Anatomia, fisiologia e morfologia degli animali domestici, Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Palermo

SU UNA NUOVA COLORAZIONE ISTOCHIMICA DELLE CELLULE GERMINALI MASCHILI

Negli ultimi decenni con tecniche di microscopia elettronica, molti Autori hanno descritto la presenza di zone argirofile nell'area post acrosomiale di spermatozoi in diverse specie di Mammiferi. Importanti tra l'altro sono i lavori di Fawcett, D. W. (1970), Peterson, R. N. (1982), Koeller, J. K. (1978), Fawcett, D.W. and Philips, D.M. (1969, a), Philips, D.M. (1977, a, b) Philips, D.M. (1980), Czakèr, R. (1985, C).

La presente metodica di istochimica permette l'evidenziazione di zone argirofile nelle cellule germinali di coniglio su strisci di liquido spermatico. Oltre a tale colorazione, ne è stata allestita un'altra, basata sull' azione impregnante del cloruro d'oro e sull'effetto foto-chimico dato dai raggi solari. A tal proposito è stata segnalata la presenza di proteine coniugate (glico proteine) e di proteine semplici a livello della membrana plasmatica degli spermatozoi aventi stretta affinità all'oro colloidale.[7]

Sia la colorazione che utilizza i sali d'argento sia quella che fa uso di un sale aureo, secondo la mia opinione, sono valide per l'allestimento di strisci di liquido spermatico nei quali si vogliano evidenziare spermatozoi e alcune loro particolarità strutturali. La metodica basata sull'azione dei sali d'argento, che sfrutta l'argirofilia di certe zone della coppa post acrosomiale, può essere utilizzata anche su sezioni istologiche di segmenti di testicoli.

Le due metodiche di colorazione – la argirofola e quella con sale aurico - evidenziano la morfologia ed alcune strutture degli spermatozoi e permettono di avanzare le seguenti ipotesi:

Le proteine argirofile del setto e della coppa post acrosomiale avrebbero sequenza lineare perpendicolare rispetto all'asse longitudinale della testa dello spermatozoo.

Tali proteine formerebbero striature tra loro parallele.

La presenza di legami interproteici spiegherebbe la disposizione lineare.

La calicina sarebbe una di queste proteine evidenziata da alcuni Autori[33] con metodiche di immunoistochimica.

RECENTI RICERCHE

La struttura e l'ultrastruttura di spermatozoi di bovino su sezioni ultrafini sono state riportate e descritte con l'apporto di nuovi particolari, in vari lavori. [5,8,10,13,21 Peterson, R.N. (1972, a))

Alcuni autori[6,17] hanno visto che una soluzione a base di acido fosfotunghstico al 10% e di acido cromico pure al 10%, colora selettivamente ed in modo differ-

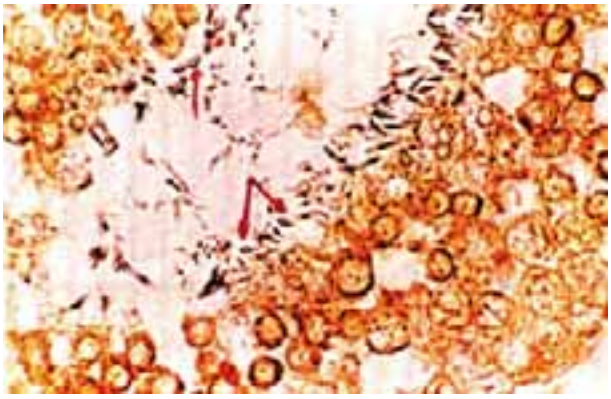


Fig.1. Sezione istologica di testicolo. Ingrandimento 40X Colorazione al nitrato di argento (colorazione B, riportata nel presente articolo). Si osservano numerose cellule rotondeggianti col citoplasma colorato, alcune in giallo paglierino, altre con intensa tinta marrone. Tali cellule sono spermatogoni e spermatociti in vari periodi di maturazione. Nel lume del tubulo è evidente anche la presenza di cellule germinali mature (spermatozoi) la cui testa indicata dalle freccette, appare fortemente argirofila ed è colorata per questo di nero

ente sia l'acrosoma, sia le membrane plasmatiche di eiaculato spermatico di suino.

