

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**Ultraestructura del Espermatozoide
de Perro**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

ENRIQUE TREJO HERNANDEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**Ultraestructura
del
Espermatozoide de Perro**

Enrique Trejo Hernández

México, D. F.

1972

**A MIS PADRES CON
GRATITUD INFINITA**

A MIS HERMANOS.

RECONOCIMIENTOS

Al Sr. Moisés Frayre y
Sra. Isabel Frayre por su
cooperación en el desa--
rrollo de la parte técnica.
Al personal del Departam--
ento de Reproducción --
Animal de la Facultad de
Medicina Veterinaria y -
Zootecnia.

I N D I C E

	Pág.
I.- INTRODUCCION	1
II.- MATERIAL Y METODOS	3
III.- RESULTADOS	6
IV.- DISCUSION	6
V.- CONCLUSIONES	23
VI.- BIBLIOGRAFIA	25

I. INTRODUCCION

El origen, formación y estructura de los gametos de los animales ha llamado -- siempre la atención habiendo sido motivo de diversos estudios (35). Entre los diversos reportes, encontramos los de Leeuwenhock y Ham quienes empleando su recién inventado microscópio observaron líquido seminal en el que encontraron organismos diseminados a los que llamaron parásitos diseminados o infusorios diseminados cuya función ellos atribuyeron era sólo mantener una suspensión homogénea o bien mantener el líbido del macho (7). No obstante que la espermatogénesis ha sido estudiada por métodos citológicos adecuados, muchos de los detalles sobre la estructura del gameto masculino han permanecido oscuros a causa del limitado poder de resolución del microscópio de luz transmitida. No fue sino hasta el presente siglo que los conocimientos de la naturaleza del espermatozoide han aumentado con la utilización de diversos tipos de microscopios: polarizado, ultravioleta, contraste de fases, contraste de interferencia, fluores-

cencia y electrónico.

Los primeros trabajos sobre la observación de espermatozoides con electromicroscopía, son aquellos de Watson (1952) y Challice (1953) al observar a la espermatogénesis en roedores (52, 17). A partir de la publicación de los trabajos antes mencionados, significativos descubrimientos han sido reportados en cuanto a métodos de fijación y microtomía permitiendo extender considerablemente las observaciones de estos autores.

La creciente atención que en los últimos años se ha puesto a los cambios estructurales que se suceden en el espermatozoide de los mamíferos como un preliminar a la fertilización, han hecho que la mayor parte de tales estudios hayan enfocado su atención a especies que por su mayor importancia económica así lo requieren habiendo dejado en un plano inferior el estudio de la ultraestructura del espermatozoide de perro (7, 11, 20, 29).

En este trabajo, se presenta un estudio ultraestructural del espermatozoide - eyaculado de perro, utilizando como base para la nomenclatura de las diversas partes que lo constituyen y sirviendo como comparación, los reportes publicados por Blom - - (1965), Bishop (1960), Fawcett (1958) y Hancock (1965) en estudios realizados por tales investigadores sobre espermatozoides de otros mamíferos (11, 7, 20, 29).

II. MATERIAL Y METODOS

El material utilizado en este estudio fue semen de un perro de 14 meses de -- edad, habiéndose hecho la obtención del eyaculado por excitación manual (51).

El material colectado, fue fijado de acuerdo a las técnicas descritas a conti-- nuación:

1.- Inmediatamente después de obtenida la muestra, se depositó en una solución buffer Millioning (65 ml.) y glutaraldehído al 50% (2.6 ml.) con un pH de 7.2 llevándo-- se al refrigerador donde permaneció 24 hrs. para después ser centrifugada a 2,500 r.p.m. durante 10 minutos y ser posteriormente lavada con buffer Millioning (38, 47).

2.- El sedimento obtenido se resuspendió en una solución fijadora de tetraóxido de -- osmio OsO_4 al 2% con buffer Millioning dejándose nuevamente en refrigeración por 24 hrs. (21).

3.- Una vez fijada la muestra, fué incluida en una solución de agar al 1% para obte--

ner fragmentos de aproximadamente 1 mm.³ (33).

4.- Los cortes anteriores se deshidrataron en alcohol etílico al 10, 40, 50 y 70% cada uno permaneciendo 10, 15 minutos y 24 hrs. respectivamente. Hecho lo anterior, se pasó la muestra a un baño de alcohol etílico al 80% con uranio al 1% por 20 minutos.

Después se pasó a concentraciones de alcohol etílico al 90 y 96% permaneciendo 20 minutos en cada caso. Para finalizar este proceso de deshidratación se llevaron los cortes a alcohol absoluto en tres pasos permaneciendo en cada uno de ellos 20, 10 y 10 minutos respectivamente (33).

5.- Para iniciar el proceso de inclusión, los cortes se sumergieron en óxido de propileno en 2 pasos de 20 y 15 minutos de duración cada uno.

6.- La inclusión se efectuó colocando los cortes en una solución 1:1 de óxido de propileno y epon-araldita (resina) sobre un vidrio de reloj para permitir la evaporación del óxido de propileno, permaneciendo por 20 hrs. al descubierto (33).

7.- El montaje se realizó colocando los cortes en cápsulas de gelatina, mismas que se llenaron con material de inclusión epon-araldita. Para permitir la polimerización del material de inclusión las cápsulas de gelatina se dejaron en la estufa a 58°C. por 20 hrs. Una vez polimerizada la muestra, cada cápsula fue tallada con una navaja hasta darle forma de una pirámide truncada.

8.- Los cortes se realizaron en un ultramicrotomo MT 2 Porter Blum con cuchillas de vidrio.

9.- Los cortes observados fueron los que adquirieron un matiz dorado ó plateado que se colocaron en rejillas de cobre cubiertas de una película de Formvar.

10.- La observación se efectuó en un microscópio electrónico Zeiss Modelo EM9 con

amplificaciones directas de 6,000 a 18,000 diámetros.

Para aumentar el contraste, se utilizaron soluciones de acetato de uranilo y citrato de plomo según las técnicas de Watson y Reynolds (53, 45).

11.- Las fotografías se imprimieron en placas Gaevert.

III-IV RESULTADOS Y DISCUSION

El espermatozoide de perro guarda semejanza en cuanto a forma y estructura - con aquellos de otros mamíferos.

Para mayor facilidad en la interpretación de las estructuras encontradas en los cortes ultramicroscópicos, la descripción de los mismos se hará comparativamente con los hallazgos mencionados por otros autores. Para dar mayor claridad a tal descripción, se incluyen láminas con diagramas y nombres que corresponden a cada una de las fotografías.

El espermatozoide de los mamíferos es una célula que consiste de tres partes -- principales: Cabeza, Cuello y Cola la cual a su vez se subdivide en: Pieza intermedia, Pieza principal (proximal y distal) y Pieza final de la cola.

Membrana de la Célula. - En todas las especies se encuentra una doble membrana citoplásmica que envuelve a todo el espermatozoide. La firmeza en la unión de la

membrana a la célula difiere en diferentes regiones : en la mayoría de las especies está particularmente adherida en la región posterior de la cabeza y en los bordes basales del núcleo como se puede apreciar en las fotografías número 1 y 6. Saacke y Almquist en 1964 (46), encontraron que esta estructura es particularmente notable a la altura del anillo de Jensen. Esta observación se explica por la invaginación de la membrana en este punto como suele ocurrir en el origen de los filamentos de la cola (46). Esta membrana es elástica y muy difícil de desintegrarse; es probable que la superficie de la célula en general, esté compuesta de lípidos y proteínas complejas, sin embargo la propiedad de aglutinación del espermatozoide nos sugiere que la superficie de la membrana en la cabeza difiere en su composición a la de la cola. Es también de particular importancia, observar que la membrana celular del espermatozoide es muy resistente a los ácidos pero muy sensible a los alcalis (34). En algunos casos la membrana celular cubre la región del cuello como una cápsula articular floja, en otros casos toma un curso recto a lo largo del cuello continuando a lo largo de la envoltura mitocondrial (Ver fotografías 4 y 6). Saacke y Almquist enfatizaron la importancia de la unión libre de la membrana celular a la pieza media de la cola para facilitar la migración de la gota citoplásmica a lo largo de la pieza media en el proceso de maduración de la espermátida.

En este trabajo la membrana del espermatozoide de perro no difiere en gran parte en cuanto a su organización estructural a la ya establecida para las otras especies de mamíferos.

Cabeza. - La cabeza de un espermatozoide maduro, varia mucho en su forma; es ovoide en el toro, cerdo y conejo, semeja un cilindro alargado en las aves, en forma de gancho en los roedores, y en el humano aparece como un cuerpo aplanado (2, -

11, 29 y 35). El largo de la cabeza de los espermatozoides de mamíferos no difiere -- por mucho, así por ejemplo tenemos que en el toro mide 8.5μ (11), en roedores va-- ría desde 5.4μ a 12.1μ , en el conejo 8.4μ , en el cerdo 8.5μ , en el borrego 8.5μ y en el hombre 4.6μ (7).

