

13° 198
261.



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**ULTRAESTRUCTURA DEL ESPERMATOZOIDE
DE OVINO**
Microscopia Electrónica de Transmisión y Barrido

T E S I S

Que para obtener el título de:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P r e s e n t a :
JUAN ORTIZ MARQUET

ASESORES

MVZ. Javier Valencia Méndez
Dra. Silvia Gómez Estrella



México, D. F.

Diciembre 1992

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

LISTA DE CONTENIDO

<i>Resumen</i>	1
<i>Introducción</i>	2
<i>Material y Método</i>	5
<i>Resultados</i>	10
<i>I Microscopía óptica</i>	10
<i>II Microscopía electrónica de barrido</i>	11
<i>III Microscopía electrónica de transmisión</i>	14
<i>Cuadro</i>	23
<i>Esquema</i>	24
<i>Micrografías</i>	25
<i>Discusión</i>	42
<i>Conclusiones</i>	48
<i>Literatura citada</i>	50

RESUMEN

ORTIZ MARQUET JUAN, ULTRAESTRUCTURA DEL ESPERMATOZOIDE DE OVINO

(Microscopía Electrónica de Transmisión y Barrido).

(bajo la dirección del Dr. Javier Valencia Méndez, Dra. Silva Gómez Estrella).

Para la valoración de la estructura fina del espermatozoide es necesario contar con una metodología que produzca los mínimos artefactos en las diferentes estructuras espermáticas para poder llevar a cabo valoraciones morfológicas confiables y poder de esta manera determinar alteraciones en espermatozoides que ocasionan bajos índices de fertilidad. La técnica empleada permitió realizar un procesamiento del material en el cual la inducción de artefactos que pudieran confundirse con estructuras normales fue mínima. Las observaciones realizadas permitieron identificar a las membranas acrosomales sin alteraciones y sólo la membrana plasmática presentó ondulaciones y desprendimientos. La fuerte electrodensidad del núcleo dificulta la observación de la membrana nuclear, sin embargo se le pudo identificar hacia la base de la cabeza ocasionalmente y en el cuello como remanentes nucleares. La densidad del núcleo se presentó distribuida homogéneamente y sólo hacia su base se observaron puntos electrón-lucidos. Los desprendimientos y ondulaciones de la membrana plasmática, la presencia de espacios claros hacia la base de la cabeza en el núcleo y las diferentes densidades tanto del núcleo como del contenido acrosomal pueden ser producto del procesamiento del material. Las demás estructuras no presentaron cambios producidos por la técnica, estableciéndose un patrón normal de la ultraestructura.

INTRODUCCION

El espermatozoide es una célula haploide altamente diferenciada que está capacitada para desplazarse, fecundar al óvulo y proteger de una forma particularmente eficaz su contenido genético: tres funciones que garantizan la reproducción y por lo tanto la importante tarea de la conservación de las especies animales.

Las primeras representaciones gráficas de esta célula datan del siglo XVII (1677), se deben a Anton Van Leewenhoek (27) y ciento noventa y ocho años después (1875) Hertwing documenta su función primordial, la de fecundar al óvulo. (27, 28, 30)

A pesar de haber sido reconocido el espermatozoide desde hace más de 300 años, es hasta principios de este siglo XX cuando se estudia sistemática y multidisciplinariamente en numerosas especies animales, generándose un enorme volumen de literatura que avala el importante conocimiento adquirido durante este siglo sobre su función, composición química, y en forma muy destacada sobre la morfología. Las primeras observaciones formales de espermatozoides de animales domésticos se deben a Retzius, quien utilizando el microscopio de luz, publica trabajos que actualmente siguen considerándose clásicos. (61)

El conocimiento de la organización interna del gameto fue posible básicamente al desarrollo de tres áreas: primero, el surgimiento en 1932 del microscopio electrónico de transmisión, que fue producto de la tesis doctoral de Max Knoll y Ernest Ruska (20, 29), segundo, al perfeccionamiento de los métodos de ultramicrotomía (44, 49, 58) y tercero, al desarrollo para preparar muestras biológicas para estudios ultraestructurales (64). El manejo del semen para ser observado por microscopía electrónica de transmisión no es fácil,

en la actualidad, las técnicas utilizadas no garantizan un cien por ciento de confiabilidad, debido a los artefactos que llegan a producirse en estructuras lábiles del espermatozoide, ocasionadas por la serie de pasos un tanto agresivos, a los que debe someterse el gameto durante su preparación (45, 46).