Gli Autori sopra menzionati hanno dato informazioni sulla morfologia di tali cellule e introdotto nuove tecniche. Alcuni filoni di ricerca hanno gettato le basi per ulteriori studi. Un lavoro ha evidenziato la disposizione lamellare, in strati paralleli, di materiale nucleare, mediante tecniche di birifrangenza e di diffrazione a raggi X.[36]

Alcuni dettagli strutturali, come la lamina post acrosomiale densa e la lamina densa intramembranosa, sono stati descritti da Belford, J.M. (1968 e 1970).

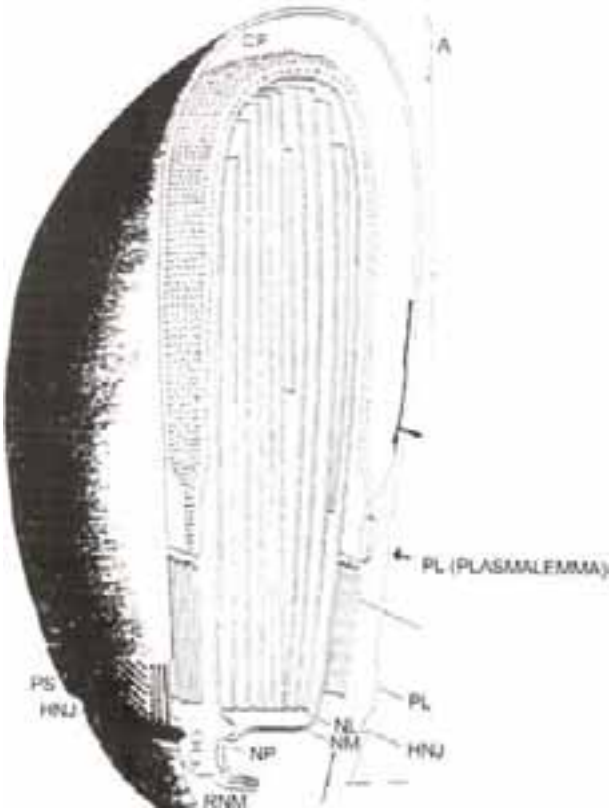
Secondo certi autori[30,31] la coppa post - nucleare (o post acrosomiale) sarebbe avvolta da una membrana di mucopolisaccaridi solforati. Altri[11,12,22] affermano che la lamina densa post acrosomiale è fatta di materiale amorfo. Alcuni studiosi[5,21] hanno evidenziato la presenza di pori e di sub unità fibrillari regolarmente distribuiti nella zona post acrosomiale di spermatozoi bovini. Tale zona è stata indicata anche col termine di lamina densa post acrosomiale.

In alcuni lavori[23,24,25] si afferma che le membrane acrosomiali dell'area posteriore (il segmento equatoriale) sono pentalaminari nella scimmia ed in altri primati. Inoltre, gli stessi studi hanno rilevato in questa regione un sistema di strutture circolari concentriche e regolari, distanziate l'un l'altra da uno spazio di 17 µm. Un'altra ricerca[34,35] ha messo in evidenza la presenza della proteina filamentosa ACTINA nelle membrane acrosomiali dell'area posteriore, nel coniglio e nel topo.

Diversi autori[3,4,18,19] hanno sottolineato, sotto vari aspetti, l'importanza rivestita dalle membrane acrosomiali nella maturazione degli spermatozoi. La metodica istochimica[16] basata sull'utilizzo di sali d'argento, mette in evidenza una spiccata argirofilia nella regione post acrosomiale, in particolare a livello delle membrane della coppa sotto nucleare (o post acrosomiale). Viceversa la regione acrosomiale sembrerebbe del tutto priva di positività. Un recente lavoro[32] descrive la disposizione dei nano dendriti aventi affinità per i sali di argento all'interno delle cellule germinali maschili.