En el perro según fotografías obtenidas, la forma de la cabeza es semejante a la del toro y cerdo (Ver fotografía No. 1). Por lo que respecta al largo de la cabe-- za esta mide 4.5μ .

Núcleo. -- Es la estructura que ocupa la mayor parte de la cabeza. Esta forma do por un paquete denso de cromatina constituida de DNA conjugado con proteínas ri-- cas en arginina; teniendo una densidad electrónica alta (34). Se encuentra rodeado -- por una membrana nuclear elástica y difícil de desintegrarse. El núcleo de algunas -- especies (humano, toro, caballo y conejo) presenta una estructura hueca variable en tamaño y forma llamada vacuola nuclear, la cual no parece tener significado funcio-- nal aunque es dudoso este concepto en el espermatozoide humano, pero válido a las -- otras especies (29).

Variaciones en forma, tamaño y contenido de DNA en el núcleo del esperma-- tozoide altera la fertilidad en forma negativa (34).

En la fotografías obtenidas de la cabeza del espermatozoide de perro, éste no presenta vacuola nuclear como las especies mencionadas en párrafos anteriores; así -- como en los cortes observados al microscopio electrónico en los que tampoco se pudo -- apreciar esta estructura dentro del núcleo del espermatozoide (Ver fotografías No. 1 -- y 2).

Acrosoma. -- La parte anterior del núcleo del espermatozoide de los animales domésticos esta cubierto en un 60% por un sistema de membranas o sistema acrósomico.

Esta estructura se encuentra limitada por una membrana externa que se refleja hacia el límite posterior a nivel del segmento ecuatorial formando una membrana interna contigua a la membrana nuclear. El espacio que queda entre estas dos membranas está ocupado por una substancia intercelular electrónicamente densa (29) (ver fotografía No. 1). Para denominar esta estructura se han empleado diversos sinónimos tales como Kopfkappe (Ballouist, 1891). Perforatium (Waldeyer, 1906; Duesbery, 1936). Capuchón calíco (Papa y Marza 1931). Head cap (Freud, 1936), Capa citoplásmica (Rao y Berry 1949), Galea capitis (Blom, 1945-1950). Sistema carosómico (Leblond y Clearmont, 1952) y capa acrosómica (Fawcett, 1958; Blom y Birch-Andersen, 1965) (7, 11).

El acrosoma se origina como un producto de secreción del aparato del Golgi durante la espermiogénesis. Es relativamente inestable y fácilmente muestra cambios degenerativos a la muerte de la célula. La zona intercelular parece ser más gruesa en la parte anterior o borde principal de la cabeza que en su límite posterior (3).

El acrosoma está compuesto de mucopolisacáridos conteniendo galactosa, manosa, fructuosa, hexosa y fosfatasa ácida y alcalina (34). Esta estructura se presenta en forma constante en diversas especies de vertebrados e invertebrados y es probablemente un rasgo universal de los espermatozoides flagelados (3).

Esta estructura ha sido descrita en el espermatozoide humano (Anberg, 1957), cerdo (Nicander y Bano, 1962), hamster (Fawcett y Hollenberg, 1963), conejo (Hadek 1963), ratón (Piko Tyler, 1964) y en el toro (Blom y Birch y Andersen, 1965), (2, 41, 23, 27, 42 y 11).

En algunas especies (toro conejo y cerdo) el acrosoma presenta un alargamiento local cerca del borde anterior de la cabeza al cual se le ha denominado cuerpo apical o arruga apical (11 y 27).

En el perro concordando con el reporte de Austin, (1958) (3), en la fotografía No. 1 se aprecia que en la parte anterior de la cabeza del espermatozoide la capa intercelular es más gruesa que la posterior hacia el límite con el segmento ecuatorial. - En la misma fotografía, así como en los cortes observados al microscopio electrónico - no se distingue estructura semejante a la descrita por Blom, en 1965 (11) como cuerpo apical, deduciéndose por tal motivo que dicha estructura no existe en el espermatozoide de perro.

Perforatorium. - Austin y Bishop en 1958, Fawcett en 1958, y Bishop y Walton en 1960 han coincidido en la identificación de una estructura separada del acrosoma - que se distingue de este por su origen, sitio y características citológicas llamado Perforatorium, la cual solo es observable en espermatozoides de roedores y algunos invertebrados (3, 20 y 7). Esta estructura se aprecia como una proyección que descansa en una nicho o depresión del acrosoma.

Estructuras que quizá sean homólogas al perforatorium pero que no han podido ser verificadas, son descritas en el conejo (Moricard, 1960), en el borrego, caballo - y cerdo (Bane y Nicander, 1963) y toro (Blom y Birch-Andersen, 1965) (39, 4 y 11).

La existencia del perforatorium en el espermatozoide de perro, tal como lo describen los autores antes citados, no es verificable en la fotografía No. 1. En la cual solo se observa en el borde anterior del núcleo el acrosoma y la membrana celular, no existiendo otras estructuras identificables.

Galea Capitis y Segmento Ecuatorial. - Estas dos partes del espermatozoide - de mamíferos solo son identificables mediante el uso del microscopio de luz transmitida, siendo el tema de particular controversia.

La galea capitis o capuchón cefálico es una estructura laxa, fácilmente identi

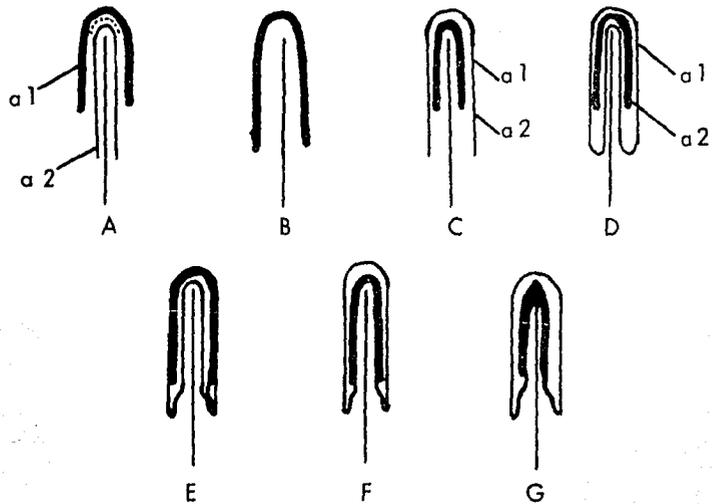
ficable en el espermatozoide de toro, caballo y borrego observandose ocasionalmente en el espermatozoide de conejo. Por la naturaleza de esta investigación tal estructura no es observable con electromicroscopía, aunque si se identifica en el espermatozoide de perro con el empleo del microscopio de contraste de fase (16).

Usualmente se define como una delgada capa que cubre al acrosoma anterior y posteriormente estando pobremente unida a este llegando a encontrarse suelta en el eyaculado de bovino lo que se considera una anomalía primaria que puede llevar a la esterilidad en caso de que el número de capuchones cefálicos sea abundante. El caso contrario es el espermatozoide de humano donde se le encuentra fuertemente unida al núcleo (20, 16, 2 y 9). En ganado Friesian en ocasiones se observa en la parte anterior sobre la galea capitis una zona excéntrica, espesa y ligeramente redondeada, la cual es causa de infertilidad y que ha sido llamada Knobbed Sperm, estableciéndose que es característica genética de raza (9).

Segmento Ecuatorial. - Es una area del espermatozoide cuyo límite posterior es el borde común de la membrana interna del acrosoma y el borde anterior de la capa post nuclear, como se puede apreciar en la fotografía No. 1. La similitud de sus límites curvo anterior ha sido motivo de innumerables controversias. En la figura No. 1 se muestran de acuerdo con Hancock siete reconstrucciones basadas en la interpretación de varios autores (29).

En la figura No. 1 A se ve una capa pequeña que se cree sea la galea capitis (a2), la que muestra externamente una capa larga (a1), de la cual la porción anterior se ha originado. En esta interpretación, el segmento ecuatorial es el area superpuesta entre la pequeña o galea capitis alrededor de la capa externa del acrosoma. Esta interpretación dada por Randall y Friedlander, fue rechazada porque observaciones he-

FIGURA 1



- a) El componente largo (a2) está cubierto por el pequeño componente (a1) desde que la galea capitis es originada.
- b) El acrosoma es observado como una sola capa. La galea capitis es formada por el resultado de la deformación de esta capa.
- c) El componente externo (a1) es más largo que el interno (a2). La galea capitis es distinta al componente interno.
- d) El componente largo (a1) incluyendo las paredes del pequeño componente (a2) cuando está separada la galea capitis.
- e) El acrosoma es un doble estrato. La galea capitis es la separación de la membrana exterior.
- f) La galea capitis es la separación de la membrana interna de la parte gruesa de la capa.
- g) La galea capitis es la separación del perforatorium solo o en conjugación con la membrana interna de el acrosoma.

chas sobre el espermatozoide vivo del toro mediante el uso del microscopio de luz transmitida, mostraron que el segmento ecuatorial estaba ausente en el espermatozoide vivo y aparecía a la muerte de la célula. Hancock, sugirió que el acrosoma y la galea capitis eran una sola estructura cuya forma en células vivas y muertas explicaba la ausencia del segmento ecuatorial en las primeras. Esta observación (fig. No. 1 B) tuvo que ser abandonada debido a que no pudo ser explicada la observación de un segmento ecuatorial en los espermatozoides vivos del cerdo. Una tercera interpretación (fig. — No. 1 C) es la que sugiere la existencia de dos componentes separados insistiéndose — que la galea capitis de forma semi lunar debe ser la interior y no la exterior como lo — habían sugerido Randall y Friedlander. La cuarta interpretación propuesta por Burgos y Fawcett, sostiene que la estructura semilunar está situada entre los estratos interno — y externo de una doble capa semejante a la mostrada en la figura 1 D (29).

