPERMATOGÈNESI DELS BRAQUIÜRS

### L'espermatoogènesi de la cabra de mar, *Maja brachydactyla*

L'estudi de l'espermatoogènesi de *M. brachydactyla* s'ha centrat en la zona de transformació del tub seminífer, on podem trobar des dels espermatoòcits primaris fins als espermatozoides madurs (Simeó *et al.*, en preparació) (vegeu la figura 1c).

Els espermatoòcits primaris són cèl·lules esfèriques amb una alta relació nucli/citoplasma (vegeu la figura 2). El nucli és esfèric i voluminós i ocupa la zona central de la cèl·lula. La cromatina presenta les diferents figures meiótiques de la primera divisió meiótica, com ara els complexos sinapteinemals durant el paquítes (vegeu les fletxes de la figura 2b). El citoplasma conté pocs mitocondris, un complex sistema d'endomembranes i el *nucleolus-like body* o *nuage*. El sistema d'endomembranes es desenvolupa progressivament al llarg dels diferents estadis, i durant el paquítes mostra una característica disposició concèntrica de les membranes amb dilatacions laterals (vegeu la figura 2b), mentre que durant el diplotè el sistema d'endomembranes es troba altament desenvolupat i s'organitza en estructures conegudes com a *lâmines anellades* i d'altres formacions membranoses (vegeu la figura 2c). El *nuage* apareix com un cos electrodens que està present en pràcticament tots els estadis d'espermatoòcits primaris i és especialment prominent durant el diplotè (vegeu la figura 2a i c). Després de la diacinesi de la primera divisió meiótica (vegeu la figura 2d), els estadis dels espermatoòcits secundaris transcorren molt ràpidament i fan difícil l'obtenció de mostres per microscòpia.

Les espermàtides primerenques són cèl·lules esfèriques, amb una relació nucli/



citoplasma alta, que mostren els primers signes de polarització. Així, el nucli es troba lleugerament desplaçat del centre de la cèl·lula en el que serà el pol nuclear de l'espermatozoide, mentre que al pol oposat, el pol acrosòmic, es desenvoluparà la vesícula acrosòmica (vegeu la figura 3a). El nucli de l'espermàtida primerenca és esfèric i té la cromatina condensada en grumolls. D'altra

banda, el citoplasma conté alguns mitocondris i un sistema de membranes poc desenvolupat. El primer canvi que es produeix durant l'espermioquèsi és la descondensació de la cromatina nuclear, que adquireix un aspecte granular homogeni (vegeu la figura 3b). En el citoplasma, el sistema de membranes constituït pel reticle endoplasmàtic i el complex de Golgi es desenvolupa

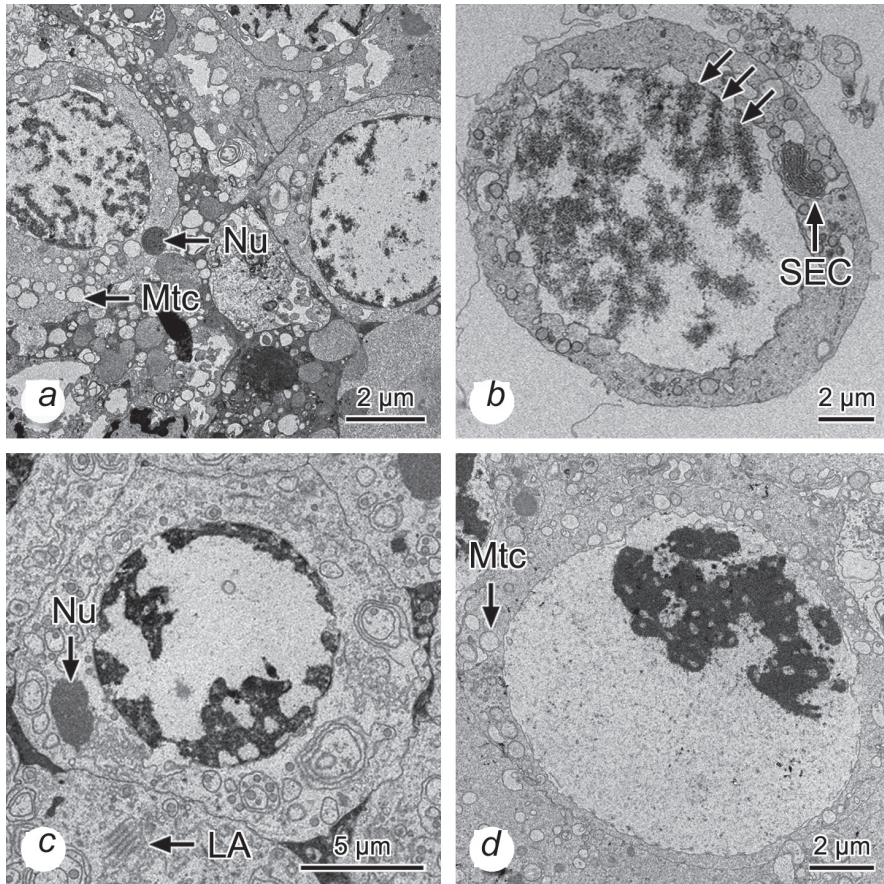


FIGURA 2. *Maja brachydactyla*. Espermatòcits primaris (TEM). a) Preleptotè (esquerra) i leptotè (dreta). La condensació dels cromosomes augmenta durant el preleptotè i el leptotè. En aquest darrer estadi, el citoplasma conté pocs mitocondris i *nuage*. b) Paquíetè. S'observen complexos sinap tinemals (fletxes) en el nucli i la disposició concèntrica del sistema d'endomembranes. c) Diplotè. El sistema d'endomembranes es troba molt desenvolupat i s'observen làmines anellades. El *nuage* assoleix la màxima mida en aquest estadi. d) Diacinesi. Es pot veure una reducció del sistema d'endomembranes. LA: làmines anellades; Mtc: mitocondri; Nu: *nuage*; SEC: sistema d'endomembranes concèntric.

TAULA 1. Estudis de l'espermatogènesi en diferents espècies de braquiürs

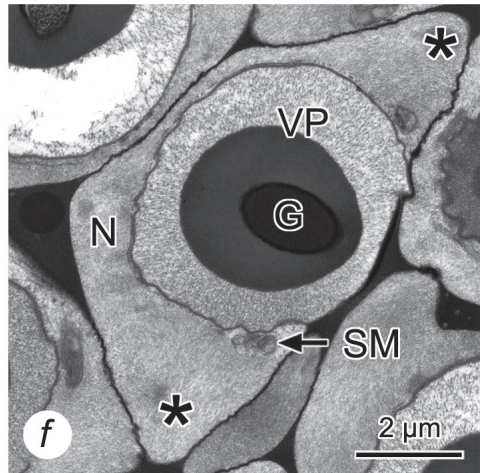
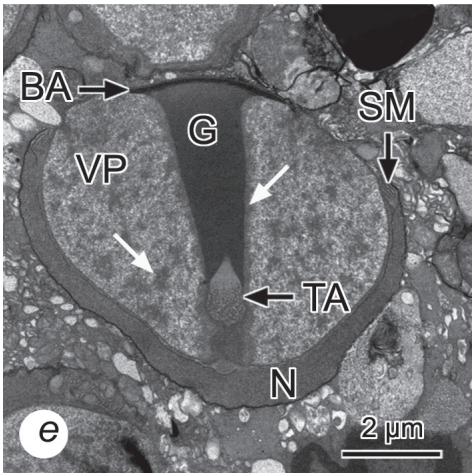
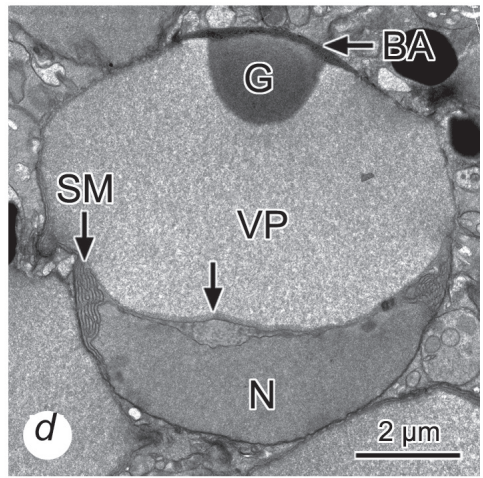
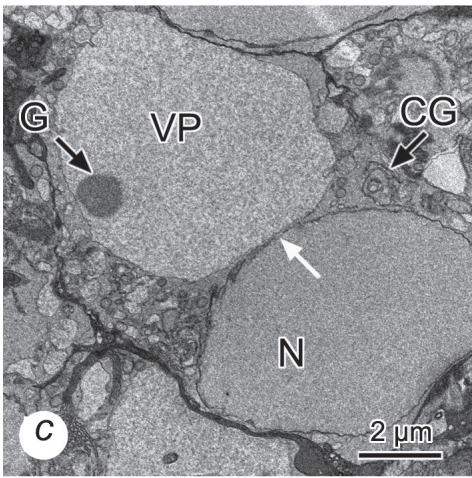
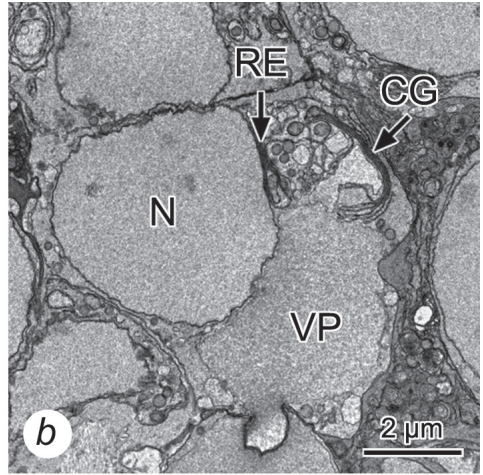
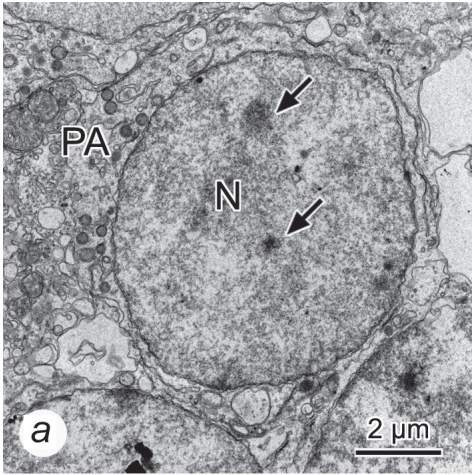
Superfamília	Espècie	Procés	Tècnica	Autor
Majoidea	<i>Maja brachydactyla</i>	Espermatogènesi	ME	(Simeó <i>et al.</i> , en preparació(b))
Cancroidea	<i>Cancer magister</i>	Espermatogènesi	MO	Fasten, 1918
	<i>Cancer productus</i>	Espermatogènesi	MO	Fasten, 1924
	<i>Cancer oregonensis</i>			
	<i>Cancer gracilis</i>			
	<i>Cancer borealis</i> <i>Cancer irroratus</i> <i>Cancer magister</i> <i>Cancer productus</i>	Espermioènesi	ME	Langreth, 1969
Portunoidea	<i>Scylla serrata</i>	Espermatogènesi	MO	Estampador, 1949
	<i>Scylla paramamosain</i>			
	<i>Scylla oceanica</i>			
	<i>Scylla tranquebarica</i>			
Xanthoidea	<i>Menippe mercenaria</i>	Espermatogènesi	MO	Binford, 1913
Potamoidea	<i>Sartorina spinigera</i>	Espermatogènesi	MO	Nath, 1932
Pinnotheroidea	<i>Pinnixa sp</i>	Espermioènesi	ME	Reger, 1970
Ocypodoidea	<i>Uca tangeri</i>	Espermioènesi	ME	Medina i Rodríguez, 1992b
Grapsoidea	<i>Eriocheir sinensis</i>	Espermatogènesi	MO	Hoestlandt, 1948
	<i>Eriocheir japonicus</i>	Espermàtides finals	ME	Yasuzumi, 1960