MATERIALE E METODI

Abbiamo utilizzato dodici conigli maschi di età puberale e post puberale per la presente ricerca. Strisci di liquido spermatico sono stati fissati mediante CYTO PREP SPRAY (FISCHER SCIENTIFIC, Co) e tenuti in stufa a 37°C per un tempo di 10 minuti. Come precedentemente è stato puntualizzato abbiamo usato il cloruro d'oro per l'allestimento di una metodica di colorazione



MEMBRANA ACROSOMIALE

Fig. 2.
PS = STRIATURE PARALLELE
PL = PLASMALEMMA
PNC = COPPA POST-NUCLEARE
PS = STRIATURE PARALLELE
HNJ = CONGIUNZIONE TESTA COLLO
NM = MEMBRANA NUCLEARE

molto semplice e rapida. Si è utilizzato invece il nitrato di argento per una seconda metodica di colorazione che a nostro avviso permette la ricezione di una maggiore ricchezza di particolari.

COLORAZIONE A *(al cloruro d'oro)*

Questa colorazione è eseguita in parte al buio ed in parte alla luce. Si compone di cinque passaggi fondamentali.
I vetrini prelevati dalla stufa sono sciacquati in acqua distillata per cinque minuti. E' importante che l'acqua distillata sia riscaldata alla temperatura di 37°C.
Immersione in una soluzione di oro colloidale (cloruro d'oro) all' 1% al buio per dieci minuti. La soluzione deve essere mantenuta riscaldata a 37°C.
Lavaggio in acqua distillata acidulata con due ml. di CH3COOH (acido acetico). Eseguire due cambi ed esposizione alla luce per sessanta minuti. Durante l'esposizione solare i vetrini rimangono nell' acqua acidulata. La sol. acidulata non deve scendere al di sotto di una certa temperatura. La temperatura consigliata può oscillare dai +25 ai+ 40°C.
Lavaggio in acqua distillata a temperatura ambiente.
Si può eseguire la disidratazione nella serie degli alcoli, xilolo e chiusura ermetica con un vetrino copri oggetto. I vetrini possono essere anche fotografati direttamente èvitando disidratazione ed il successivo passaggio in xilolo.
Le cellule germinali maschili presentano colorazione tendente al viola nelle regioni post acrosomiali (coppa post nucleare). La maggiore positività si riscontra a livello della giunzione testa-collo che assume una tonalità molto scura. L'acrosoma ha tinta rosea pallida e il flagello è scuro così come la zona del collo che come si sa è piena di mitocondri.

COLORAZIONE B *(all'argento colloidale)*

Per l'esecuzione di questa colorazione istochimica si usano due soluzioni che sono distinte in soluzioni di base e soluzioni di lavoro.
A Soluzione di base tamponata (Sol. A).
Una soluzione di 0.1 M di (2-4-6) Colloidina è preparata nel seguente modo.
Si sciolgono 6.5ml di colloidina in circa 450 ml di acqua distillata. La soluzione è filtrata per rimuovere particelle solide. Si aggiunge ac. nitrico al 10% (PN) quanto ne è sufficiente per ottenere il pH a 7.2. Il volume è quindi portato a 500 con aggiunta di acqua distillata. Questa soluzione può essere conservata a lungo a +4°C.
Soluzione tampone diluita (Sol. B).
Per ottenere la soluzione per lavorare si prendono 88 cc di acqua distillata.
A questa si aggiungono 4 cc di AgN03 (nitrato di argento) all' 1 % ed 8 cc di soluzione A.
Cioè:

88 cc di H20 dix	+
4 cc di AgN03 all' 1 %	+
8 cc di soluzione tamponata (sol. A)	=