Las interpretaciones anteriores están basadas en descubrimientos hechos con — los microscopios de luz transmitida y electrónico en espermatozoide intacto en un tiem — po en el que no había evidencia directa disponible de la existencia de dos componen — tes separados del acrosoma en cortes de espermatozoides. Nuevas informaciones sobre la estructura del espermatozoide han provocado respuestas a las interrogantes anterio — res. Nicander y Bane en 1962, Saacke y Almquist en 1964 y Blom en 1964, llegaron a la conclusión de que el segmento ecuatorial coincide con aquella área de la cabe — za cubierta por la parte delgada del acrosoma. Si esto es correcto debía de haber va — riasiones entre secciones en el largo de la parte posterior delgada del acrosoma corres — pondiendo a variaciones continuas en el diámetro vertical del segmento ecuatorial del espermatozoide de toro y puerco con diferencia en las dimensiones de la parte poste — rior del acrosoma, no habiendo por lo tanto una clasificación definitiva sobre esta es —

ta estructura (29).

Capa Post Nuclear. - Es la estructura que cubre la región posterior del núcleo en una superficie que consta anteriormente del segmento ecuatorial a la base de la cabeza y que representa aproximadamente el 40% del largo total de la misma (ver fotografías No. 1 y 4) En el bovino se presenta como una envoltura compuesta de microtúbulos de aproximadamente 220-250 Å de diámetro cada uno, dispuestos longitudinalmente y que terminan en estrecha proximidad con la membrana celular; en el lado - - opuesto se encuentra interconectada a la membrana nuclear por medio de una línea o zona delgada, electrónicamente densa y de apariencia granular pero que en ocasiones parece una masa de fibras convolutas cuya observación depende del método de preparación de la célula (11). A este respecto se parece a la capa post nuclear descrita -- por Das en 1962 (19) en el crecimiento del espermatozoide de Microtus pennsylvanicus aunque el mismo Das identifica la capa post nuclear como el manchete de la espermátida (29).

A la altura de la base del núcleo y bordes laterales del mismo ésta estructura se presenta fuertemente adherida a la membrana celular confundándose en una misma estructura (ver fotografía No. 6). Anteriormente la capa post nuclear llega a ser más y más laxa de la membrana nuclear (ver fotografía No. 4).

En espermatozoides eyaculados, la capa post nuclear no se observa haciendo contacto con la parte distal del acrosoma (ver fotografía No. 4) tal como se puede observar en algunas ocasiones en espermatozoides colectados directamente del epididi--mo (11).

Bedford en 1964 encuentra la capa post nuclear menos claramente definida que el acrosoma en el conejo, pero comenta sobre su apariencia esponjosa. Hadek en - -

1963 también pretende haber demostrado una capa post nuclear en el espermatozoide - de conejo.

Saacke y Almquist en 1964 descubrieron una membrana fuertemente unida a la superficie interna de la membrana celular sobre la parte posterior de la cabeza. Anberg no pudo repetir los experimentos de Hadek utilizando espermatozoides de humano (5, 27, 46, 2).

La capa post nuclear, está formada de fibras ricas en sulfuro fácilmente impregnables con platino en espermatozoides vivos. En espermatozoides muertos es muy permeable a ciertas tinturas tales como: eosina, azul de bromofenol y verde de bromocresol; cuya propiedad es usada como un método para el reconocimiento de espermatozoides muertos en un eyaculado, aunque parece ser que tales propiedades parecen residir en la substancia condensada del núcleo mismo (34).

En la fotografía No. 4 se puede apreciar la capa post nuclear como una estructura diferente al núcleo, formada por un material denso unido a la membrana celular, más no se observan estructuras tubulares a las que hace mención Blom (11). Por lo tanto de acuerdo con Bedford y Hadek (5, 27) es una estructura fuertemente unida a la membrana nuclear de una apariencia esponjosa y electrónicamente densa. En la fotografía número 6 se puede observar como la capa post nuclear en la base del núcleo y bordes laterales se presenta fuertemente adherida a tales estructuras confundiendo en una sola lo que viene a corroborar lo dicho por Blom (11) para el espermatozoide de toro. Respecto a la zona que conecta a la capa post nuclear con la membrana nuclear, no se aprecia tan densamente opaca como lo describe Blom (11) para el espermatozoide de toro, sino que es menos densa y de apariencia granular.

Cuello. - El cuello en los espermatozoides de mamíferos es generalmente corto

mide 1μ y se articula en su parte anterior con la cabeza y posteriormente con la pieza media del flagelo. La organización precisa de esta estructura es difícil de demostrar en el espermatozoide maduro.

En la región de implantación del espermatozoide, se aprecian dos bordes o nudillos basales situados entre la placa basal y el punto de unión para la capa post nuclear (Ver fotografía No. 6). Usualmente los bordes basales son semicirculares y triangulares en su punta. Su estructura es difícil de determinar pero parece ser que consiste de finos gránulos o diminutas vesículas que presentan un paquete denso, de densidad electrónica menor a la del núcleo. El origen y función de la sustancia dentro de los bordes basales es desconocida. Podría ser un sobrante del material nuclear y servir de refuerzo a esta región en que un gran número de importantes estructuras están anexas a la cabeza (11).

Según se puede apreciar en la fotografía número 6, los bordes basales pudieran ser una prolongación de la membrana nuclear. Por lo que respecta a su consistencia, parece ser que difiere en cuanto al material nuclear por lo que de acuerdo con Blom, parece ser material distinto al del núcleo y que pudiera estar reforzando esta región.

Canal de Implantación. - El canal de implantación es la concavidad en la cual se inserta el flagelo a la base de la cabeza. En un corte sagital se aprecia cómo un arco algo extendido debido a la extensión de la placa basal delineando el canal (Ver fotografía No. 5).

Placa Basal o Lámina Basal. - Este último término sería más apropiado para la cabeza plana en la base del espermatozoide de toro, no así para otras especies en las que es más propio el término de placa basal. Dicha placa basal parece ser hecha de dos membranas de la misma dimensión y densidad visibles como parte de la membrana nuclear sobre el lado interno de los bordes basales. (Ver fotografía No. 5).

Zona Centriolar. - En espermatidas jóvenes, el centriolo proximal se presenta como un gránulo oscuro electrónicamente opaco inmediatamente posterior a la zona opaca del núcleo. Conforme esta región se ensancha, la membrana exterior forma una cubierta externa alrededor de la misma. En la fase de proyección del núcleo, esta membrana se rompe liberando el centriolo, el cual se transforma en una estructura hueca con un gránulo oscuro en el centro. Este gránulo se localiza debajo de la capa postnuclear, creciendo hacia afuera para convertirse en el centriolo proximal y separarse de la capa postnuclear estando en esta etapa incluido en la vacuola mitocondrial (36).

Anberg, en 1957; Fawcett, en 1958 y Bishop, en 1960 (2, 20, 7), indican que el centriolo proximal de la cabeza en espermatozoides de mamíferos es típicamente una estructura centriolar cilíndrica inalterable en su forma, que yace en la base de la cabeza, formando una espiral de 9 fibrillas o túbulos que se orientan hacia la cola del esperma, no existiendo otra estructura secundaria de origen centriolar en el cuello del espermatozoide maduro (29). En mi opinión, tal información está sujeta a un problema de semántica, dado que por las fotografías obtenidas (Fotografía No. 7) se llega a apreciar un centriolo proximal de material electrónicamente denso y dos estructuras o "gránulos" a los que Anberg, Burgos, Fawcett y Hancock han llamado gránulos laterales, sin poder definir la función de dichos cuerpos (2, 15, 20, 29), así como una formación de túbulos huecos dan un arreglo espiral, a lo que los autores antes mencionados llaman "centriolo proximal", debiendo recibir el nombre de anillo centriolar dado originalmente por Mathur en 1962 (36) al describir el complejo centriolar de la rata.

Lo anterior se debe a que en las fotografías Nos. 5 y 7 el centriolo proximal, los gránulos o centriolos laterales y el anillo centriolar aparecen como estructuras perfectamente independientes. Aunque la función del centriolo proximal permanece aún

como sujeto de investigación. Por lo referente a los gránulos laterales podría decirse lo mismo, aunque existe la posibilidad de que sirvan de apoyo a las placas basales.