ME: microscòpia electrònica; MO: microscòpia òptica.

i s'organitza progressivament, de manera que el complex de Golgi produeix dos tipus de vesícules: les de baixa i les de mitjana electrodensitat, que es fusionen al pol acrosòmic i donen lloc a la vesícula proacrosòmica, que conté material granulat homogèniament distribuït. Al llarg de l'espermàtida intermèdia la vesícula proacrosòmica creix paral·lelament al desenvolupament del reticle endoplasmàtic i del complex de Golgi, són desplaçats a la zona equatorial de la cèl·lula entre el nucli i la vesícula proacrosòmica, i s'observa a l'interior de la vesícula l'aparició d'un grànul electrodens (vegeu la figura 3c). La fase d'espermàtida intermèdia finalitza amb el trencament de les membra-

nes nuclears a la zona equatorial de la cèl·lula i la degeneració del reticle endoplasmàtic. L'espermàtida madura es mostra com una cèl·lula altament polaritzada (vegeu la figura 3d); el nucli, en el pol nuclear, presenta forma de mitja lluna, i la vesícula proacrosòmica, en el pol acrosòmic, apareix com un cos esfèric i molt voluminós. En aquesta fase, la vesícula proacrosòmica experimenta una gran transformació morfològica: a la zona apical es veu una fina banda altament electrodensa que donarà lloc al barret acrosòmic o opercle (*acrosomal cap*, *operculum*), mentre que a la zona basal es forma una invaginació de la vesícula, embolcallada d'un material granular electrodens, que donarà







lloc al tub acrosòmic (*acrosomal tube, perforatorium*) (vegeu la fletxa de la figura 3d). El citoplasma és molt reduït i es troba localitzat entre els extrems del nucli i la vesícula proacrosòmica, i conté un sistema de membranes, produït per la degeneració del reticle endoplasmàtic i el complex de Golgi, associat a mitocondris i microtúbuls (vegeu la figura 5). A continuació, en la fase final de l'espermioogènesi, s'observa com el component granular present a l'interior de la vesícula proacrosòmica es va condensant i origina una sèrie de capes concèntriques, de diferent electrodensitat al voltant del tub acrosòmic (vegeu les fletxes blanques de la figura 3e). En aquesta fase també s'observa com el nucli va formant quatre prolongacions laterals (*lateral arm*) que tenen el seu interior ple de fibres de cromatina (vegeu els asteriscs de la figura 3f).

L'espermatozoide de *M. brachydactyla* té forma esferoïdal estrellada (vegeu la figura 4a). L'acrosoma ocupa el centre de la cèl·lula i es troba envoltat basalment i lateralment per una fina franja de citoplasma i per un nucli que ocupa una posició més perifèrica (vegeu la figura 4b).

L'acrosoma és esfèric, i a la part anterior té un opercle de forma lenticular còncava amb una petita protuberància. L'acrosoma està constituït també per tres capes:

externa, intermèdia i interna (vegeu la figura 4b). La formació de cadascuna d'aquestes tres capes té lloc independentment durant l'espermioogènesi. La capa interna que envolta el *perforatorium* s'origina a partir d'un grànul electrodens d'origen citoplasmàtic, mentre que les capes intermèdia i externa es formen a partir de la condensació seriada del contingut de la vesícula proacrosòmica (vegeu les figures 3c, d, e i f).

El citoplasma, en l'espermatozoide madur, es troba restringit a una zona estreta en forma d'anell que envolta l'acrosoma just per sota de l'opercle; en aquesta regió del citoplasma és on s'observa un sistema de membranes i microtúbuls juntament amb un nombre reduït de petits mitocondris, que tenen una matriu electrodensa amb poques crestes (vegeu la figura 4B). Una altra zona estreta de citoplasma es localitza entre la zona basal de l'acrosoma i el nucli, i és en aquesta on s'observen un o dos centríols.

El nucli s'estén pràcticament per tot el volum cel·lular, excepte en l'espai ocupat per l'acrosoma i l'estreta franja de citoplasma que l'envolta. Les membranes de l'embolcall nuclear se situen properes a la membrana citoplasmàtica i donen lloc a una estructura multimembranosa electrodensa que delimita la superfície de l'espermatozoide. La cromatina és poc condensada i mostra un

FIGURA 3 (pàgina anterior). *Maja brachydactyla*. Espermatides (TEM). a) Espermatida primerenca. El nucli es troba desplaçat del centre de la cèl·lula i presenta petits grumolls de cromatina condensada (fletxes), mentre que el citoplasma ho fa en sentit contrari. b) Espermatida intermèdia. La cromatina s'ha descondensat i mostra un aspecte granular. Al citoplasma, el sistema d'endomembranes s'ha desenvolupat i diferenciat en reticle endoplasmàtic i complex de Golgi, l'activitat dels quals dóna lloc a la vesícula proacrosòmica. c) Espermatida intermèdia. En una fase més avançada, apareix un grànul electrodens a l'interior de la vesícula proacrosòmica. La fletxa blanca indica la zona on es produeix el trencament de l'embolcall nuclear. d) Espermatida madura. El nucli presenta una forma de mitja lluna i el citoplasma reduït conté un sistema de membranes. La vesícula proacrosòmica mostra un opercle sobre el grànul electrodens en posició apical. A la base de la vesícula observem una capa de material granular a la zona on es formarà el tub acrosòmic (fletxa). e) Espermatida madura. El nucli s'estén envoltant la vesícula proacrosòmica. Els components de la vesícula es condensen en petits grumolls (fletxes blanques) que s'organitzen al voltant del tub acrosòmic. f) Espermatida madura. El nucli s'expandeix, i desenvolupa les prolongacions laterals o *lateral arm* (asteriscs). Els components de la vesícula proacrosòmica s'organitzen concèntricament al voltant del tub acrosòmic. BA: barret acrosòmic o opercle; CG: complex de Golgi; G: grànul de la vesícula proacrosòmica; N: nucli; PA: pol acrosòmic; RE: reticle endoplasmàtic; SM: sistema de membranes; TA: tub acrosòmic o *perforatorium*; VP: vesícula proacrosòmica.

aspecte fibrillar homogeni al llarg de tot el nucli, i arriba fins i tot a ocupar l'espai interior de les quatre prolongacions de l'espermatozoide (vegeu la figura 4b).

### L'espermatogènesi en altres espècies de braquiürs

El procés d'espermatogènesi segueix un patró comú en relació amb el nucli, el citoplasma i el desenvolupament de la vesícula

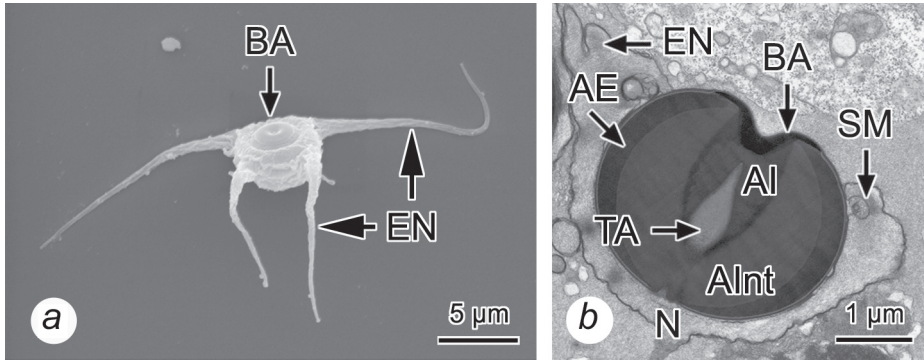


FIGURA 4. *Maja brachydactyla*. Espermatozoide. a) SEM. L'espermatozoide mostra una forma ovoidal amb quatre llargues prolongacions laterals. b) TEM. El nucli de l'espermatozoide conté cromatina poc condensada. A la base de les prolongacions laterals es troba el sistema de membranes. L'acrosoma és esfèric i està format per tres capes concèntriques. La capa interna envolta el tub acrosòmic. La part apical presenta l'opercle amb una depressió central. AE: capa externa de l'acrosoma; AI: capa interna de l'acrosoma; AInt: capa intermèdia de l'acrosoma; BA: barret acrosòmic o opercle; EN: prolongacions laterals del nucli; N: nucli; SM: sistema de membranes; TA: tub acrosòmic.