100 cc di soluzione tamponata diluita

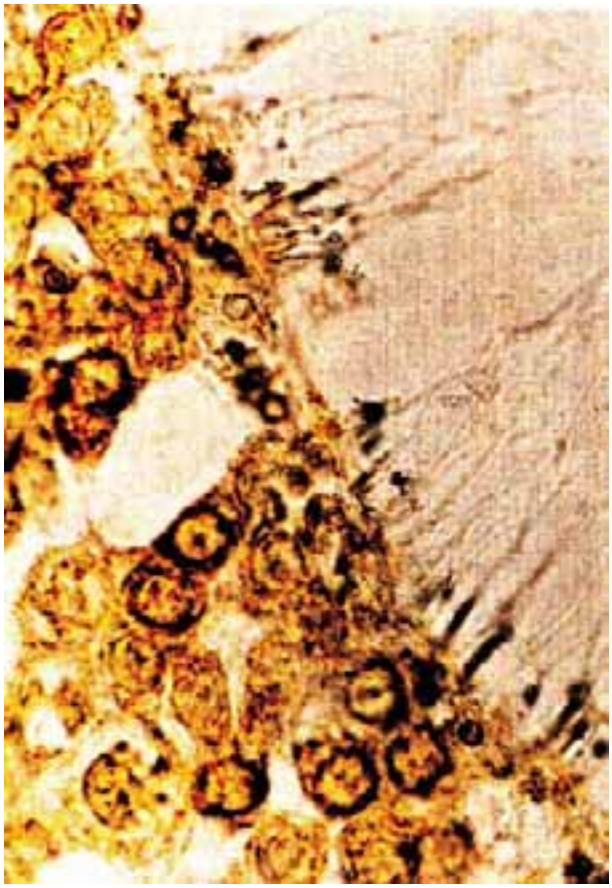


Fig.3. Testicolo. Tubulo seminifero contorto. Sezione istologica. Ingrandimento 40X Metodo argirofilo (metodo B). Sono evidenti numerosi spermatozoi le cui teste appaiono colorate in nero. Si osservano anche le code, i flagelli, di tali cellule all'interno del lume tubulare. Le cellule germinali immature sono rotondeggianti con grosso nucleo chiaro e citoplasma in alcune di colore marrone, in altre giallo paglierino

Soluzione di sviluppo *(sol. C di base).*
Venti grammi di sodi o solfito (Na2S03. 7H20) e di 4.75 gr di borace sono sciolte in circa 400 cc di acqua distillata mediante riscaldamento a 50°C.
Dieci grammi di gelatina a lamine si aggiungono a questa soluzione finchè il tutto si scioglie e si omogeinizza a caldo.

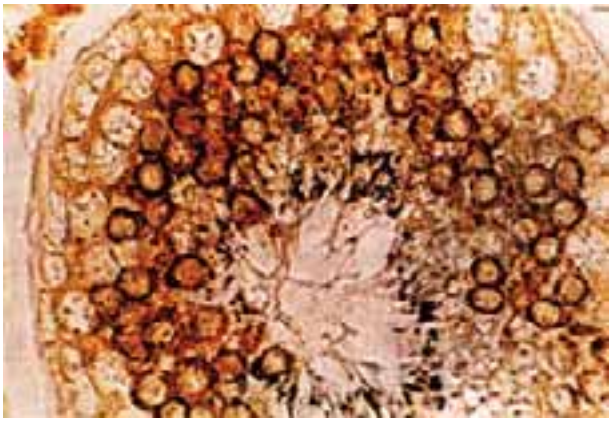


Fig.4. Testicolo. Tubulo seminifero contorto. Metodo argirofilo (colorazione B). Sezione istologica. Ingrandimento 40X2

Fig.5. Strisci di liquido spermatico di coniglio. Colorazione al nitrato di argento (Colorazione B)
La parte intermedia della coppa post nucleare è scarsamente argirofila ed appare in genere chiara. Se si aumenta la temperatura di impregnazione oltre i cinquanta gradi, anche questa zona risulta positiva. Ingrandimento 60X