Kojima, en 1963 (32), descubrió dos tallos principales sobre cada lado del cuello (fotografía No. 6), con cinco fibras pequeñas secundarias, tres dorsales y dos ventrales. Cada tallo principal se dice que está compuesto por 15 plaquetas llamadas plaquetas de implantación (fotografía No. 6).

Cola o Flagelo.- La cola es un largo flagelo dividido en tres regiones: Pieza media, pieza principal (parte proximal y parte distal) y pieza final. Una pequeña gota o burbuja citoplásmica se llega a observar contigua a la pieza media (7).

Aunque trabajos recientes han contribuido a la organización de nuevos detalles estructurales de la cola del espermatozoide y flagelados en general (Chistersen, Fawcett y Telka, 1961 y Fawcett, 1962) (26), no ha sido posible modificar mayormente las primeras observaciones hechas con el microscopio electrónico sobre colas seccionadas de espermatozoides (Bradfield, 1965; Fawcett, 1958) (29), lo que estableció la característica que sirvió de modelo de los componentes que forman la cola o flagelo. Por consiguiente, las fotografías números 8 y 9 no muestran mayor modificación al patrón ya establecido por los autores antes mencionados.

El modelo básico consiste en un par central de fibrillas con uno o dos anillos exteriores concéntricos (de acuerdo al nivel del corte; ver fotografía No. 9) de 9 fibrillas cada uno (29).

Filamento Axial.- El filamento axial es el término aplicado al anillo interno de 9 fibrillas y al par central de ellas (Ver fotografía No. 9); corre ininterrumpidamente del cuello hacia abajo hasta el final de la cola. Las fibras del filamento axial están situadas en forma opuesta a las correspondientes fibras gruesas o anillo periférico. Cada fibra delgada del filamento axial consiste de dos subfibras que difieren en

densidad. En la fotografía No. 9 C se puede observar con claridad este filamento axial; en la misma fotografía se observa de afuera hacia adentro. La membrana celular, la helix cortical y el filamento axial propiamente dicho, el cual se une al par central de fibrillas por medio de rayos o filamentos conectivos (29,54).

Cleland y Rothchild, en 1959 (18), postulan que el par de fibras de los anillos internos no están equidistantes una de otra. El arreglo que ellos describen está representado en la figura 2 A. El axis de las dos fibras centrales cruzan solamente una de las fibras del anillo periférico; en el cuadrante más bajo izquierdo (X"Y") hay dos fibras de las cuales ninguna toca el axis; y el cuadrante derecho más bajo (X"Y") el axis cruza o interseca dos fibras habiendo una sola fibra del anillo interno entre ellos. Este arreglo es el ejemplo común a los espermatozoides de varias especies (29). La característica de este patrón es que las fibrillas no están separadas a intervalos regulares. El patrón ilustrado en la figura 2 B muestra las fibrillas igualmente separadas: aquí las dos fibrillas centrales del axis intersecan dos de las fibrillas interiores del anillo interno.

Anillo Periférico. - Las 9 fibras gruesas del anillo periférico varían de forma en cortes transversales efectuados a lo largo de diferentes partes de la cola, existiendo diferencias entre fibras individuales. En la fotografía (No. 9-A) se puede observar el anillo periférico en el que encontramos de afuera hacia adentro: Membrana celular, helix de mitocondrias, filamento axial y el par central de fibrillas. La numeración de las fibrillas está basada en la numeración propuesta por Fawcett en 1962 (22).

Bradfield, en 1955 (14), encontró que la cola era casi simétrica, como el axis a través de la fibra 1, entre el par central de fibrillas o entre las fibras gruesas 5 y 6; él concluye que las fibras 1, 5 y 6 eran más largas que las restantes. En algunas especies es común encontrar que las fibras 1 y 9 son similares en tamaño, así que la cola

es marcadamente asimétrica con el axis que divide las dos fibras centrales. El axis de los dos pares de fibras gruesas está paralelo al axis horizontal de la cabeza. Este patrón de dos fibras largas dispuestas lateralmente a cada lado del filamento axial fue descubierto por Blom y Birch-Andersen en 1960, en el toro. En el cerdo, se dice que todas las fibras son del mismo tamaño en cuanto a su diámetro en la orilla proximal de la pieza media (Nicander y Bane, 1962); en la orilla distal de la pieza media y en la pieza principal de la cola anteriormente, las fibras 1, 5 y 6 son más largas que el resto y que la 9 es intermedia entre esas tres y el resto (40). Tanto en el toro como en el cerdo las fibras 1 y 9 se fusionan hasta formar uno de los tallos principales. Las pequeñas fibras gruesas retienen su individualidad hasta la fusión con la cabeza de los tallos (29). En el presente estudio, según se aprecia en la fotografía (No. 9-A), el corte se efectuó a nivel de la pieza media, el anillo periférico se ve perfectamente definido, notándose que las fibras 1, 5 y 6 son las mayores y similares en tamaño, en tanto que las número 2, 3, 4, 7, 8 y 9 siendo más pequeñas tienen un diámetro casi idéntico. En la misma fotografía, letra B, el corte está a nivel de la parte proximal de la pieza principal, en la que el anillo periférico aparece como una estructura única en la que sus 9 fibras gruesas guardan bastante similitud, al mismo tiempo parecen unirse al filamento axial.

Pieza Media. - La pieza media es la región gruesa y densa de la cola que se extiende desde el cuello al centriolo distal o anillo de Jensen (Fotografía No. 10). - La pieza media está caracterizada por la presencia de una helix mitocondrial la cual es trenzada unas 75 veces alrededor de las fibras axiales. Han existido diferencias de sobre si la helix mitocondrial retiene o no individualidad o llega a ser fusionada, Fawcett, en 1958 concluyó que lo primero es lo más acertado, pero más recientemente el mismo Fawcett, en 1952, recalcó sobre la variación de las especies en la formación y

arreglo de estos elementos. Las mitocondrias pueden ser esféricas o cilíndricas y estar acomodadas en una o más espirales dispuestas en cadenas alrededor de la pieza media (44, 20, 21, 29). Nicander y Bane descubrieron que la helix mitocondrial en el cerdo se detiene muy cerca de la base de la cabeza, pero que en el caballo la alcanza - (29). A este respecto, según la fotografía No. 5, podemos apreciar que en el espermatozoide de perro la helix mitocondrial casi llega a tocar la base de la cabeza.

Anillo de Jensen. - Estructura que se localiza en la parte distal de la pieza media, no muestra ninguna característica de centriolo. Fawcett, en 1958 (20), puntualizó que el anillo en la orilla distal de la pieza media no muestra ninguna característica de centriolo, pero Gatenby, en 1959 (24), no lo consideró así, existiendo hasta la fecha controversias sobre si se considera como el centriolo distal o como el anillo de Jensen.

Fawcett describe dos componentes del anillo de la espermátida: un anillo pequeño - homogéneo, denso, enclavado en el margen posterior de un anillo largo que tiene apariencia granular. Blom y Birch-Andersen, en 1960, y Saacke y Almquist, en 1964, describen el anillo en el espermatozoide maduro de toro; pero no hacen mención a una doble estructura. Ambos lo mostraron como una sección cruzada con forma de triángulo isósceles con el vértice dirigido hacia la cola. Nicander y Bane, en 1962 (40), describen pero no ilustran un anillo distal distinto en el espermatozoide de cerdo.

En la fotografía (No. 11) se observa en la parte distal de la pieza media que no existe estructura semejante a la descrita por Fawcett en párrafos anteriores aunque se llegan a percibir dos líneas densas con un espacio más claro en medio que bien pudiera ser el homólogo del anillo de Jensen.

Gota Citoplasmática. - Esta pieza, la cual representa el citoplasma residual de la espermátida, se encuentra comúnmente en el cuello del espermatozoide (gota proxí

mal) o bien en la orilla distal de la pieza media (gota distal). A este respecto, cuando la gota permanece en la parte anterior del espermatozoide éste muestra poca fertilidad, así mismo cuando se observa que el número de espermatozoides que presenten gota citoplasmática es alto también puede considerarse como un disturbio en la espermatogénesis (12). Esta estructura, según Hodges, en 1949, y Anberg, en 1957 (30,2) - no es característica en el espermatozoide de humano, dado que la cantidad de citoplasma residual es relativamente larga y amorfa. Esta estructura ha sido descrita por Nicander y Bane en 1962, en el cerdo, y por Bloom y Nicander, en 1961, en el toro y borrego (40,12).

En las fotografías (Nos. 12-A y 12-B) se presentan dos gotas citoplasmáticas, ambas en un corte a la altura de la parte posterior de la pieza media: la A en corte sagital y la B en un corte longitudinal, en las que se aprecian unas estructuras dispuestas en la periferia de la membrana celular llamadas pequeñas vesículas y otras, túbulos curvos o lamellae, estructuras que posiblemente se originen del aparato de Golgi y del retículo endoplásmico (12).