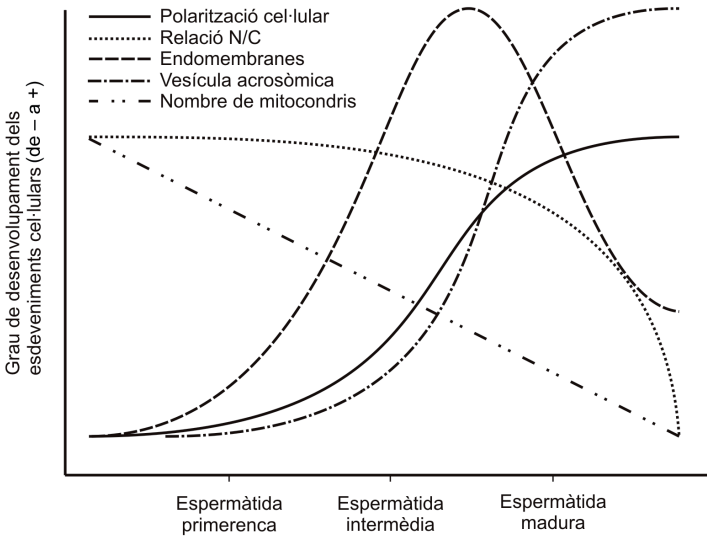


FIGURA 5. *Maja brachydactyla*. Síntesi dels esdeveniments cel·lulars durant el procés de maduració de les espermàtides.

la acrosòmica, malgrat la gran variabilitat morfològica dels espermatozoides dels braquiürs estudiats (vegeu la taula 1).

El fet més particular que experimenta el nucli al llarg de l'espermatogènesi és la descondensació de la cromatina. Les espermàtides primerenques presenten una cromatina condensada en grànuls a la perifèria del nucli (Langreth, 1969; Reger, 1970; Simeó *et*

*al.*, en preparació) o un aspecte granular homogeni (Medina i Rodríguez, 1992a). Al final de l'espermatogènesi, el nucli de les espermàtides mostra una cromatina poc condensada d'aspecte fibrós. Parallelament a la descondensació de la cromatina, es dona un augment del volum del nucli i un desenvolupament de les prolongacions nuclears (Medina i Rodríguez, 1992a). Aquests canvis estan associats a modificacions de les proteïnes que acompanyen la cromatina i que possiblement tenen un paper molt important en el moment de la fertilització de l'òocit.

Un altre fet característic és el trencament de les membranes nuclears (Langreth, 1969; Reger, 1970; Medina i Rodríguez, 1992a; Simeó *et al.*, en preparació), de tal manera que la cromatina queda en contacte, però no barrejada, amb el citoplasma. Aquesta desintegració de les membranes nuclears sol estar associada a la zona basal de l'acrosoma i, més específicament, a la base del tub acrosòmic, i facilita el pas del nucli a través del canal format pel tub acrosòmic durant la fertilització.

Les membranes nuclears s'ajunten entre si (Langreth, 1969; Reger, 1970; Medina i Rodríguez, 1992a) i amb la membrana plasmàtica per formar un sistema pentalaminar (Reger, 1970).

Al llarg de l'espermiogènesi es produeix una gran reducció del citoplasma en favor de la vesícula acrosòmica (Reger, 1970; Medina i Rodríguez, 1992a). El citoplasma és activament abocat fora de la cèl·lula (Langreth, 1969) i fins i tot es desprenen regions senceres dins de vesícules membranoses (Reger, 1970). Els canvis soferts pel citoplasma també afecten els diferents components citoplasmàtics: mitocondris, centríols i el sistema d'endomembranes. Els mitocondris, que són poc nombrosos i presenten unes crestes poc desenvolupades (Medina i Rodríguez, 1992a; Simeó *et al.*, en

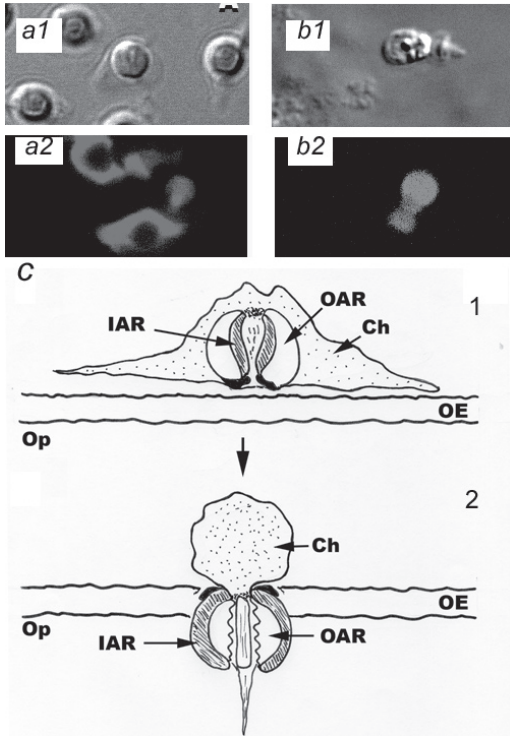


FIGURA 6. *Cancer pagurus*. Activació dels espermatozoides. a) Espermatozoides intactes de *C. pagurus* observats per microscòpia de contrast de fase (a1), i per tinció del nucli amb el reactiu de Hoechst (a2). b) Espermatozoides activats del mateix animal, observats per contrast de fase (b1) i per tinció del seu nucli amb reactiu de Hoechst (b2). c) Esquema de l'activació de l'espermatozoide quan entra en contacte amb la coberta externa oocitària (1) abans de l'activació; 2) durant l'activació. El nucli ha de travessar el canal intern que forma l'acrosoma en la seva eversió. Ch: cromatina; IAR i OAR: regions acrosòmiques interna i externa (observeu el canvi de posició de IAR/OAR després de l'eversió); OE: coberta oocitària; OP: citoplasma de l'òocit.



## Llista d'estudis sobre la ultraestructura dels espermatozoides dels braquiürs

Superfamília	Espècie	Autor
Homolodroioidea Dromoidea	<i>Homolodromia kai</i>	Jamieson <i>et al.</i> , 1995; Guinot <i>et al.</i> , 1998
	<i>Moreirodromia antillensis</i>	Brown, 1966; Felgenhauer i Abele, 1991
	<i>Dromidiopsis edwardsi</i>	Jamieson, 1994a; Jamieson <i>et al.</i> , 1993d, 1994b
	<i>Stimodromia lateralis</i>	Jamieson, 1990, 1991a, 1991b, 1994a; Guinot <i>et al.</i> , 1994
	<i>Sphaerodromia lamellata</i>	Guinot <i>et al.</i> , 1998
	<i>Metadynomene tanensis</i>	Jamieson <i>et al.</i> , 1995; Guinot <i>et al.</i> , 1998
	<i>Paradynomene tuberculata</i>	Jamieson, 1994a; Jamieson <i>et al.</i> , 1993b
Homoloidea	<i>Tymolus</i> sp.	Jamieson, 1994a; Jamieson <i>et al.</i> , 1994a
	<i>Homola ranunculus</i>	Guinot <i>et al.</i> , 1994
	<i>Homologenus levii</i>	Jamieson <i>et al.</i> , 1993c
	<i>Homolomania sibogae</i>	Jamieson <i>et al.</i> , 1993c
	<i>Latreillopsis gracilipes</i>	Jamieson, 1994a; Jamieson <i>et al.</i> , 1993c, 1994b
	<i>Dagnaudus petterdi</i>	Guinot <i>et al.</i> , 1994
	<i>Paromola bathyalis</i>	Guinot <i>et al.</i> , 1994
	<i>Paromolopsis boasi</i>	Jamieson <i>et al.</i> , 1993c
	<i>Latreillia</i> sp.	Jamieson, 1994a, 1994b
Raninoidea	<i>Lyreidus brevifrons</i>	Jamieson, 1994a; Jamieson <i>et al.</i> , 1994b
	<i>Ranina ranina</i>	Jamieson, 1989a, 1991a, 1991b, 1994a; Guinot <i>et al.</i> , 1994
	<i>Raninoidea</i> sp.	Jamieson, 1994a, 1994b; Jamieson <i>et al.</i> , 1994b
	<i>Cosmonotus</i> sp.	Jamieson i Tudge, 2000
Cyclodorippoidea	<i>Xeinostoma richeri</i>	Jamieson, 1994a; Jamieson <i>et al.</i> , 1994a
	<i>Cymonomus</i> sp.	Jamieson, 1994a; Jamieson <i>et al.</i> , 1994a
Dorippoidea	<i>Neodorippe callida</i>	Jamieson, 1991b, 1994a; Jamieson i Tudge, 1990
	<i>Ethusa indica</i>	Jamieson i Tudge, 2000
Calappoidea	<i>Calappa hepatica</i>	Jamieson, 1991a
	<i>Calappa gallus</i>	Jamieson i Tudge, 2000
	<i>Mursia microspina</i>	Jamieson i Tudge, 2000
Leucosioidea	<i>Iliacantha subglobosa</i>	Felgenhauer i Abele, 1991
	<i>Bellidilia laevis</i>	Jamieson i Tudge, 2000
	<i>Tanaoa serenei</i>	Jamieson i Tudge, 2000
	<i>Odiomaris pilosus</i>	Forges <i>et al.</i> , 1997
	<i>Odiomaris estuarius</i>	Forges <i>et al.</i> , 1997
	<i>Elamena vesca</i>	Jamieson i Tudge, 2000
Majoidea	<i>Maja brachydactyla</i>	Tudge i Justine, 1994
	<i>Chionoecetes opilio</i>	Beninger <i>et al.</i> , 1988; Chiba <i>et al.</i> , 1992
	<i>Cyrtomaia furci</i>	Jamieson i Tudge, 2000; Jamieson <i>et al.</i> , 1998
	<i>Grypacheus hyalinus</i>	Jamieson i Tudge, 2000; Jamieson <i>et al.</i> , 1998
	<i>Macropodia longirostris</i>	Jamieson i Tudge, 2000; Jamieson <i>et al.</i> , 1998
	<i>Platymaia rebierei</i>	Jamieson i Tudge, 2000; Jamieson <i>et al.</i> , 1998
	<i>Podochela riisei</i>	Hinsch, 1973
	<i>Stenorhynchus seticornis</i>	Hinsch, 1973
	<i>Inachus phalangium</i>	Rorandelli <i>et al.</i> , 2008
	<i>Hyastenus diacanthus</i>	Jamieson i Tudge, 2000; Jamieson <i>et al.</i> , 1998
	<i>Libinia dubia</i>	Hinsch, 1973
	<i>Libinia emarginata</i>	Hinsch, 1969, 1971, 1973, 1986; Vaughn i Hinsch, 1972; Hernandez <i>et al.</i> , 1989; Murray <i>et al.</i> , 1991
	<i>Macrocoeloma trispinosum</i>	Hinsch, 1973
	<i>Mithrax</i> sp.	Hinsch, 1973
<i>Menaethius monoceros</i>	Jamieson, 1991a, 1994a	
<i>Oxypleurdon orbiculatum</i>	Jamieson i Tudge, 2000; Jamieson <i>et al.</i> , 1998	