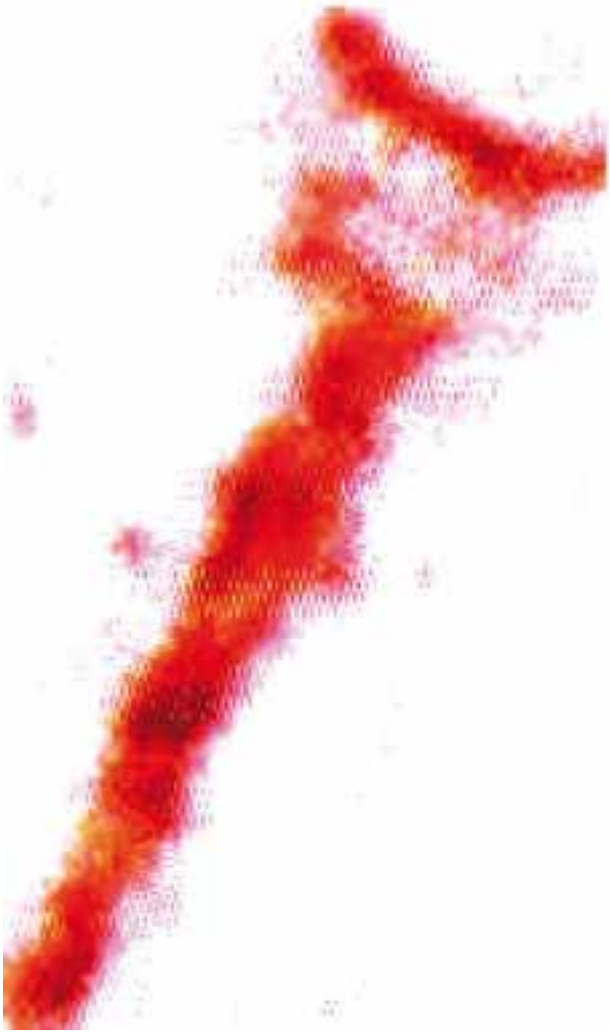


Fig.6. La regione sotto nucleare e flagello mostrano una spiccata argirofilia come si vede nell'ingrandimento di 120 X (colorazione A)

Il volume totale è portato infine a 500 cc aggiungendo acqua distillata.

Soluzione di sviluppo di lavoro *(Sol. D).*
Per ottenere una soluzione di lavoro si prelevano 95cc di soluzione di sviluppo (sol. C di base) a cui si aggiungono 5cc di idrochinone al 2% mescolando immediatamente. La temperatura della soluzione non deve essere inferiore ai 25°C. Al momento dell'utilizzo, per accelerare la reazione istochimica, si aggiungono 1-2 cc di AgN03 all' 1 % (mescolando il tutto). Dentro questa soluzione di sviluppo sono posti i vetrini con gli strisci di liquido spermatico e vi sono mantenuti per circa cinque minuti a 40°C.
Ricapitolando, l'esecuzione della colorazione istochimica di cellule germinali maschili su strisci di liquido spermatico comprende i seguenti passaggi.
Gli strisci di liquido spermatico sono subito fissati con un fissativo spray in un ambiente non troppo freddo. La temperatura ottimale dovrebbe aggirarsi intorno ai +25, + 30°C o anche di più.
I vetrini sono messi ad asciugare in stufa a +38°C per dieci minuti.
Lavaggio dei vetrini in acqua distillata riscaldata a +40°C.
Immersione dei vetrini nella soluzione di lavoro diluita (so1.8) previamente riscaldata a 40°C. In tale soluzione i vetrini rimangono per un periodo di 30 minuti, ad una temperatura di 40°C.