Los microscopios electrónicos, tanto de transmisión como de barrido, al emplear como fuente luminosa un haz de electrones, permite en función de la capacidad resolutive superar las limitaciones del microscopio óptico. El microscopio óptico permite observar dimensiones mayores a 200nm. (0.2 um) mientras que el microscopio electrónico de transmisión permite identificar estructuras con dimensiones tan pequeñas como son de 0.3 a 0.5 nm. (0.0003 y 0.0005 um). Con los microscopios de barrido se obtiene información de la estructura de las superficies de lo que se observa con la particularidad de tener aspecto tridimensional de las superficies con una resolución entre 3 a 5 nm. (0.003 a 0.005 um).

La primera descripción ultraestructural del espermatozoide del morueco las realizó Randall y Friedlander a fines de la década de los cuarentas (16, 60). A partir de esa fecha, mucho se ha publicado de la ultraestructura del espermatozoide en diferentes especies de animales que han venido sumando características morfológicas nuevas al espermatozoide del ovino. En el momento actual algunas de ellas están sujetas a discusión (17, 24, 41, 71, 72).

La inseminación artificial con semen congelado, técnica valiosa que ha permitido grandes adelantos en el mejoramiento genético de diversas especies animales, demanda del conocimiento cada vez más exacto de la ultraestructura del espermatozoide, para poder llevar a cabo valoraciones morfofuncionales confiables.

En el ganado lanar los índices de fertilidad logrados por inseminación con semen congelado, no han sido todo lo afortunado que han resultado ser en el ganado bovino (19, 68). Entre las múltiples causas señaladas que explican, desde luego, los bajos índices de fertilidad, se menciona a la disminución y/o a la pérdida de la motilidad progresiva del espermatozoide observada después del descongelamiento del semen, a pesar de haber sido congelado con la adición de crioprotectores (19, 43, 65, 66). Con el microscopio óptico se han podido documentar alteraciones en el acrosoma, que explica la infertilidad de la célula; sin embargo existen espermatozoides astenospérmicos e inmóviles, morfológicamente normales por lo menos a nivel de la microscopía óptica, quedando sin explicación la disfunción motriz del gameto. Se han mencionado como posibles causas de la astenospermia o de la inmovilidad del gameto a diversos factores moleculares (remoción de componentes celulares, trastornos en el intercambio iónico y disminución del ATP (19, 70), no existen referencias sobre la organización subcelular de estos espermatozoides "normales" incapaces de realizar un desplazamiento normal.

OBJETIVOS DE LA TESIS

1.- Implementar una técnica para manejar semen sin producir alteraciones subcelulares en los espermatozoides, que con frecuencia se producen durante los diversos pasos que constituyen la técnica de rutina.

2.- Estudiar con detalle la estructura fina de cada segmento del nemaspermo, conceptualizando información que sirva de referencia para establecer parámetros confiables de comparación vs. espermatozoides anormales.

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron las muestras de semen de tres carneros (un eyaculado por semental), de raza súffolk del Centro de enseñanza Práctica, Investigación y Extensión en Rumiantes (C.E.P.I.E.R.), de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

1.- Obtención del material.

La recolección de semen tanto para microscopía óptica, electrónica de transmisión y electrónica de barrido se realizó mediante el uso de vagina artificial Gummi-Bertran- Hannover, a la temperatura de 42 a 45 grados centígrados.

2.- Procesamiento del material para microscopía electrónica de transmisión.

Una vez recolectado el semen se hizo lo siguiente: dos de los eyaculados fueron lavados antes de someterse a la fijación mientras que al tercero se le agregó la solución fijadora inmediatamente después de haberse obtenido. Es la única diferencia aplicada en la metodología. El resto de los pasos fue igual para ambas muestras.