Pieza Principal.- La pieza principal es la parte más larga de la cola, en esta parte la mitocondria está ausente y los filamentos axiales están rodeados de una envoltura protéica resistente que toma la forma de una helix llamada helix cortical y que mide 250 \AA de grosor (7). Fawcett, en 1958 (20), sugirió que este término era inadecuado en vista de que no estaba dispuesta en una helix, sino que se presentaba en forma espiral. En fecha más reciente (21) el mismo autor proporcionó pruebas en las cuales él describe e ilustra fibras que interconectan a fibras transversas. Nicander (21) reporta hallazgos similares en la vaina fibrosa de las espermátidas de rata. Telkka encontró que la organización de la envoltura cortical es básicamente similar en: rata, hamster, murciélago, mono y hombre (50). Sus descubrimientos mostraron una

envoltura compuesta de arcos semicirculares que tienen una unión común con dos pilas longitudinales laterales, los cuales caen a los lados de la cola en el plano de las dos fibras centrales. Saacke y Almquist, en 1964 (46) y Kojima, en 1962 (31), han mostrado evidencia sobre la disposición espiral de la envoltura del filamento axial de espermatozoide de toro. En el presente trabajo la fotografía (No. 8) nos muestra una parte de la pieza principal, en la que se puede observar la envoltura dispuesta en espiral, concordando con los hallazgos de Saacke y Almquist en el espermatozoide de toro. Esta envoltura está compuesta de material extremadamente resistente, con raras propiedades de solubilidad, es poco afectada por el ácido acético normal, pero puede ser completamente disuelta con N/20 hidróxido de sodio; pudiendo ser digerida con tripsina y pepsina (7).

Pieza Final de la Cola. - La pieza final de la cola es corta (3 u de largo), en la que el filamento axial está circundado por la membrana celular solamente, desa pareciendo la envoltura protéica que caracteriza a la pieza principal.

CONCLUSIONES

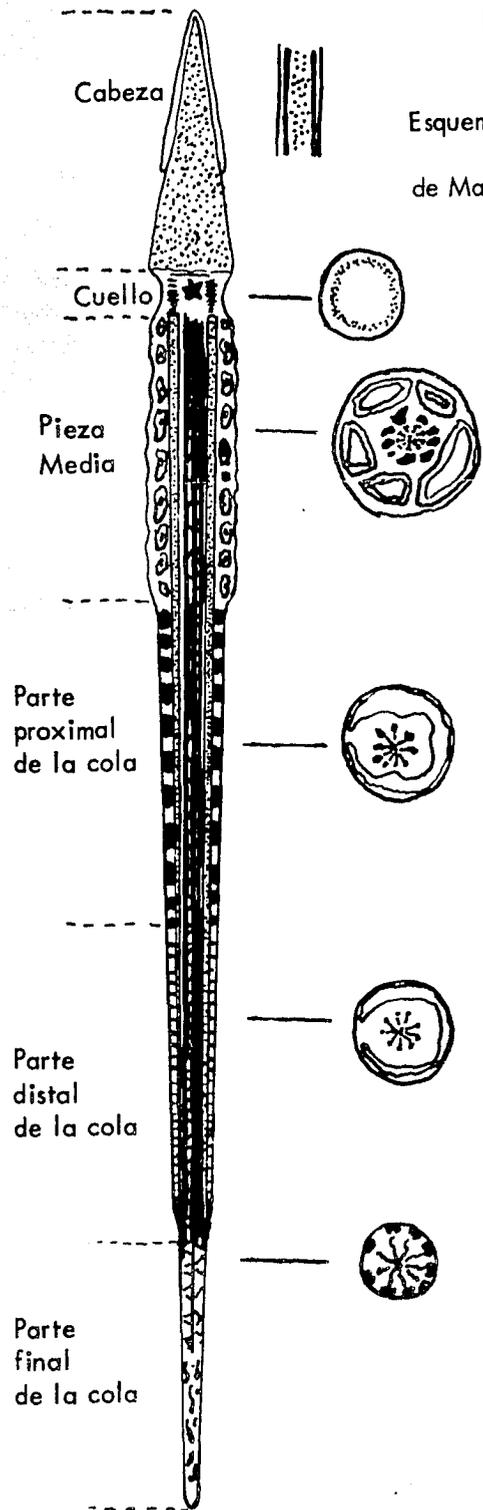
Podemos decir que, de los hallazgos durante el estudio de la ultraestructura - del espermatozoide de perro, que guarda una semejanza en cuanto a forma y estructura que se refiere con respecto a la de otros mamíferos domésticos, aunque teniendo de terminadas características que lo diferencian de los otros, tales como:

- a) Que su núcleo no presente estructura vacuolar alguna a diferencia del toro, conejo y humano.
- b) El perforatorium no llega a existir tal como sucede en el espermatozoide de algunos roedores.
- c) El segmento ecuatorial no fue apreciado en células vivas mediante la utilización del microscopio de contraste de fase, aunque mediante la electromi croscopía se pudo observar que a nivel de donde tal estructura debía presen tarse, se producía un estrechamiento que caracteriza el lugar propio del --

segmento ecuatorial.

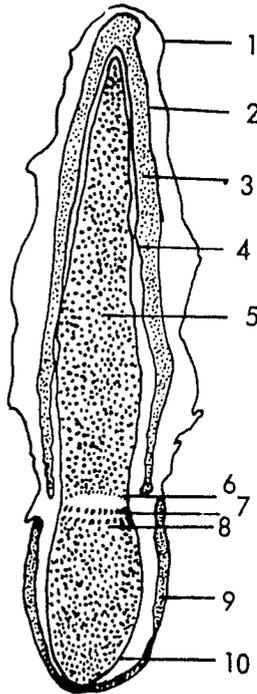
- d) Por lo que respecta a la capa postnuclear, la conclusión obtenida es de que dicha estructura no está formada por elementos tubulares como describe --- Blom para el espermatozoide de toro.
- e) En el cuello se identificaron estructuras perfectamente separadas, tales como: Centriolo proximal, centriolos laterales y anillo centriolar.
- f) El anillo de Jensen se demuestra claramente como una estructura constante para el espermatozoide de perro.
- g) Las estructuras contenidas en el flagelo no tienen diferencias con el de --- otras especies. Pero de acuerdo con Fawcett, la envoltura de la pieza prin cipal no está dispuesta en forma helicoidal como la helix de mitocondrias -. de la pieza media, sino en forma circular continua, tal como fue observado en el presente trabajo.

FIGURA 3



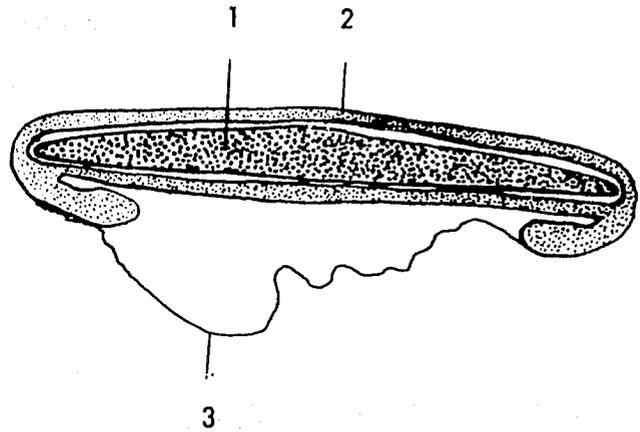
Esquema del Espermatozoide
de Mamífero

Corte Longitudinal
de la cabeza

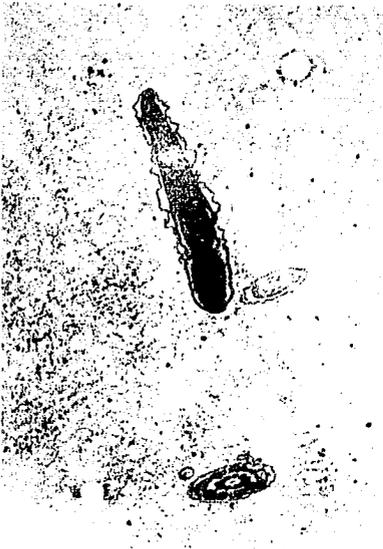


Corte Sagital

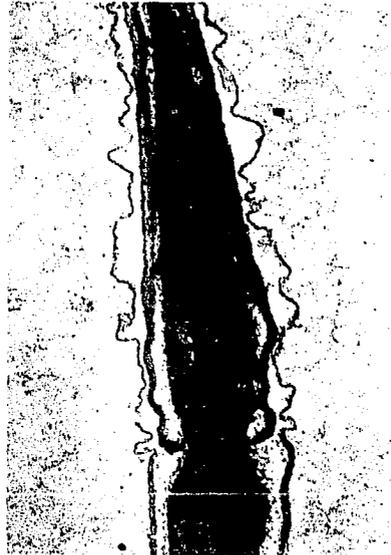
- 1.- Núcleo
- 2.- Acrosoma
- 3.- Membrana celular