	<i>Oxypleurodon stuckiae</i>	Jamieson i Tudge, 2000; Jamieson <i>et al.</i> , 1998
	<i>Pitho lherminieri</i>	Hinsch, 1973
Parthenopoidea	Parthenopidae sp.	Jamieson i Tudge, 2000
	<i>Heterocrypta granulata</i>	Hinsch, 1973
	<i>Parthenope serratus</i>	Hinsch, 1973
Retroplumoidea	<i>Retropluma</i> sp.	Jamieson i Tudge, 2000
Cancroidea	<i>Corystes cassivelaunus</i>	Jamieson <i>et al.</i> , 1997
	<i>Cancer borealis</i>	Langreth, 1965, 1969
	<i>Cancer irroratus</i>	Langreth, 1965, 1969
	<i>Cancer magister</i>	Langreth, 1965, 1969
	<i>Cancer pagurus</i>	Pochon-Masson, 1968; Tudge i Justine, 1994; Tudge <i>et al.</i> , 1994; Jamieson <i>et al.</i> , 1997
	<i>Cancer productus</i>	Langreth, 1965, 1969
	<i>Platepistoma nanum</i>	Jamieson <i>et al.</i> , 1997
Portunoidea	<i>Portunus pelagicus</i>	Jamieson, 1989a, 1991a, 1994a; Jamieson i Tudge, 1990; El-Sherief, 1991; Guinot <i>et al.</i> , 1994
	<i>Callinectes sapidus</i>	Brown, 1966; Felgenhauer i Abele, 1991
	<i>Xaiva</i> sp.	Jamieson i Tudge, 2000
	<i>Caphyra loevis</i>	Jamieson, 1991a, 1994a
	<i>Caphyra rotundifrons</i>	Jamieson, 1991a, 1994a
	<i>Carcinus maenas</i>	Pochon-Masson, 1962, 1968; Chevallier, 1966b, 1967, 1969; Pearson i Walker, 1975; Goudeau, 1982; Reger <i>et al.</i> , 1984
	<i>Ovalipes ocellatus</i>	Hinsch, 1986
	<i>Ovalipes mollerii</i>	Jamieson i Tudge, 2000
	<i>Podophthalmus vigil</i>	Jamieson i Tudge, 2000
	<i>Chaceon fenneri</i>	Hinsch, 1988
	<i>Chaceon quinquedens</i>	Hinsch, 1988
Bythograeoidea	<i>Austinograea alayseae</i>	Tudge <i>et al.</i> , 1998
	<i>Bythograea thermydron</i>	Tudge <i>et al.</i> , 1998
	<i>Segonzacia mesatlantica</i>	Tudge <i>et al.</i> , 1998
Xanthoidea	<i>Atergatis floridus</i>	Jamieson, 1989b, 1989c, 1991a; Jamieson <i>et al.</i> , 1993a
	<i>Etismus laevimanus</i>	Jamieson, 1989c, 1991a
	<i>Pilodius areolatus</i>	Jamieson, 1989c, 1991a, 1994a
	<i>Liagore rubromaculata</i>	Jamieson, 1989c, 1991a
	<i>Eurypanopeus depressus</i>	Felgenhauer i Abele, 1991; Jamieson i Tudge, 2000
	<i>Eurytium limosum</i>	Felgenhauer i Abele, 1991
	<i>Panopeus obesus</i>	Jamieson i Tudge, 2000
	<i>Ceratoplax</i> sp.	Jamieson i Tudge, 2000
	<i>Hexaplax megalops</i>	Jamieson i Tudge, 2000
	<i>Menippe mercenaria</i>	Brown, 1966
	<i>Eriphia sebana</i>	Jamieson i Tudge, 2000
	<i>Pilumnus semilanatus</i>	Jamieson i Tudge, 2000
	<i>Gonatonotus granulatus</i>	Jamieson i Tudge, 2000
	<i>Harrovia albolineata</i>	Jamieson i Tudge, 2000
	<i>Trapezia cymodoce</i>	Jamieson, 1993b
	<i>Tetralia glaberrima</i>	Jamieson i Tudge, 2000
	<i>Tetralia nigrolineata</i>	Jamieson i Tudge, 2000
	<i>Calocarcinus africanus</i>	Jamieson, 1994a; Jamieson <i>et al.</i> , 1993a
Goneplacoidea	<i>Australocarcinus riparius</i>	Jamieson i Guinot, 1996
	<i>Carcinoplax microphthalmus</i>	Jamieson i Tudge, 2000
	<i>Goneplax</i> sp.	Jamieson i Tudge, 2000
Potamoidea	<i>Potamon fluviatile</i>	Tudge i Justine, 1994; Guinot <i>et al.</i> , 1997
	<i>Potamon ibericum</i>	Guinot <i>et al.</i> , 1997
	<i>Potamonautes perlatus sidneyi</i>	Jamieson, 1993a, 1994a, 1994b

Gecarcinoidea	<i>Holthusiana transversa</i>	Jamieson i Tudge, 2000	
Cryptochiroidea	<i>Cryptochirus coralliodytes</i>	Jamieson i Tudge, 2000	
	<i>Hapalocarcinus marsupialis</i>	Jamieson i Tudge, 2000	
Pinnotheroidea	<i>Pinnixa</i> sp.	Reger, 1970	
Ocyropodoidea	<i>Mictyris longicarpus</i>	Jamieson, 1993a, 1994a	
	<i>Macrophthalmus crassipes</i>	Jamieson, 1991a, 1994b	
	<i>Ocypode ceratophthalmus</i>	Jamieson, 1991a, 1994b	
	<i>Uca paradussumieri</i>	Jamieson, 1991a, 1994b	
	<i>Uca polita</i>	Jamieson i Tudge, 2000	
	<i>Uca pugilator</i>	Jamieson i Tudge, 2000	
	<i>Uca tangeri</i>	Medina, 1992; Medina i Rodríguez, 1992a, 1992b	
	<i>Uca uruguayensis</i>	Cuartas i Sousa, 2007	
	Grapsoida	<i>Cardisoma carnifex</i>	Jamieson <i>et al.</i> , 1996
		<i>Grapsus albolineatus</i>	Jamieson, 1991a
<i>Cyclograpsus punctatus</i>		Jamieson i Tudge, 2000	
<i>Varuna litterata</i>		Jamieson <i>et al.</i> , 1996	
<i>Eriocheir japonica</i>		Yasuzumi, 1960	
<i>Eriocheir sinensis</i>		Du <i>et al.</i> , 1987, 1993	
<i>Armases cinereum</i>		Jamieson i Tudge, 2000	
<i>Chiromantes haematocheir</i>		Honma <i>et al.</i> , 1992	
<i>Parasesarma erythroductyla</i>		Jamieson, 1991a	
<i>Parasesarma catenatum</i>		Jamieson i Tudge, 2000	
	<i>Sesarma reticulatum</i>	Felgenhauer i Abele, 1991; Jamieson i Tudge, 2000	

preparació), són susceptibles de ser abocats a les cèl·lules accessòries amb la resta del citoplasma (Langreth, 1969). Una característica comuna a totes les espermiogènesis descrites de braquiürs és que els mitocondris que resten en les espermatides queden embolcallats pel sistema de membranes (Pochon-Masson, 1962; Langreth, 1969; Reger, 1970; Medina i Rodríguez, 1992a; Simeó *et al.*, en preparació). El centríol, per la seva banda, es localitzen per sota del tub acrosòmic a la base de la vesícula proacrosòmica (Pochon-Masson, 1962). En alguns casos, els centríols presenten signes de degeneració (Langreth, 1969), i poden arribar a desaparèixer en algunes espècies (Reger, 1970). El fet que els centríols es trobin presents o absents en els espermatozoides obre una incògnita sobre la seva funció, i s'ha suggerit que podrien tenir un paper important durant la reacció acrosòmica. El sistema d'endomembranes és un dels grans tòpics en els estudis de l'espermiogènesi dels crustacis decàpodes, i tant l'origen com el desenvolupament i la funció romanen encara incerts. Al llarg

de l'espermiogènesi es poden distingir dos tipus de sistemes d'endomembranes: el sistema de membranes i les vesícules citoplasmàtiques. El sistema de membranes ha rebut noms diferents en els treballs realitzats: orgànul membranós (*membranous organelle*, Reger, 1970), *chondriofusome* (Pochon-Masson, 1962), complex membranós (*membrane complex*, Langreth, 1969) i làmines membranoses (*membranous lamellae*, Medina i Rodríguez, 1992a). La seva estructura i origen pot variar en les diferents espècies: en *Carcinus maenas* (Pochon-Masson, 1962) està format per fragments de les membranes nuclears, centríols i mitocondris; en *Cancer* sp. (Langreth, 1969) s'origina a partir de les cisternes del reticle endoplasmàtic lliures de ribosomes, associades a microtúbuls i mitocondris, mentre que en *Pinnixa* sp. (Reger, 1970) està format per les membranes de l'embolcall nuclear i el reticle endoplasmàtic. La funció del sistema de membranes encara no està aclarida. L'origen de les vesícules citoplasmàtiques varia segons les espècies estudiades, ja sigui del reticle en-



doplasmiàtic rugós (Pochon-Masson, 1962), del reticle endoplasmàtic llis (Langreth, 1969) o del complex de Golgi (Reger, 1970). En *M. brachydactyla*, com s'ha descrit en l'apartat anterior, les vesícules citoplasmà-