El lavado del semen se realizó de la siguiente forma:

- a).- Inmediatamente en el mismo recipiente se agregaron tres volúmenes más de amortiguador de fosfatos (PBS) a 0.2 molar, a pH 7.4, a una temperatura de 42 a 45 grados centígrados.*
- b).- Se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante.*

1.- Fijación

Tanto para las muestras previamente lavadas como para la muestra no lavada.

- c).- Adición de glutaraldehído al 6%. La fijación se realizó a temperatura ambiente durante dos horas y media. Se decanta el fijador.*
- d).- El sedimento se lavó tres veces con PBS-S (PBS más sacarosa para obtener una solución final al 10%). En cada lavado la muestra se centrifugó nuevamente a 3000 rpm por 10 minutos (56).*

2.- Posfijación:

- e).- Al sedimento se le agregó tetraóxido de osmio al 1% por hora y media. Al cabo de este tiempo se logró una pastilla con buena fuerza de cohesión.*
- f).- La muestra se lavó varias veces con PBS-S cuidadosamente para conservar íntegra a la pastilla celular. (53)*

3.- Deshidratación:

- g).- Se utilizó acetona en graduaciones porcentuales ascendentes, iniciando con la acetona al 60% y finalizando con tres cambios en acetona absoluta. (46)*

4.- Infiltración:

- h).- Se realizó en epon 812 en una proporción de 1:1 diluido en acetona. Las muestras permanecieron por espacio de una hora en este medio con el tubo de ensaye tapado, para impedir la volatilización del solvente.*

Al cabo de este tiempo los tubos se destaparon para permitir la volatilización de la acetona, incrementándose gradualmente la concentración del medio de infiltración. Los tubos destapados se colocaron en una campana con sílica durante 24 horas (50).

5.- Inclusión:

Las muestras se extrajeron del medio de infiltración, se colocaron cada uno de los fragmentos ya infiltrados en gotas frescas de epón colocados en una superficie de aluminio perfectamente pulida.

6.- Polimerización:

Se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Holdergger C.H. y Bachter R. (45). En donde se recomienda colocar un peso de 2 kg. sobre las muestras durante el tiempo de polimerización, con el objeto de extender al mayor número de espermatozoides para poder ser incididos longitudinalmente durante el corte.

7.- Ultramicrotomía:

En un aparato Porte Bloom M-T2 se realizaron cortes de 70 a 90 μm . de grosor, los cuales se colocaron directamente en rejillas de 400 mallas.

8.- Contraste:

Se utilizó acetato de uranilo de Watson al 4% por 8 minutos (69) y citrato de plomo de Reynolds durante dos y medio minutos (62, 69)

Las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico de transmisión Carl Zeiss EM-9-SII A.

Para verificar la integridad de los espermatozoides por haber sido sometidos a centrifugación, se tomó -antes de la deshidratación- gotas de semen de las muestras fijadas sin previo lavado y gotas de semen lavado antes de agregar el fijador.

Las muestras se extendieron en laminillas dejándose secar a temperatura ambiente y se tiñeron con azul de toluidina.

III.- Procesamiento del material para microscopía electrónica de barrido.

El manejo del material fue el mismo que el realizado para microscopía electrónica de transmisión hasta el paso número 3 (deshidratación), manteniéndose a los espermatozoides en acetona absoluta por más de 48 horas a 4 grados centígrados. Posteriormente las muestras se sometieron al método de punto crítico con bióxido de carbono a 1073 libras por pulgada cuadrada y a una temperatura de 30 grados centígrados. Finalmente se recubrieron con oro (42).

Las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico de barrido, Joel JSM 35 del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

RESULTADOS

I.- MICROSCOPIA OPTICA.

Los eyaculados lavados antes de la fijación con glutaraldehído, presentaron abundantes espermatozoides en forma dispersa (fig. 1). Los eyaculados presentaron una morfología celular homogénea, es decir, prácticamente la única célula observada fue el espermatozoide, todos ellos con cabezas uniformes con el mismo grado de maduración. Cabezas o flagelos anormales, gotas citoplásmicas u otro tipo celular, se observaron muy esporádicamente.