- 1.- Membrana celular
- 2.- Membrana exterior del acrosoma
- 3.- Acrosoma
- 4.- Membrana interna del acrosoma
- 5.- Núcleo
- 6.- Borde interno del segmento ecuatorial
- 7.- Segmento ecuatorial
- 8.- Borde anterior de la capa postnuclear
- 9.- Capa postnuclear
- 10.- Membrana nuclear



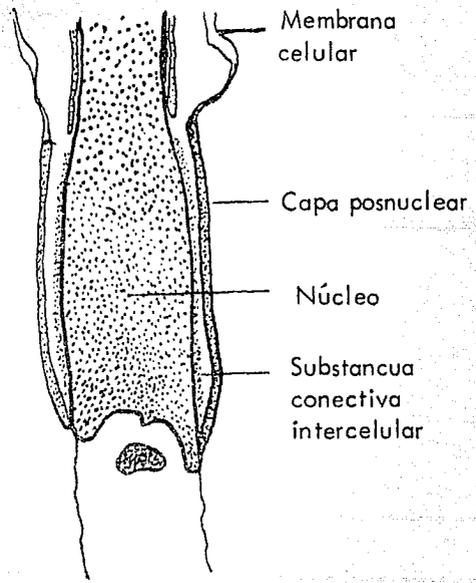
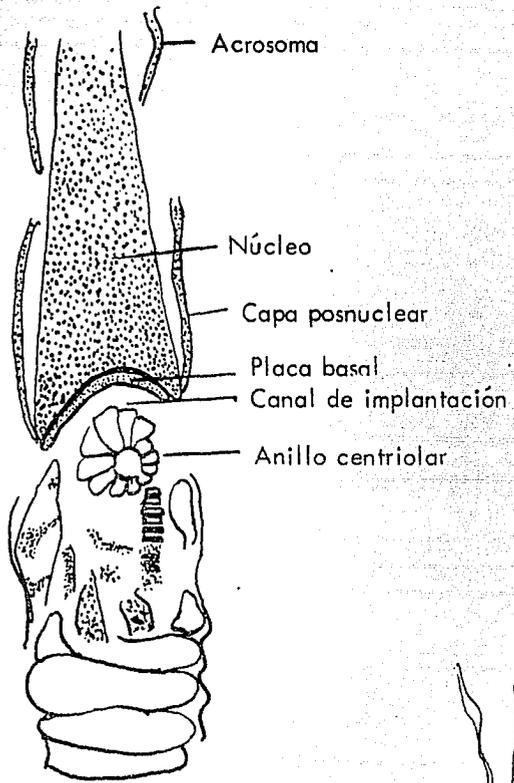
Fotografía No. 1
Corte longitudinal de Cabeza
6,000x



Fotografía No. 2
Corte longitudinal de cabeza
18,000 x



Fotografía No. 3
Corte sagital de cabeza 18,000x

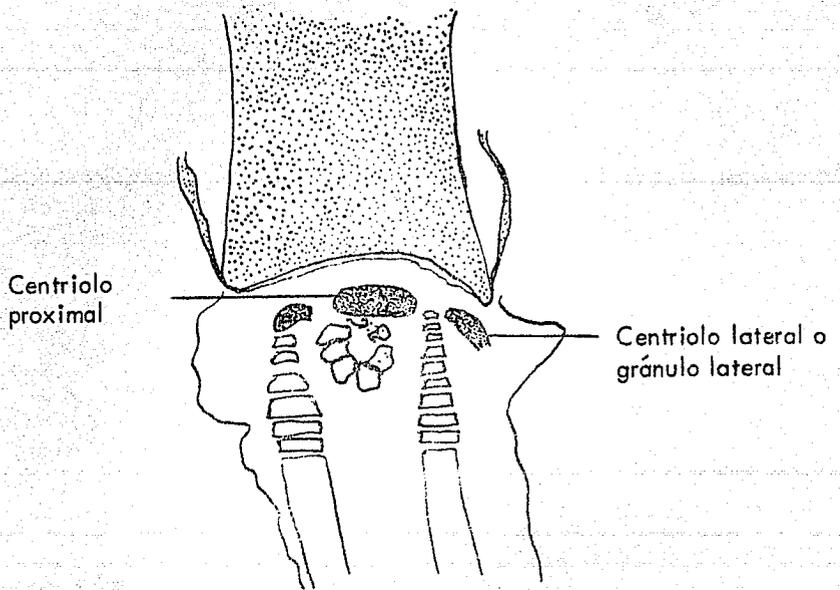
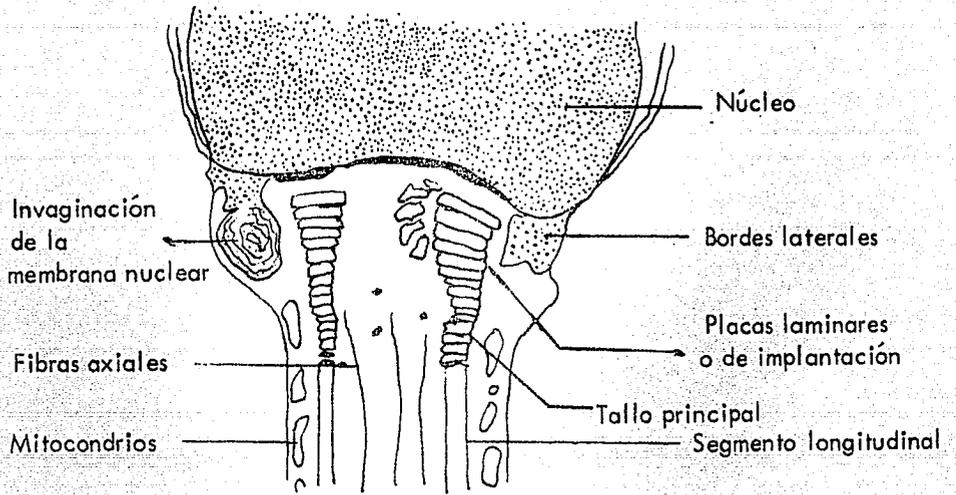




Fotografía No. 4
Corte longitudinal de cabeza y cuello
6,000x



Fotografía No. 5.
Corte longitudinal de cabeza y cuello
6,000x

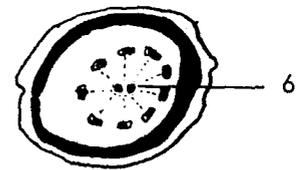
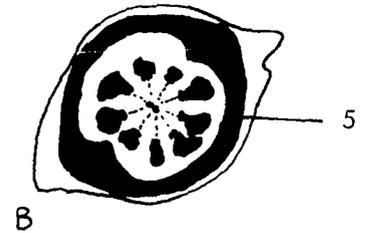
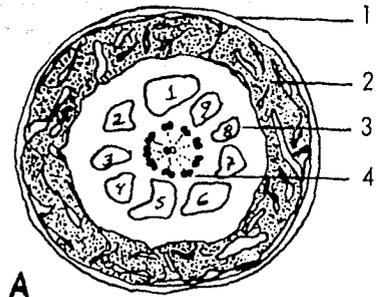
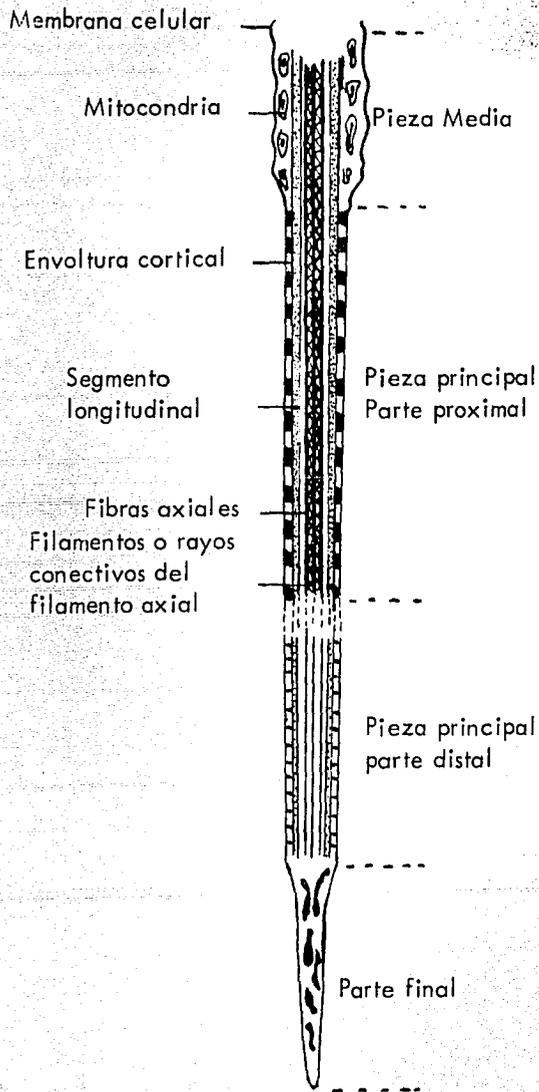