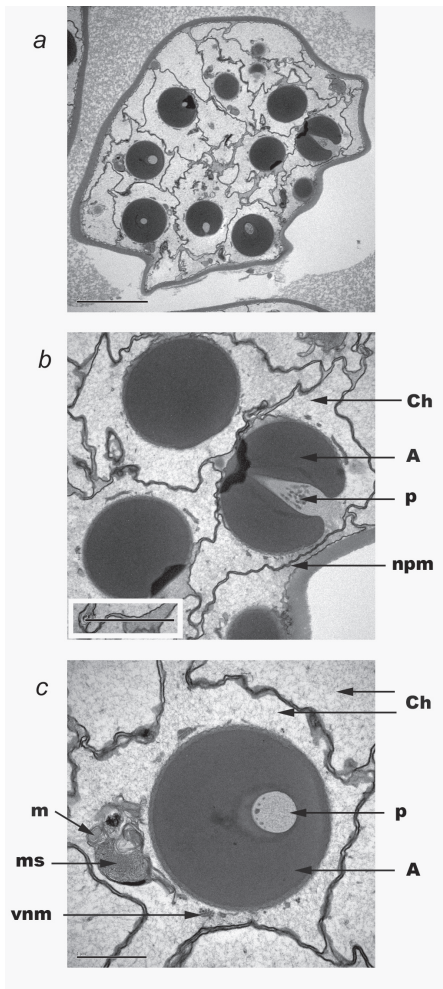


FIGURA 7. *Cancer pagurus*. Estructura general de l'espermatozoide (TEM). a) Espermatozoid obtingut del conducte deferent. b) Secció meridional d'un espermatozoide. c) Secció tallada equatorialment on es poden observar els òrgans d'origen citoplasmàtic immersos en la cromatina. A: acrosoma; Ch: cromatina; m: mitocondri; ms: sistema de membranes; npm: membrana nucleocitoplasmàtica; p: perforatorium; vnm: membranes vesiculades.

tiques, que en fusionar-se donaran lloc a la vesícula proacrosòmica, deriven fonamentalment del complex de Golgi, mentre que el sistema de membranes s'origina a partir de fragments de membranes del reticle endoplasmàtic i s'associa a microtúbuls i mitocondris (Simeó *et al.*, en preparació).

El desenvolupament de la vesícula acrosòmica es dona en un pol de la cèl·lula (Medina i Rodríguez, 1992a; Simeó *et al.*, en preparació) que, en augmentar de volum, desplaça el nucli a la perifèria de l'espermàtoida, i llavors el citoplasma queda entre

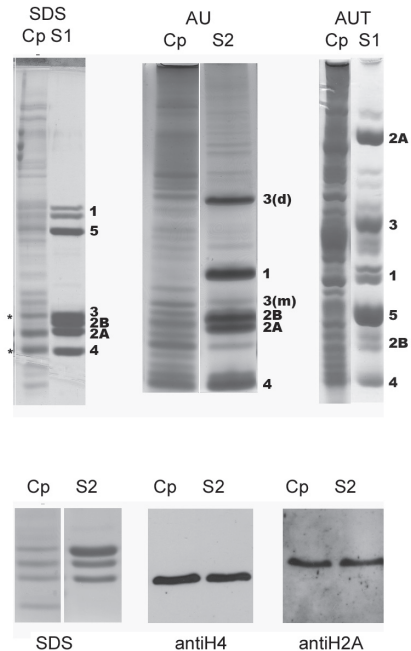


FIGURA 8. *Cancer pagurus*. Proteïnes bàsiques de l'espermatozoide. Gels de: poliàcrilamida/SDS (a dalt, esquerra), de poliàcrilamida/àcid acètic/urea (a dalt, mig), i de poliàcrilamida/àcid acètic/urea/tritó (a dalt, dreta) de les proteïnes espermatiques solubilitzades amb 0,4 N HCl. De 1 a 5: histones H1, H2A, H2B, H3, H4 i H5; 3(d): dímer de H3; 3(m): monòmer de H3. A baix: immunodetecció (a partir d'una separació en gel de SDS) de les proteïnes bàsiques dels espermatozoides de *C. pagurus* amb anti-H4 i anti-H2A. Cp: *C. pagurus*; S1: estàndard d'histones d'eritròcit de gallina; S2: estàndard d'histones d'espermatozoide de llampres.

el nucli i la vesícula. L'origen de l'acrosoma varia entre les espècies estudiades, i s'han descrit fins al moment els possibles llocs de procedència següents: el reticle endoplasmàtic (Pochon-Masson, 1962), les vesícules citoplasmàtiques d'origen no determinat (Langreth, 1969) i el reticle endoplasmàtic i el complex de Golgi (Reger, 1970; Simeó *et al.*, en preparació). Al llarg de l'espermio-gènesi, la vesícula proacrosòmica presenta una regionalització deguda a una reorganització interna dels seus components. El primer signe de diferenciació és l'aparició d'una regió electrodensa a la zona apical de la vesícula (Pochon-Masson, 1962; Langreth, 1969; Medina i Rodríguez, 1992a; Simeó *et al.*, en preparació) que, en forma de grànul, dóna lloc en alguns casos a l'opercle (Pochon-Masson, 1962; Langreth, 1969). Simultàniament apareix a la zona basal de la vesícula proacrosòmica una fina capa de material granular que envolta una inva-

ginació de la vesícula, de la qual resultarà el tub acrosòmic (Langreth, 1969; Medina i Rodríguez, 1992a; Simeó *et al.*, en preparació). Altres components granulars que es dipositen a la vesícula proacrosòmica s'organitzen, durant les fases finals de l'espermio-gènesi, generalment en tres capes concèntriques al voltant del tub acrosòmic.

L'espermatozoide dels braquiürs, com hem pogut constatar en aquest treball, és una cèl·lula aflagellada amb un acrosoma ben desenvolupat i complex, envoltat per una estreta franja de citoplasma i per un nucli amb cromatina poc condensada que ocupa la part més perifèrica de la cèl·lula. El nucli sol tenir prolongacions laterals en un nombre que varia segons les espècies. Els diferents tàxons de braquiürs presenten una gran diversitat morfològica espermàtica, que ha comportat un gran nombre d'estudis de la ultraestructura dels espermatozoides (vegeu la llista d'estudis).

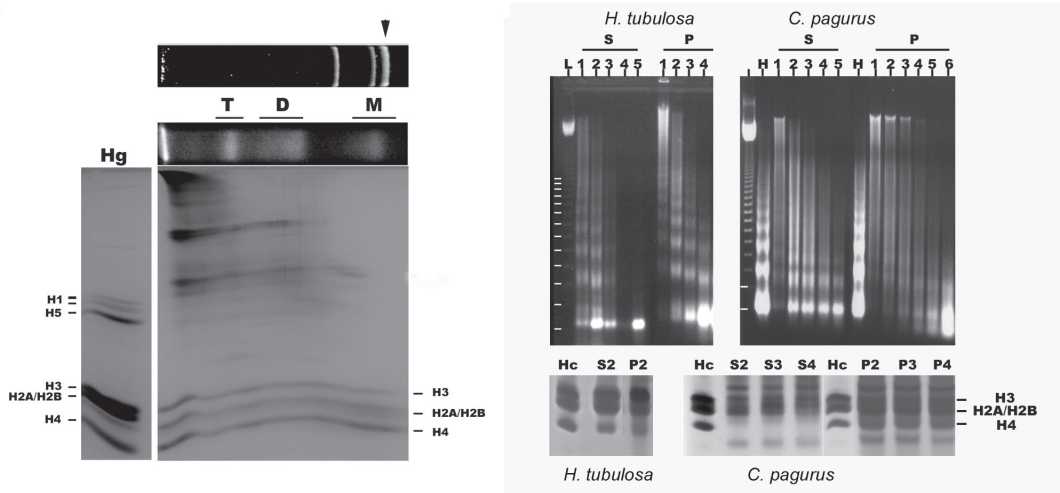


FIGURA 9. *Cancer pagurus*. Cromatina espermàtica. Esquerra: gel bidimensional que resol les proteïnes contingudes en els fragments de cromatina (obtinguts a partir de la digestió amb nucleasa micrococcal). Observeu que els mononucleosomes (M) i els di i trinucleosomes (D, T) contenen histones (H3, H2A, H2B, H4). Dreta: Gels d'agarosa amb els fragments de DNA que provenen de diferents temps d'incubació amb nucleasa micrococcal de la cromatina espermàtica d'*Holothuria tubulosa* (utilitzada com a control conegut) i de la cromatina espermàtica de *C. pagurus* (cinètiques d'incubació). 1 a 6: 2, 5, 10, 20, 40 i 120 minuts d'incubació; S: sobrenedant de les incubacions; P: sediment; L: estàndard de DNA de 123 parells de bases i dels seus múltiples. A la part de sota dels gels de DNA demostrem que les histones es troben associades als fragments de DNA, tant en el sobrenedant (Si), com en el sediment (Pi) de la reacció.

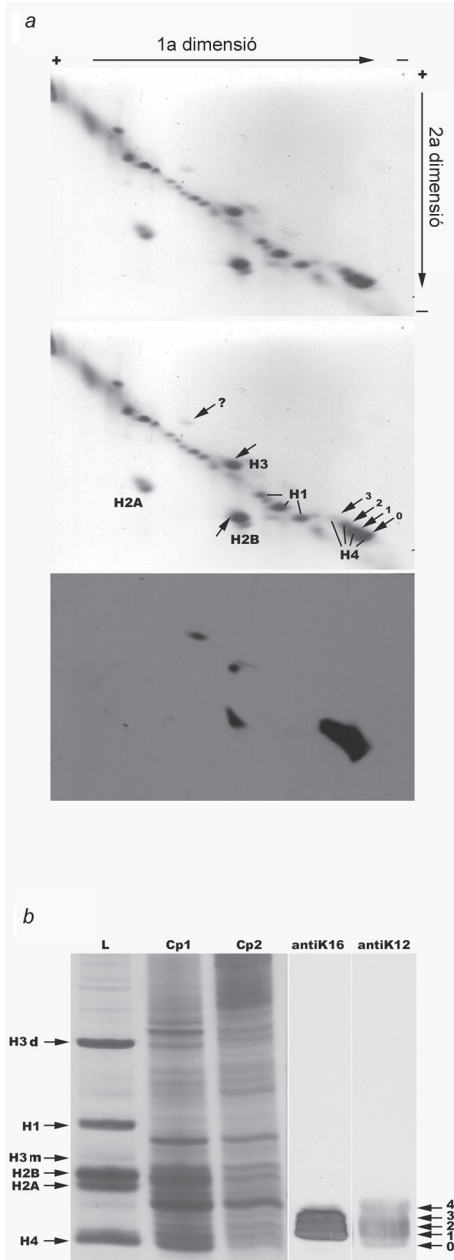


FIGURA 10. *Cancer pagurus*. Acetilació de les histones de l'espermatozoide. *a*) Electroforesi bidimensional de les proteïnes extreïdes dels espermatozoides de *C. pagurus* (a dalt), i de la seva reacció amb l'anticòs antiacetil-lisina (a sota). *b*) Formes mono, di i triacetilades de la histona H4 demostrades a través de la seva reacció amb anticossos específics contra la H4 acetilada en la lisina 16 i la lisina 12. L: histones estàndard d'espermatozoide de llampresa; Cp: histones de *C. pagurus*.