Lavaggio in acqua distillata a 40°C.
Immersione dei vetrini in una soluzione di sviluppo (e di lavoro) cioè in sol. D dove i vetrini rimangono per cinque minuti alla temperatura di oltre 25°C (tra i 25 ed i 35°C).
La colorazione come si vede, richiede un tempo di esecuzione che si aggira intorno ai 100 minuti (110 minuti circa se si considera il tempo di permanenza dei vetrini in stufa). La parte più difficoltosa di questa colorazione consiste nell'allestimento delle soluzioni di base, in particolare la soluzione A che deve avere un pH di 7.2. Alterazioni della concentrazione idrogenionica di questa soluzione compromettono la riuscita della metodica. Allestite le soluzioni di base conservabili a lungo in frigorifero, la colorazione è semplice e rapida. Importante è inoltre mantenere una temperatura elevata dei vetrini durante i vari passaggi (intorno ai 40°C). Nell'ultimo passaggio, quello nella soluzione di sviluppo, la temperatura può scendere a 25-35°C.
Una volta colorati, i vetrini sono lavati in acqua distillata a temperatura ambiente (consigliabile effettuare due passaggi), disidratati nella serie degli alcoli, immersi in xilolo e sigillati in un vetrino coprioggetto. Gli strisci possono essere fotografati anche direttamente, prima di essere fissati ad un vetrino copri oggetto ed in questo caso non si eseguono i passaggi nella serie degli alcoli e xilolo.
Con la presente metodica istochimica la zona post acrosomiale si colora in marrone scuro e presenta due bande, separate da una striscia bianca incolore. Le due zone positive corrispondono la prima, al segmento equatoriale e la seconda alla parte inferiore della coppa post-acrosomiale (zona delle striature parallele) cioè alla lamina densa post acrosomiale e giunzione testa collo. Come detto, il tratto compreso tra il segmento equatoriale e la lamina densa post acrosomiale è negativo ed appare chiaro, incolore.
Il flagello e la zona del collo appaiono pure debolmente colorati con tonalità tendenti al nero. Invece l'acrosoma nella sua interezza è negativo. Le microfotografie eseguite con la metodica istochimica dimostrano le diverse zone positive alla colorazione argentica (zone argirofile). Con questa metodica argirofila si possono eseguire anche colorazioni su sezioni istologiche di preparati di testicolo. In questo caso i pezzi di testicolo di circa 3 cm sono fissati in liquido di Bouen, disidratati in alcool, passati in xilolo ed inclusi in paraplast. Le sezioni istologiche di 4-5 micron di spessore sono colorate secondo la metodica al nitrato d'argento sopra descritta.

Le cellule germinali maschili, nei vari periodi di maturazione e le teste degli spermatozoi, tranne l'acrosoma, sono intensamente colorate di nero. L'acrosoma, quando è identificabile, presenta una colorazione azzurrina.
Gli spermatociti di primo e secondo ordine e gli spermatici hanno il corpo cromatoide intensamente colorato in arancione o in marrone. Il citoplasma di tali cellule ha colorazione giallo paglierina. Il nucleo è negativo (è incolore) ed il nucleolo dove appare è colorato intensamente, con tinta nerastra.
Gli spermatozoi presentano, come detto, la coppa sotto nucleare e le membrane acrosomiali colorate intensamente di nero. La coda (il flagello) è anch'esso positivo ai sali di argento e si presenta con un alone scuro, allungato, sporgente nel lume dei tubuli seminiferi contorti.

	SCHEMA DI COLORAZIONE (ALL'ORO CLORURO) A
1.	STUFA per circa 10 minuti a 37°C.
2.	LAVAGGIO in acqua distillata a 37°C.
3.	IMMERSIONE in oro cloruro all'1% al buio per 10 minuti a 37°C.
4.	LAVAGGIO in acqua acidulata con 2cc di acido acetico (due cambi).
5.	ESPOSIZIONE dei vetrini immersi nella sol. acidulata al sole per un'ora.
6.	LAVAGGIO in acqua distillata.
7.	DISIDRATAZIONE e xilolo.
	SCHEMA DI COLORAZIONE ALL' ARGENTO (COLORAZIONE B)
1.	FISSAZIONE CON UNO SPAY FISSATIVO.
2.	STUFA per dieci minuti a 38°C.
3.	LAVAGGIO in acqua distillata (riscaldata a 40°C)
4.	SOLUZIONE TAMPONE DILUITA (sol. B) a 40°C per 30 minuti.
5.	LAVAGGIO in acqua distillata a 40°C.
6.	SOLUZIONE DI SVILUPPO (SOL. D). Tempo di permanenza 5 min.
7.	LAVAGGIO in acqua distillata a temperatura ambiente.
8.	DISIDRATAZIONE, xilolo e montaggio con vetrino copri oggetto.

Tab.7. Tabella riassuntiva delle metodiche di colorazione

Come precisato, è importante mantenere gli strisci a temperatura ambiente. Il liquido spermatico a contatto con una temperatura troppo bassa, tende a diventare sempre più impermeabile all'azione sia dei sali di impregnazione, sia anche all'azione degli anticorpi (metodiche di immunoistochimica)

BIBLIOGRAFIA

1. Belford J.M.:
   American. Journal of Anatomy, 1967, 12, 239.
2. Belford J.M.:
   Biol. Reprod. Suppl., 1970, 2, 129.
3. Belford J.M.:
   In Hamilton D.W., Geep RO (eds): Handbook of physiology, sec. VII: Endocrinology, vol. V, Physiol. Soc.. Bethesda, 1975, 303-317.