Fotografía No. 6
Corte longitudinal de cuello
18,000x



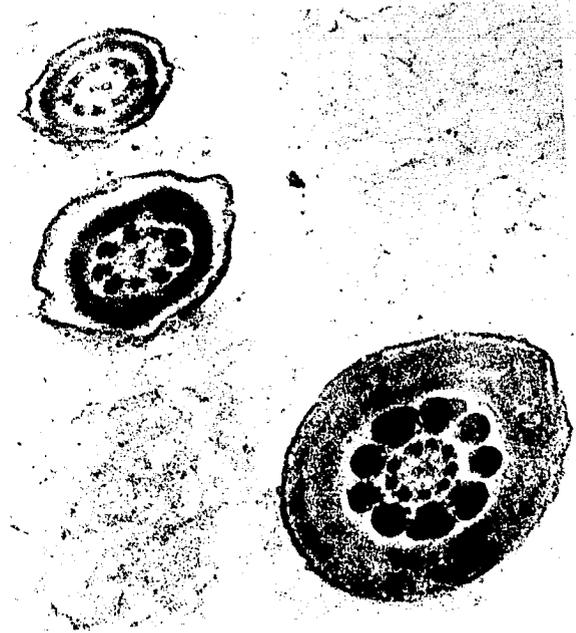
Fotografía No. 7
Corte longitudinal de cuello
36,000x



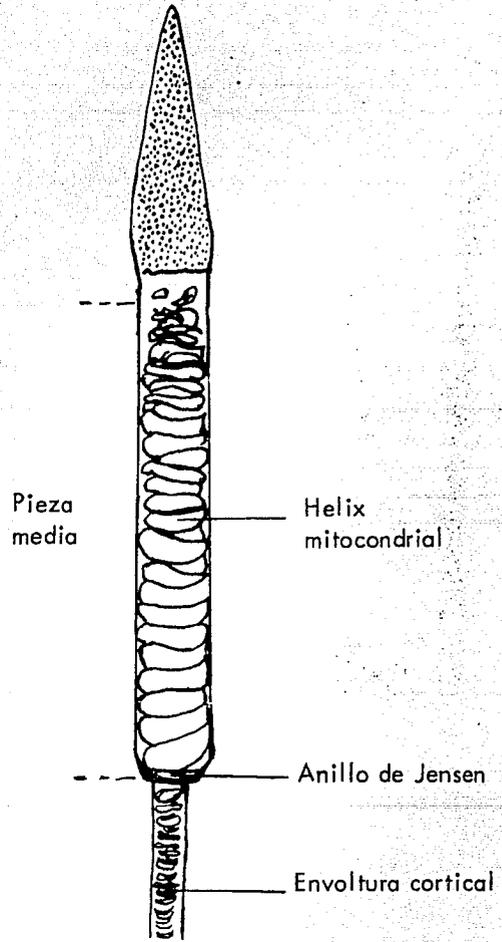
- 1.- Membrana celular
- 2.- Helix mitocondrial
- 3.- Anillo periférico
- 4.- Filamento axial
- 5.- Helix cortical
- 6.- Par de fibras centrales



Fotografía No. 8
Corte longitudinal de cola
6,000x



Fotografía No. 9
Corte sagital de cola
12,000x

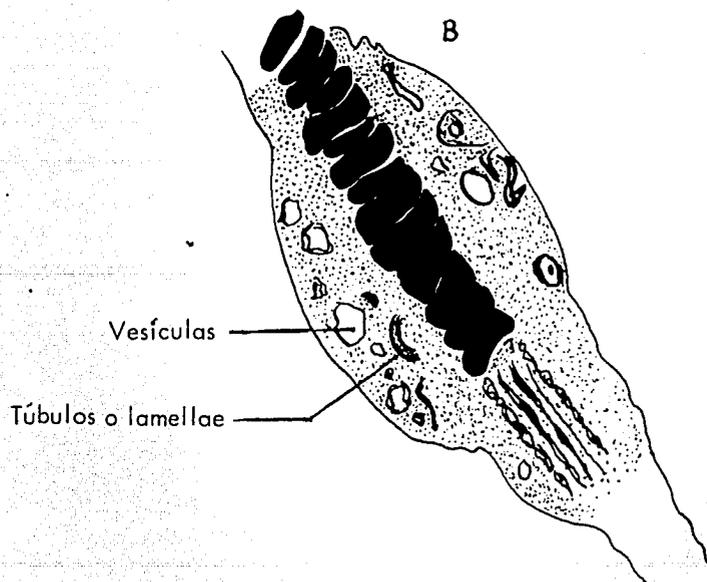
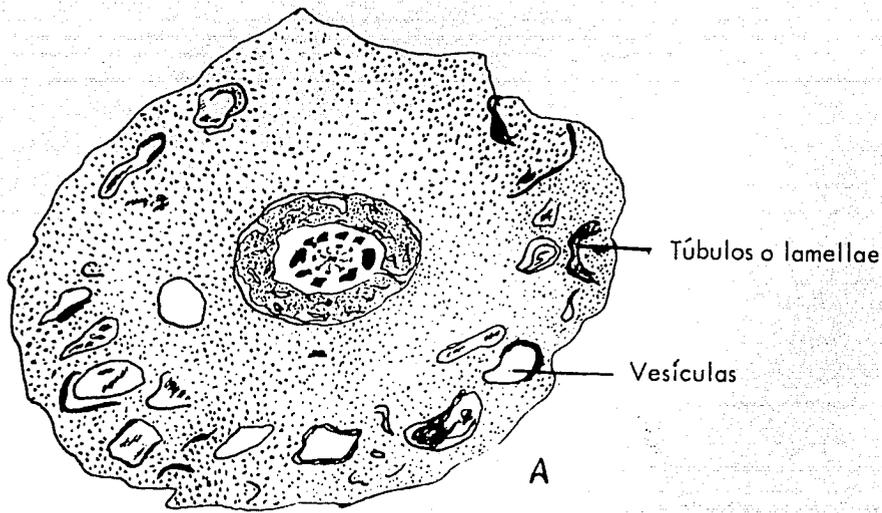


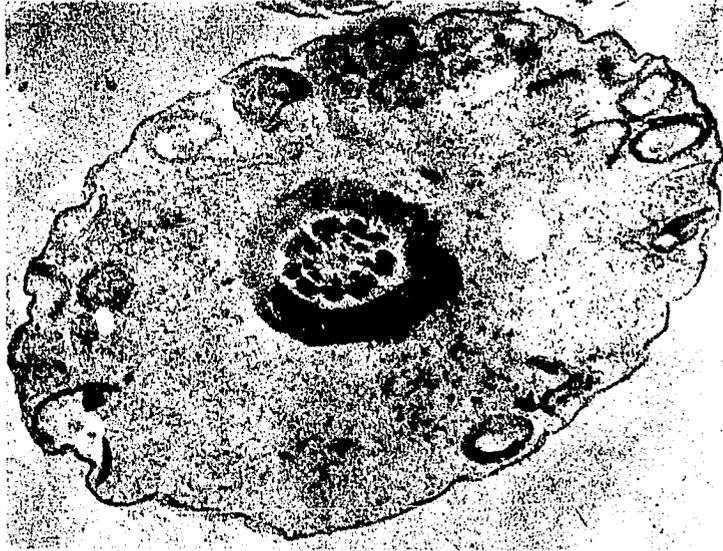


Fotografía No. 10
Corte longitudinal de pieza media
6,000x

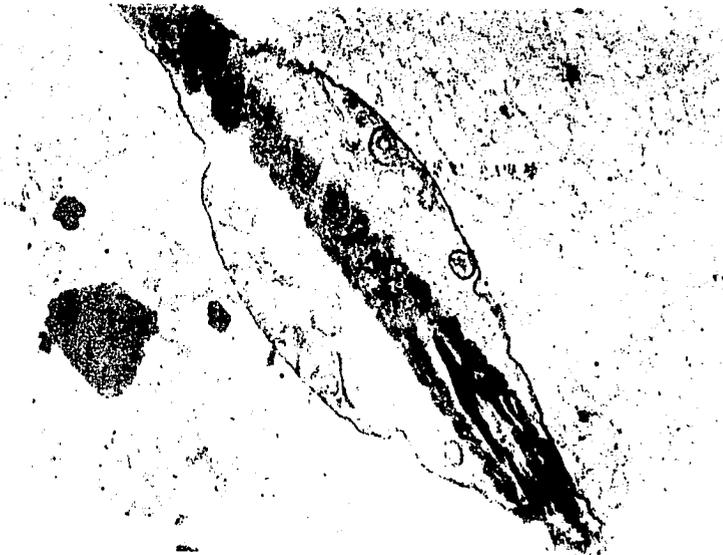


Fotografía No. 11
Corte longitudinal de pieza media
12,000x





Fotografía No. 12A
Corte sagital de gota citoplasmática
12,000 x



Fotografía No. 12B
Corte longitudinal de gota citoplasmática
12,000 x

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Afzelius, B. (1959).- Electron microscopy of the sperm tail. *J. biophys. biochem. Cytol.* 5:269-277.
- 2.- Anberg, A. (1957).- The ultrastructure of the human spermatozoa. *Acta Obstet. Gynec. Scand.*, 36 Suppl. 2, 12-23.
- 3.- Austin, C.R., y M.W.H. Bishop. (1968).- Some features of the acrosome and perforatorium in mammalian spermatozoa. *Proc. Roy. Soc. B*, 148:234.
- 4.- Bane, A. y L. Nicander (1963).- The structure and the formation of the perforatorium in mammalian spermatozoa. *Int. J. Fertil.* 8:865.
- 5.- Bedford, J. (1964).- Fine structure of the sperm head in ejaculated and uterine spermatozoa of the rabbit. *J. Reprod. Fertil.* 7:221-228.
- 6.- Birch-Andersen, A. y E. Blom (1963).- Concentrating ejaculated sperm for electron microscopy. *Nature*, 199:201-203.
- 7.- Bishop, M.W.H. y A. Walton (1960).- Spermatogenesis and the structure of mammalian spermatozoa. *Marshall's Physiology of Reproduction*. Edited by A. S. Parkes. Vol. 1, Tomo 2. Cap. 7, pp. 1-30.
- 8.- Blom, E. y A. Birch-Andersen (1960).- Ultra-structure of the bull sperm. I. The middle piece. *Nord. Vet. Med.* 12:261-279.