## EL NUCLI ESPERMÀTIC DELS CRUSTACIS DECÀPODES BRAQUIÛRS

### La cromatina espermàtica

El nucli espermàtic dels braquiürs ocupa una posició perifèrica a la cèl·lula i el seu contingut, la cromatina, mostra un aspecte poc electrodens i poc condensat (Chevaillier, 1966*a*, 1967, 1968; Langreth, 1969). Aquest últim aspecte contrasta amb la major part dels espermatozoides d'altres espècies animals, els quals tenen la cromatina molt condensada (apareix amb una elevadíssima electrodensitat en les imatges de microscòpia electrònica), i un volum nuclear molt reduït (vegeu Kurtz *et al.*, 2008). Moltes de les propietats del nucli espermàtic dels braquiürs estan relacionades amb el seu particular procés de fertilització. L'espermatozoide dels crustacis és aflagellat, i el moviment necessari per a la penetració del nucli espermàtic en el citoplasma oocitari és generat per un procés d'eversió del grànul acrosòmic (Hinsch, 1971; Brown, 1976; Goudeau, 1982; Medina i Rodríguez, 1992*a*). L'eversió de l'acrosoma origina un canal intern i provoca un arrossegament del nucli cap a l'interior del citoplasma oocitari a través de l'estret canal intern (vegeu la figura 6).

Els nuclis d'aquests espermatozoides han de tenir una consistència suficient per poder ser arrossegats sense trencar-se, i simultàniament una flexibilitat o capacitat de deformació adequada per poder travessar l'estret canal per on entren dins de l'oòcit.



Evidentment, els responsables principals d'aquestes propietats són la composició química i l'organització estructural de la cromatina.

L'anàlisi de les proteïnes de la cromatina espermàtica ha estat un objectiu a assolir força complicat. La major part dels estudis es van fer entre els anys seixanta i vuitanta del segle passat, i posteriorment van ser abandonats. En un article clàssic en aquest camp del coneixement, Bloch (1969) va demostrar a través de tincions histoquímiques que els nuclis dels crustacis decàpodes no contenien histones, ni protamina, ni cap altra proteïna bàsica que interaccionés amb el DNA. Els estudis realitzats per altres autors (la major part dels quals utilitzaven tècniques de tincions histoquímiques i d'altres a partir de cromatina solubilitzada) tampoc no van posar de manifest la presència de proteïnes bàsiques (Chevaillier, 1966a, 1967, 1968; Vaughn i Locy, 1969; Vaughn i Hinsch, 1972; Vaughn i Thomson, 1972). Vaughn i Hinsch (1972) van descriure en *Libinia emarginata* que l'única fracció de proteïnes que es podia solubilitzar a partir de la cromatina espermàtica, tenia un caràcter àcidic. A partir de l'any 1980 es troben molt pocs treballs que tractin de les proteïnes nuclears espermàtiques dels crustacis, i en particular dels braquiürs, i com a conseqüència el tema de la composició i organització de la cromatina espermàtica dels crustacis resta sense ser resolta.

### Composició i estructura de la cromatina de *Cancer pagurus*

Els espermatozoides de *C. pagurus* es troben estretament agrupats en els espermatòfors (vegeu la figura 7a). En aquesta figura també es pot observar l'espermatozoide d'aquest animal en secció meridional i equatorial (vegeu les figures 7b i c). Es pot

apreciar que la cromatina coexisteix sense una separació física completa (és a dir, a través d'un sistema de membranes) amb mitocondris, microtúbuls i altres components citoplasmàtics.

En un treball recent (Kurtz *et al.*, 2008), s'han reexaminat la composició i estructura del nucli espermàtic del decàpode braquiür *C. pagurus*, i s'han obtingut uns resultats que no coincideixen amb els dels estudis precedents, però que poden explicar-los, tal com es discuteix breument al final d'aquest apartat.

En primer lloc s'ha trobat que les cèl·lules espermàtiques íntegres (alliberades dels espermatòfors) contenen proteïnes que es poden identificar com a histones, perquè manifesten un comportament electroforètic en gels de poliacrilamida i SDS igual al de les histones control, i perquè reaccionen amb els anticossos anti-histona (vegeu la figura 8). Aquesta figura també mostra com les histones de l'espermatozoide de *C. pagurus* es resolen en diverses bandes electroforètiques quan són analitzades en gels de poliacrilamida/urea amb o sense tritó. Això suggereix que aquestes histones contenen modificacions postraduccionals (vegeu més endavant).

En segon lloc s'han observat, a través de digestions amb la nucleasa micrococcal, que aquestes histones es troben interaccionant amb el DNA, organitzant-lo en nucleosomes de 165-170 parells de bases (vegeu la figura 9). En aquest experiment també s'ha trobat que només el 50-60 % del DNA estaria associat a les histones.

Finalment, s'han estudiat algunes de les característiques d'aquestes histones. És destacable que la histona H4 de la cromatina espermàtica es troba en un estat elevat d'acetilació, i que les histones H2B i H3 també presenten acetilació però en un grau molt menor (vegeu la figura 10). És important tenir present que l'acetilació de les his-

tones disminueix la interacció electrostàtica entre aquestes proteïnes i el DNA i no permet que la cromatina es replegui en estructures més compactes. Una altra característica notable que ha posat en evidència l'estudi esmentat és que la relació proteïna/DNA en el nucli espermàtic és de 1,0 a 1,2 en aquelles espècies que condensen la cromatina, però que només té un valor de 0,5 a 0,6 en dues espècies del gènere *Cancer*. Aquesta proporció correspon aproximadament a la proporció de DNA no unit a histones (40-50 %) estimat a partir de les digestions amb la nucleasa micrococcal.

### Consideracions respecte als estudis dels altres autors

S'intenta poder respondre la pregunta: per quin motiu els diferents investigadors no van poder observar proteïnes bàsiques interaccionant amb el DNA en el nucli espermàtic madur d'aquestes espècies?

La major part dels treballs citats anteriorment es van efectuar a través de tincions histoquímiques, i alguns pocs a través d'anàlisis electroforètiques. D'una banda, la baixa proporció relativa entre histones i DNA (així com l'estat d'acetilació) probablement limita la intensitat de la reacció histoquímica (reactiu amb grups amino de les histones) i, per tant, la reacció no arribaria a un llindar mínim per ser detectada. També hem de dir que l'anàlisi electroforètica de les histones no és trivial: els nuclis no es poden purificar (ja que són molt fluids i es trenquen pels mètodes convencionals), i els extractes de proteïnes totals dels espermatozoides produeixen patrons electroforètics molt complexos en els quals la major part de proteïnes provenen del grànul acrosòmic, i en què les histones són minoritàries i no es poden reconèixer. Una última possibilitat a afegir és que actualment es disposa

de combinacions d'inhibidors de la proteòlisi molt eficaços, mentre que els investigadors dels anys 1960-1980 no podien controlar adequadament l'activitat proteolítica.

### CONCLUSIONS

Els espermatozoides dels crustacis decàpodes han despertat un gran interès per la seva morfologia poc usual: no tenen flagel i, per tant, no són mòbils o amb escassa mobilitat, fet que contrasta amb el típic model flagellat. La informació respecte als diferents aspectes sobre l'espermatogènesi dels crustacis decàpodes és escassa. En aquest treball, hem abordat aquest fet utilitzant els braquiürs com a model per a la descripció morfològica de l'espermatogènesi i l'estudi de les proteïnes associades a la cromatina dels espermatozoides.

Els aspectes més rellevants de l'espermatogènesi són: a) La formació d'un complex i voluminos acrosoma format, en el cas de la cabra de mar, *M. brachydactyla*, a partir de vesícules originades principalment pel complex de Golgi; b) la formació d'un sistema de membranes a partir del reticle endoplasmàtic, associat a microtúbuls i a pocs mitocondris, que forma un anell en la base de les prolongacions nuclears; c) la fusió de les membranes plasmàtica i nuclear, que donen lloc a una estructura membranosa pentalaminar en algunes regions de la superfície celular i d) la poca condensació que presenta el nucli de l'espermatozoide, a causa de la baixa proporció i la modificació de les histones associades a la cromatina.

El procés especial de la fertilització dels gàmetes dels crustacis decàpodes braquiürs posa una sèrie de restriccions estructurals i funcionals en els nuclis espermàtics. És molt possible que entre els crustacis hagin aparegut diferents solucions evolutives a tals restriccions i que no tots els nuclis

dels espermatozoides dels crancs tinguin una composició igual a la de *C. pagurus*. No obstant això, la composició d'aquesta cromatina (DNA organitzat en nucleosomes però no en estructures d'ordre superior a causa de l'acetilació de la histona H4, regions àmplies del DNA lliure d'histones) permet comprendre, almenys parcialment, la deformabilitat i fluïdesa del nucli per poder fecundar l'oòcit.

## AGRAÏMENTS

Els autors resten agraïts a Núria Cortadellas i Almudena García, de la Unitat de Microscòpia Electrònica dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona, i a Joan Ausió, del Departament de Bioquímica i Microbiologia de la Universitat de Victoria, British Columbia, Canadà. Aquest estudi s'ha realitzat amb el finançament del Departament d'Innovació, Universitats i Empresa i la Xarxa de Referència de Recerca, Desenvolupament i Innovació en Aqüicultura de la Generalitat de Catalunya, la Junta Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR), el Ministeri de Ciència i Innovació (ajut BFU 2005-00123/BMC i el programa Ramón i Cajal) i el Fons Social Europeu.