4. Belford J.M.:
In Fawcett, D.W.: The spermatozoom. Urban & Schwarzemberg, Baltimore Munich, 1979, 7-21.
5. Bloom E., Birch-Andersen A.:
Nord Veterinaer Med., 1965, 17, 193.
6. Clegg E.D., Morre D.L. Lustra O.O.: In: Duckett, L.G., Racey PA (eds): The biology of the ma le gamete. Academiè Press, London New York, 1975, 321-335.
7. Courtens JL. :
Gamete Res. 1982, 5, 137.
8. Czaker R.:
Journal of Ultrastructure Research, 1985, 90, 26-39.
9. Fawcett D.W., Philips D.M.:
Anat. Rec., 1969, 165, 153.
10. Fawcett D.W.:
Biol. Reprod. 2 (suppl. 2), 1970, 90.
11. Fawcett D.W.:
In: Bimkley, B.R. Porter, K.R. (eds). Intemational cell biology. Rockefeller Univ. Press, NewYork, 1977, 581-601.
12. Fawcett D.W.:
In: Alexander N.I. (ed): Animal models for research on contraception and fertility. Harper & Row, New York, 1979, 84- 104.
13. Koehller J.K.:
Journal of Ultrastructure Reserach, 1970, 33, 598.
14. Koheller J.K.: Journal of Ultrastructure Reserach, 1972, 39, 520-539.
15. Krimer D.B., Esponda P.:
Mikroskopie, 1978, 34, 55.
16. Krimer D.B., Esponda, P.:
Eur. 1. Celi Biol., 1979, 20, 156.
17. James M. D., Clegg E.D., Lunstra B., Mollenhauer H.H.:
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1974, 154, 1.
18. Jones R.E., Pnolpramool C., Setchell B.P., Brown E.R.:
Biochem. 1, 1981, 202, 457.
19. Jones R.E., Glos von K.I. Brown C.R.:
1. Reprod. Fert., 1983, 67, 299.
20. Mildred Gordon P.V., Dandekar, Bartoszewcz:.
1. Reprod. Fert., 1974, 36, 211-214.
21. Nicander L., Blane A.:
Z. Zelleforsch Mickrosk. Anat, 1966, 72, 496.
22. Oko R.J., Costenton J.W., Coulter, G.H.:
1. Zool., 1976, 54, 1326.
23. Pedersen H.:
Journal of Ultrastructure Research, 1970, 33, 457.
24. Pedersen H.J.:
Journal of Ultrastructure Research, 1972, 40, 366.
25. Pedersen H.L.:
J. Reprod. Fert., 1972, 31, 99.
26. Philips D.M.:
Journal of Ultrastructure Research, 1977, 58, 144.
27. Philips D.M.:
Biol. Reprod., 1977, 16,128.
28. Philips, D.M.: 1. Ultrastruct. Res., 1980, 72,103.
29. Sardul S., Guraya:
Biology of spermatogenesis and spermatozoa in Mammals. Springer - Verlag. New York, London, Paris, Tokyo,1987.
30. Sidhu K.S., Guraya S.S.:
Indian 1. Exp: Biol., 1980, 18, 48.
31. Sidhu K.S., Guraya S.S.:
Buffalo Sem. Morphol. Physiol. Methodol., USG, Ludhiana, India, 1985.
32. Sreejith K, Nuvad J., Thinaharan C., Dey G.K.:
Electrodeposition of silver nanodendrites; Nanotecnology, 2007, 18, 125610.
33. Suosa, M. and Azevedo, C.:
Anatomia Embriologia, 1972, 105, 22 – 25.
34. Welch J.E., O' Rand M.G.:
Biol. Reprod., I985, 32, 74.
35. Welck, J.E., O' Rand, M.G.:
Dev. Biol., 1985, 104, 411.
36. Wilkins M.H.F., Randall J.I.:
Biocherm. Biophys. Acta, 1953, 10, 192.