- 9.- Blom, E. y A. Birch-Andersen (1962).- Ultrastructure of the sterilizing knobbed sperm defect in the bull. *Nature*, 194:989-990.
- 10.- Blom, E. (1964).- The galea capitis as part of the acrosome cap in the bull - - sperm. *Proc. 5 Int. Congr. Animal Reproduct. Trento* 4:655-550.
- 11.- Blom, E. y A. Birch-Andersen (1965).- The ultrastructure of the bull sperm. - *Nord, Vet. Med.* 17:193-208.
- 12.- Bloom, G. y L. Nicander (1961).- On the ultrastructure and development of - the protoplasmic droplet of spermatozoa. *Z. Zellforschung.* 55:833-844.
- 13.- Brachet, J. y A. Mirsky (1961).- The cell. *Biochemistry, Physiology and Morphology.* Edited by Academic Press, New York and London. Vol. II, pp. 246-255.
- 14.- Bradfiel, J.R.G. (1955).- Fibre patterns in animal flagella and cilia. *Symp.- Soc. Exp. Biol.* 9:306.
- 15.- Burgos, M.D. y D.W. Fawcett (1955).- Studies on the fine structure of the ma-
malian testis. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1:287-298.
- 16.- Carrillo, H.M. (1972).- Comunicación personal.
- 17.- Challice, C.E. (1953).- Electron microscope studies of spermiogenesis in some rodents. *J. Roy. Micr. Soc.* 73:115.
- 18.- Challice, C. E. y Lord Rothschild (1959).- The bandicoot spermatozoon: an - - electron microscope study of the tail. *Proc. Roy. Soc. B*, 150:24.
- 19.- Das, C.M.S. (1962).- Ultrastructure of the post-nuclear cap in the developing sperms of *Microtus pennsylvanicus*. *Proc. Zool. Soc. Bengala* 15:75-81.
- 20.- Fawcett, D.W. (1958).- The structure of the mammalian spermatozoon. *International Review of Cytology.* Editado por C.H. Bourn y J.T. Danielli. *Academic Press Inc. Publishers, Nueva York.* Vol. VII, pp. 195-232.
- 21.- Fawcett, D.W. (1962).- Sperm tail structure in relation to the mammalian sper-
matozoa. *Int. Review Cytol.*
- 22.- Fawcett, D.W. (1962 b).- Sperm tail structure in relation to the mechanism of movement. *Proc. Symp. Sperm. Mot. Am. Ass. Adv. Sci.* 72:147-169.
- 23.- Fawcett, D.W. y D.R. Hollenberg (1963).- Changes in the acrosome of Gui-
nea pig spermatozoa during passage through the epididymis. *Z. Selforsch* 60:-
276-292.
- 24.- Gatenby, J.B. (1959).- The electron microscopy of centriole, flagellum an ci-
lium. *J. Roy. Mic. Soc.* 79:299-313.

- 25.- Gresson, R.A.R. (1950).- A study of the male germ cells of the rat and the -- mouse by phase contrast microscopy. *Quart. J. Micr. Sci.* 91:73.
- 26.- Gunter, B. y D.E. Zeitler (1964).- Study of bull spermatozoa. *J. Cell Biology* 21:175-189.
- 27.- Hadek, R. (1963).- Study on the fine structure of rabbit sperm head. *J. Ultrastruc. Res.* 9:110-122.
- 28.- Hancock, J.L. (1957).- In Brief. The structure of spermatozoa. *Veterinary - Record* 69:996-997.
- 29.- Hancock, J.L. (1965).- The ultrastructure of mammalian spermatozoa. *Advances in reproduction* 1:125-124.
- 30.- Hondges, A.J. (1959).- Electron microscopic studies of spermatozoa. II. The morphology of the human spermatozoon. *Aust. J. Med. Sci.* 6:188.
- 31.- Kojima, Y. (1962).- Electron microscopic study of the bull spermatozoa. *J. - Jap. J. Vet. Res.* 10:72-74.
- 32.- Kojima, Y. y T. Ishicawa (1963).- Etude au microscope électronique de la -- gouttelette protoplasmique observée dans le spermatozoïde chez les taureaux. -- *Jap. J. Vet. Res.* 11:152-157.
- 33.- Luft, J.H. (1961).- Improvement in epoxy resin embedding. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9:409-414.
- 34.- Mann, T. (1965).- Reproduction in domestic animals. Editado por H.H. Cole y T.T. Cupps. Academic Press, Nueva York. Vol. II. Cap. II. pp. 19-26.
- 35.- Mann, T. (1964).- The biochemistry of semen and of the male reproductive -- tract. Editado por Butler y Tanner Ltd. Great Britain. Primera ed. pp. 19-26.
- 36.- Mathur, R.S. (1962).- The centriole complex of the rat: an electron microscope study. *J. Roy. Micr. Soc.* 89:19-21.
- 37.- Morton, H. (1939).- Studies on reproduction in the albino mouse. *Proc. Roy. Soc. Edimb.* 59:207.
- 38.- Millioning, J. (1961).- Advantages of a phosphate buffer for OsO4 solution in fixation. *J. Appl. Phy.* 32:16-37.
- 39.- Moricard, R. (1960).- Observations de microscope électronique sur des modification acrosomiques lors de la pénétration spermatique dans l'oeuf des mammifères. *C.R. Soc. Biol.* 154:2187.
- 40.- Nicander, L. (1962).- Development of the fibrous sheath of the sperm tail. -- *Proc. Fifth Int. Congr. Electron Microscopy Pt. 4.*

- 41.- Nicander, L. y A. Bane (1962).- Fine structure of boar spermatozoa. *Z. Zellforsch* 57:390-405.
- 42.- Piko, L. y A. Tyler (1964).- Fine structural studies of sperm penetration in the rat. *Proc. 5. Int. Congress. Animal Reprod. Trento, 1964.* 2:372-377.
- 43.- Popa, G.T. y V.D. Marza (1931).- Biologie des spermatozoides. *Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol.* 4:301.
- 44.- Rahlman, F.D. (1961).- Electron microscopic study of mature bovine spermatozoa. *J. Dairy Sci.* 44:915-920.
- 45.- Reynolds, E.S. (1963).- The use of lead citrate at high pH as electron opaque - stain in electron microscopy. *J. Cell Biology* 17:208-212.
- 46.- Saacke, R.G. y J.D. Almquist (1964).- Ultra-structure of bovine spermatozoa. I. The head normal ejaculated sperm. *J. Dairy Sci.* 115:143-161.
- 47.- Sabatini, D.D.; K. Bensch y R.J. Barnet (1963).- Citochemistry and electron microscopy. The preservation of celular ultrastructure in enzyme activity by aldehyde fixation. *J. Cell Biology* 17:19-58.
- 48.- Savage, A; W.W. Williams y N.M. Fowler (1927).- A statical study of the - head length variability of bovine spermatozoa and its application to the determi-
nation of fertility. *Trans. Roy. Soc. Can.* 31:425.
- 49.- Sotelo, J.R. y Omar Trujillo-Cenoz (1958).- Electron microscope study of the kinetik apparatus head length in animal sperm cells. *Z. Zellforsch* 48:565- - 601.
- 50.- Telkka, A.; D.W. Fawcett y A.K. Christensen (1961).- Further observations- on the structure of the mammalian sperm tail. *Anat. Rec.* 141:231-236.
- 51.- Uslar, P.R. (1965).- Primera inseminación artificial en México. Tesis profe-- sional. Facultad de Medicina Veterinaria, U.N.A.M., México.
- 52.- Watson, L.L. (1958).- Staining of tissue reactions for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophy. Biochem. Cytol.* 4:127.
- 54.- Wu, S.H. y J.D. Newstead (1963).- Electron microscope studies of bovine epi didymal spermatozoa. *J. Anim. Sci.* 22:867.