## BIBLIOGRAFIA

- ADIYODI, K. G.; ANILKUMAR, R. G. (1988). «Accessory sex glands». A: ADIYODI, K. G.; ADIYODI, R. G. [ed.]. *Reproductive biology of invertebrates*. Kerala: John Wiley and Sons: 261-318.
- BAUER, R. T. (1986). «Phylogenetic trends in sperm transfer and storage complexity in decapod crustaceans». *J. Crustacean Biol.*, 6: 313-325.
- BENINGER, P. G.; ELNER, R. W.; FOYLE, T. P.; ODENSE, P. H. (1988). «Functional anatomy of the male reproductive system and the female spermatheca in the snow crab *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius) (Decapoda: Majidae) and a hypotheses for fertilization». *J. Crustacean Biol.*, 8: 322-332.
- BINFORD, R. (1913). «The germ-cells and the process of fertilization in the crab, *Menippe mercenaria*». *J. Morphol.*, 24: 147-201.
- BLOCH, D. P. (1969). «A catalog of sperm histones». *Genetics*, 61 (supl. 1): 93-111.
- BROWN, G. G. (1966). «Ultrastructural studies of sperm morphology and sperm-egg interaction in the decapod *Callinectes sapidus*». *J. Ultra. Res.*, 14: 425-440.
- (1976). «Scanning electron-microscopical and other observations of sperm fertilization reactions in *Limulus polyphemus* L. (Merostomata-Xiphosura)». *J. Cell. Sci.*, 22: 547-562.
- CUARTAS, E. I.; SOUSA, L. G. (2007). «Ultrastructure study of the spermatophores and spermatozoa in *Uca uruguayensis* (Decapoda, Brachyura, Ocypodidae)». *Biociências*, 15: 21-28.
- CHEVAILLIER, P. (1966a). «Structure et constitution cytochimique de la capsule du spermatozoïde des Crustacés Décapodes». *C. R. Acad. Sci. Paris*, D262: 1546-1549.
- (1966b). «Contribution à l'étude du complexe ADN-histone dans le spermatozoïde du pagure *Eupagurus bernhardus* L. (Crustace Decapode)». *J. Microsc.*, 5: 739-758.
- (1967). «Mise en évidence et étude cytochimique d'une protéine basique extranucleaire dans les spermatozoïdes des crustacés décapodes». *J. Cell. Biol.*, 32: 547-556.
- (1968). «Etude cytochimique des nucléoprotéines dans le spermatozoïde du pagure *Eupagurus bernhardus* (Crustace decapode)». *J. Micr.*, 7: 107-114.
- (1969). «Evolution des constituants nucléaires et cytoplasmiques au cours de la spermatogenèse chez les Crustacés Décapodes». *C. R. Acad. Sci. Paris*, D269: 2251-2253.
- CHIBA, A.; KON, T.; HONMA, Y. (1992). «Ultrastructure of the spermatozoa and spermatophores of the zuiwai crab, *Chionoecetes opilio* (Majidae, Brachyura)». *Acta Zool.*, 73: 103-108.
- DIESEL, R. (1991). «Sperm competition and the evolution of mating behaviour in Brachyura, with special reference to spider crabs (Decapoda, Majidae)». A: BAUER, R. T.; MARTIN, J. W. [ed.]. *Crustacean sexual biology*. Nova York: Columbia University Press: 145-163.
- DU, N. H.; LAI, W.; XUE, L. H. (1987). «Acrosome reaction of the sperm in the chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis* (Crustacea, Decapoda)». *Acta Zool. Sinica*, 33: 8-13.
- DU, N. S.; LAI, W.; AN, Y.; JIANG, H. W. (1993). «Studies on the cytology of fertilization in the chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis* (Crustacea, Decapoda)». *Sci. China B*, 36: 288-296.

- EL-SHERIEF, S. S. (1991). «Fine structure of the sperm and spermatophores of *Portunus pelagicus* (L.) (Decapoda, Brachyura)». *Crustaceana*, 61: 271-279.
- ESTAMPADOR, E. P. (1949). «*Scylla* (Crustacea: Portunidae) II. Comparative studies on spermatogenesis and oogenesis». *Philipp. Jour. Sci.*, 78: 95-109.
- FASTEN, N. (1918). «Spermatogenesis of the pacific coast edible crab, *Cancer magister* Dana». *Biol. Bull.*, 34: 277-307.
- (1924). «Comparative stages in the spermatogenesis of various *Cancer* crabs». *J. Morphol.*, 39: 47-61.
- (1926). «Spermatogenesis of the black-clawed crab, *Lophopanopeus bellus* (Stimpson) Rathburn». *Biol. Bull.*, 50: 277-293.
- FELGENHAUER, B. E.; ABELE, L. G. (1991). «Morphological diversity of decapoda spermatozoa». A: BAUER, R. T.; MARTIN, J. W. [ed.]. *Crustacean sexual biology*. Nova York: Columbia University Press, 322-339.
- FORGES, B. R. DE; JAMIESON, B. G. M.; GUINOT, D.; TUDGE, C. C. (1997). «Ultrastructure of the spermatozoa of Hymenosomatidae (Crustacea: Brachyura) and the relationships of the family». *Mar. Biol.*, 130: 233-242.
- GOUDEAU, M. (1982). «Fertilization in a crab. I: Early events in the ovary, and cytological aspects of the acrosome reaction and gamete contacts». *Tissue & Cell*, 14: 97-111.
- GUINOT, D.; JAMIESON, B. G. M.; DEFORGES, B. R. (1994). «Relationship of Homolidae and Dromiidae—Evidence from spermatozoal ultrastructure (Crustacea, Decapoda)». *Acta Zool.*, 75: 255-267.
- GUINOT, D.; JAMIESON, B. G. M.; FORGES, B. R. DE; TUDGE, C. C. (1998). «Comparative spermatozoal ultrastructure of the three dromiacean families exemplified by *Homolodromia kai* (Homolodromiidae), *Sphaerodromia lamellata* (Dromiidae), and *Dynomene tanensis* (Dynomeneidae) (Podotremata: Brachyura)». *J. Crustacean Biol.*, 18: 78-94.
- GUINOT, D.; JAMIESON, B. G. M.; TUDGE, C. C. (1997). «Ultrastructure and relationships of spermatozoa of the freshwater crabs *Potamon fluviatile* and *Potamon ibericum* (Crustacea, Brachyura, Potamidae)». *J. Zool.*, 241: 229-244.
- HERNANDEZ, W.; BERRY, D.; BACCETTI, B.; AHLUWALLA, B.; MURRAY, S. A.; ANDERSON, W. A. (1989). «Remodeling of the nucleocytoplasm as consequence of the acrosomal reaction of the spider crab sperm». *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 21: 163-186.
- HINSCH, G. W. (1969). «Microtubules in the sperm of the spider crab, *Libinia emarginata* L.»». *J. Ultra. Res.*, 29: 525-534.
- (1971). «Penetration of the oocyte envelope by spermatozoa in the spider crab». *J. Ultra. Res.*, 35: 86-97.
- (1973). «Sperm structure of Oxyrhyncha». *Can. J. Zool.*, 51: 421-426.
- (1986). «A comparison of sperm morphologies, transfer and sperm mass storage between two species of crab, *Ovalipes ocellatus* and *Libinia emarginata*». *Int. J. Invertebr. Repr. Dev.*, 10: 79-87.
- (1988). «Ultrastructure of the sperm and spermatophores of the golden crab *Geryon fenneri* and a closely related species, the red crab *G. quinquedens*, from the eastern gulf of Mexico». *J. Crustacean Biol.*, 8: 340-345.
- (1991). «Structure and chemical content of the spermatophores and seminal fluid of reptantian decapods». A: BAUER, R. T.; MARTIN, J. W. [ed.]. *Crustacean sexual biology*. Nova York: Columbia University Press: 290-307.
- HONMA, Y.; OGIWARA, M.; CHIBA, A. (1992). «Studies on gonad maturity in some marine invertebrates. XII. Light and electron microscope studies on spermatozoa of the land crab, *Sesarma haematocheir* (de Haan)». *Rpt. Sado Mar. Biol. Sta. Niigata Uni.*, 22: 13-21.
- JAMIESON, B. G. M. (1989a). «Ultrastructural comparison of the spermatozoa of *Ranina ranina* (Oxystomata) and of other crabs exemplified by *Portunus pelagicus* (Brachygnatha) (Crustacea, Brachyura)». *Zoomorphology*, 109: 103-111.
- (1989b). «A comparison of the spermatozoa of *Oratosquilla stephensoni* and *Squilla mantis* (Crustacea, Stomatopoda) with comments on the phylogeny of the Malacostraca». *Zool. Scr.*, 18: 509-517.
- (1989c). «The ultrastructure of the spermatozoa of 4 species of xanthid crabs (Crustacea, Brachyura, Xanthidae)». *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 21: 579-584.
- (1990). «The ultrastructure of the spermatozoa of *Petalomera laterali* (Gray) (Crustacea, Brachyura, Dromiacea) and its phylogenetic significance». *Invertebr. Reprod. Dev.*, 17: 39-45.
- (1991a). «Sperm and phylogeny in the Brachyura (Crustacea)». A: BACCETTI, B. [ed.]. *Comparative spermatology 20 year after*. Nova York: Raven Press: 967-972.
- (1991b). «Ultrastructure and phylogeny of crustacean spermatozoa». *Mem. Queensl. Mus.*, 31: 109-142.
- (1993a). «Ultrastructure of the spermatozoon of *Potamonautes perlatus sidneyii* (Heterotremata, Brachyura, Crustacea)». *S. Afr. J. Zool.*, 28: 40-45.
- (1993b). «Spermatological evidence for the taxonomic status of *Trapezia* (Crustacea: Brachyura: Heterotremata)». *Mem. Queensl. Mus.*, 33: 225-234.
- (1994a). «Phylogeny of the Brachyura with particular reference to the Podotremata: Evidence from a



- review of spermatozoal ultrastructure (Crustacea, Decapoda)». *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 345: 373-393.
- (1994b). «Phylogeny of the Brachyura with particular reference to the Podotremata (Crustacea, Decapoda)». A: BRADLEY, M.; CUMMINS, J. [ed.]. *Seventh International Symposium on Spermatology*. Cairns (19-20 d'octubre).
- JAMIESON, B. G. M.; GUINOT, D. (1996). «The ultrastructure of the spermatozoon of *Australocarcinus riparis* (Crustacea: Brachyura: Troglaplacinae)». *Mem. Queensl. Mus.*, 39: 289-296.
- JAMIESON, B. G. M.; GUINOT, D.; DEFORGES, B. R. (1993a). «The spermatozoon of *Calocarcinus africanus* (Heterotremata, Brachyura, Crustacea): Ultrastructural synapomorphies with xanthid sperm». *Invertebr. Reprod. Dev.*, 24: 189-196.
- (1993b). «The ultrastructure of the spermatozoon of *Paradynomene tuberculata* Sakai, 1963 (Crustacea, Brachyura, Dynomenidae): Synapomorphies with dromiid sperm». *Helgol. Meeresunters.*, 47: 311-322.
- (1993c). «Spermatozoal ultrastructure in four genera of Homolidae (Crustacea, Decapoda): Exemplified by *Homologenus* sp., *Latreillopsis* sp., *Homolomania sibogae* and *Paromolopsis boasi*». *Helgol. Meeresunters.*, 47: 323-334.
- (1994b). «Relationships of the Cyclodorippoidea Ortmann—Evidence from Spermatozoal Ultrastructure in the Genera *Xeinostoma*, *Tymolus* and *Cymonomus* (Crustacea, Decapoda)». *Invertebr. Reprod. Dev.*, 26: 153-164.
- (1996). «Contrasting spermatozoal ultrastructure in two thoracotreme crabs, *Cardisoma carnifex* (Gecarcinidae) and *Varuna litterata* (Grapsidae) (Crustacea: Brachyura)». *Invertebr. Reprod. Dev.*, 29: 111-126.
- (1994a). «Podotreme affinities of *Raninoides* sp. and *Lyreidus brevifrons*: evidence from spermatozoal ultrastructure (Crustacea: Brachyura: Raninoidea)». *Mar. Biol.*, 120: 239-249.
- (1995). «Phylogeny of the Brachyura (Crustacea, Decapoda): evidence from spermatozoal ultrastructure». *Mém. Mus. Natn. Hist. Nat.*, 166: 265-283.
- JAMIESON, B. G. M.; GUINOT, D.; TUDGE, C. C.; FORGES, B. R. DE (1997). «Ultrastructure of the spermatozoa of *Corystes cassiveolaunus* (Corystidae), *Platepistomananum* (Cancriidae) and *Cancer pagurus* (Cancriidae) supports recognition of the *Corystoidea* (Crustacea, Brachyura, Heterotremata)». *Helgol. Meeresunters.*, 51: 83-93.
- JAMIESON, B. G. M.; SCHELTINGA, D. M.; FORGES, B. R. DE (1998). «An ultrastructural study of spermatozoa of the Majidae with particular reference to the aberrant spermatozoon of *Macropodia longirostris* (Crustacea, Decapoda, Brachyura)». *Acta Zool.*, 79: 193-206.
- JAMIESON, B. G. M.; TUDGE, C. C. (1990). «Dorippids are Heterotremata: evidence from ultrastructure of the spermatozoa of *Neodorippe astuta* (Dorippidae) and *Portunus pelagicus* (Portunidae) Brachyura: Decapoda». *Mar. Biol.*, 106: 347-354.
- (2000). «Crustacea-Decapoda». A: JAMIESON, B. G. M. [ed.]. *Reproductive biology of invertebrates*. Nova Delhi: Oxford & IBH Publishing: 1-95.
- JAMIESON, B. G. M.; TUDGE, C. C.; SCHELTINGA, D. M. (1993d). «The ultrastructure of the spermatozoon of *Dromidiopsis edwardsi* Rathburn, 1919 (Crustacea: Brachyura: Dromiidae): Confirmation of a dromiid sperm type». *Aust. J. Zool.*, 41: 537-548.
- KROL, R. M.; HAWKINS, W. E.; OVERSTREET, R. M. (1992). «Reproductive components». A: HARRISON, F. W.; HUMES, A. G. [ed.]. *Microscopic anatomy of invertebrates*. Nova York: Wiley-Liss, Inc.: 295-343.
- KURTZ, K.; MARTÍNEZ-SOLER, F.; AUSIÓ, J.; CHIVA, M. (2008). «Histones and nucleosomes in *Cancer* sperm (Decapod: Crustacea) previously described as lacking basic DNA-associated proteins: A new model of sperm chromatin». *J. Cell. Biochem.*, 105: 574-584.
- LANGRETH, S. G. (1965). «Ultrastructural observations on sperm of crab *Cancer borealis*». *J. Cell. Biol.*, 27: A56-A57.
- (1969). «Spermiogenesis in cancer crabs». *J. Cell. Biol.*, 43: 575-603.
- MEDINA, A. (1992). «Structural modifications of sperm from the fiddler crab *Uca tangeri* (Decapoda) during early stages of fertilization». *J. Crustacean Biol.*, 12: 610-614.
- MEDINA, A.; RODRÍGUEZ, A. (1992a). «Spermiogenesis and sperm structure in the crab *Uca tangeri* (Crustacea, Brachyura), with special reference to the acrosome differentiation». *Zoomorphology*, 111: 161-165.
- (1992b). «Structural changes in sperm from the fiddler crab, *Uca tangeri* (Crustacea, Brachyura), during the acrosome reaction». *Mol. Reprod. Dev.*, 33: 195-201.
- MOUCHET, S. (1931). «Spermatophores des Crustacés Décapodes Anomures et Brachyours et castration parasitaire chez quelques Pagures». *Ann. Sta. Océanogr. Salammbô*, VI: 1-203.
- MURRAY, S. A.; GESIOTTO, J.; PEREZ, R.; BACCETTI, B.; ANDERSON, W. A. (1991). «Polyethylene-glycol induced fusion of crustacean sperm and rat-liver cells in culture». A: BACCETTI, B. [ed.]. *Comparative spermatology 20 years after*. Nova York: Raven Press: 575-579.

- NAGAO, J.; MUNEHARA, H. (2003). «Annual cycle of testicular maturation in the helmet crab *Telmessus cheiragonus*». *Fish. Sci.*, 69: 1200-1208.
- NATH, V. (1932). «The spermatid and sperm of the crab *Paratelmessus spinigera*». *Q. J. Microsc. Sci.*, 75: 543-556.
- PEARSON, P. J.; WALKER, M. H. (1975). «Alteration of cytochrome-C oxidase activity during spermatogenesis in *Carcinus maenas*». *Cell Tissue Res.*, 164: 401-410.
- POCHON-MASSON, J. (1962). «Le chondriofusome des gamètes males du Crustacé Décapode *Carcinus maenas*». *C. R. Acad. Sci. Paris*, 254: 4076-4078.
- (1968). «L'ultrastructure des spermatozoïdes vésiculaires chez les crustacés décapodes avant et au cours de leur dévegination expérimentale. I. Brachyours et Anomours». *Ann. Sci. Nat. Zool.*, 10: 1-100.
- REGER, J. F. (1970). «Studies on the fine structure of spermatids and spermatozoa of the crab, *Pinnixia* sp.». *J. Morphol.*, 132: 89-100.
- REGER, J. F.; ESCAIG, F.; POCHON-MASSON, J.; FITZGERALD, M. E. C. (1984). «Observations on crab, *Carcinus maenas*, spermatozoa following rapid-freeze and conventional fixation techniques». *J. Ultra. Res.*, 89: 12-22.
- RORANDELLI, R.; PAOLI, F.; CANNICCI, S.; MERCATI, D.; GIUSTI, F. (2008). «Characteristics and fate of the spermatozoa of *Inachus phalangium* (Decapoda, Majidae): Description of novel sperm structures and evidence for an additional mechanism of sperm competition in brachyura». *J. Morphol.*, 269: 259-271.
- ROTLANT, G.; GONZÁLEZ-GURRIARÁN, E.; FERNÁNDEZ, L.; BENHALIMA, K.; RIBES, E. (2007). «Ovarian maturation of the multi-spawning spider crab *Maja brachydactyla* (Decapoda: Majidae) with special reference to yolk formation». *Mar. Biol.*, 152: 383-394.
- SIMEÓ, C. G.; KURTZ, K.; CHIVA, M.; RIBES, E.; ROTLLANT, G. «Spermatogenesis of the spider crab, *Maja brachydactyla* (Decapoda: Brachyura)». [En preparació]
- SIMEÓ, C. G.; RIBES, E.; ROTLLANT, G. «Internal anatomy and ultrastructure of the male reproductive system of the spider crab *Maja brachydactyla* (Decapoda: Brachyura)». [En revisió]
- SUBRAMONIAN, T. (1991). «Spermatophores and sperm transfer in marine crustaceans». *Adv. Mar. Biol.*, 29: 129-214.
- TUDGE, C. C.; GRELLIER, P.; JUSTINE, J. L. (1994). «Actin in the acrosome of the spermatozoa of the crab, *Cancer pagurus* L. (Decapoda, Crustacea)». *Mol. Reprod. Dev.*, 38: 178-186.
- TUDGE, C. C.; JAMIESON, B. G. M.; SEGONZAC, M.; GUINOT, D. (1998). «Spermatozoal ultrastructure in three species of hydrothermal vent crab, in the genera *Bythograea*, *Austinograea* and *Segonzacia* (Decapoda, Brachyura, Bythograeidae)». *Invertebr. Reprod. Dev.*, 34: 13-23.
- TUDGE, C. C.; JUSTINE, J. L. (1994). «The cytoskeletal proteins actin and tubulin in the spermatozoa of 4 decapod crabs (Crustacea, Decapoda)». *Acta Zool.*, 75: 277-285.
- VAUGHN, J. C.; HINSCH, G. W. (1972). «Isolation and characterization of chromatin and DNA from the sperm of the spider crab, *Libinia emarginata*». *J. Cell Sci.*, 11: 131-152.
- VAUGHN, J. C.; LOCY, R. D. (1969). «Changing nuclear histone patterns during development. III: The deoxyribonucleic acid content of spermatogenic cells in the crab *Emerita analoga*». *J. Histochem. Cytochem.*, 17: 591-600.
- VAUGHN, J. C.; THOMSON, L. A. (1972). «A kinetic study of DNA and basic protein metabolism during spermatogenesis in the sand crab, *Emerita analoga*». *J. Cell. Biol.*, 52: 322-337.
- YASUZUMI, G. (1960). «Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy: VII. Spermatid differentiation in the crab, *Eriocheir japonicus*». *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 7: 73-78.