Los eyaculados fijados sin lavado previo mostraron a los espermatozoides aglutinados formando grandes grumos que el azul de toluidina tiñe con ligera metacromasia. En estas muestras seleccionar zonas con espermatozoides individuales para su estudio ultraestructural fue muy difícil (fig. 2)

CABEZA:

Las cabezas presentaron una morfología homogénea, siendo de forma ovalada. Se le distinguen tres áreas o zonas con diferentes densidades (fig. 3)

- 1.- Superficie de forma semilunar localizada en el ápice de la cabeza; es el área de mayor densidad y menor tamaño, señalada con la letra A en la fig. 3.*
- 2.- Superficie poco menos densa, localizada inmediatamente por debajo de la zona anterior, es el área de mayor extensión señalada con la letra B en la fig. 3.*
- 3.- Una superficie clara (C) que se encuentra dividida transversalmente por una línea densa (d) en 2 zonas 1 y 2. Hacia su base se localiza un punto de mayor densidad (p), en donde se inicia el flagelo. (Fig. 3)*

FLAGELO:

El flagelo presenta dos segmentos con diferentes diámetro y densidad. El primer segmento (I) de mayor densidad y grosor. El segundo segmento (II) es dos veces y medio más largo que el anterior siendo de menor densidad. (fig. 3)

II. MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO (M/EB)

Las imágenes de aspecto tridimensional obtenidas con el M/EB proporcionaron información del volumen y de las características texturales de la superficie del espermatozoide.

Las dimensiones de la célula son las siguientes: cifras expresadas en micrómetros (um). Longitud total del espermatozoide 55.92 a 57.53 um, corresponden a la cabeza de 6.4 a 7.3, al cuello o pieza conectora .70 a 1 um, a la pieza media 12.32 um, a la pieza principal 35.06 um y el segmento terminal 1.4 (fig. 4)

Se identificaron con precisión a las cinco piezas clásicas del espermatozoide: cabeza, cuello, pieza media, principal y final del flagelo. (fig. 4)

CABEZA

La cabeza presenta forma ovoidal, aplanada en sentido dorso-ventral, a diferencia del flagelo que es cilíndrico (fig. 4). Se le describen 2 caras, que arbitrariamente se han denominado cara dorsal y cara ventral, la cara dorsal se identifica porque el extremo apical es discretamente convexo (fig. 5) a diferencia del extremo apical de la cara ventral que es cóncavo (fig. 6). La cara dorsal presenta una línea dentada transversal (AN de la fig. 5) que divide a la cabeza en dos zonas: una anterior a la línea, es la zona de mayor amplitud constituye más del 60% del total de la cabeza y muestra una superficie homogénea (2 de la fig. 5). La zona posterior a la línea dentada es de menor extensión, presenta numerosas depresiones a manera de hoyuelos que le confiere una apariencia rugosa (RP de la fig. 5) y hacia su base se aprecia un cordón en sentido transversal (AP de la fig. 5) de menor densidad electrónica. Por debajo de este cordón se aprecian abultamientos (P de la fig. 5) que delimitan la base de la cabeza con el cuello (fig. 8). La cara ventral también presenta línea dentada (AN de la fig. 6) que la divide en las zonas ya descritas. En esta cara se observa por encima de la línea dentada, una área de depresión en forma triangular (3 de la fig. 6), cuyo vértice apunta anteriormente (2 flechas) (3 de la fig. 6). El borde anterior de la cabeza presenta un ensanchamiento que se flexiona hacia la cara ventral, dando un aspecto de concavidad que permite distinguir a esta cara ventral vs. cara dorsal, razón por la cual el cuerpo apical de acrosoma es más evidente en la cara ventral ((fig. 6).

CUELLO.

Lo comprende la superficie basal de la cabeza la cual está delimitada anteriormente por el ya descrito cordón transversal (AP de las figuras 5, 7 y 8) y una pequeñísima región del flagelo conformada por dos columnas que son más conspicuas en la cara ventral del espermatozoide (fig. 7).

FLAGELO.

El flagelo tiene forma cilíndrica sobre todo en su primer tercio, el diámetro del flagelo disminuye progresivamente a medida que se aleja del cuello (fig. 4). Se le describe 3 segmentos:

El primer segmento conocido como una pieza media, se caracteriza por ser cilíndrico y presentar una superficie de aspecto helicoidal, la cual termina caudalmente en un anillo (aJ de la fig. 9) que constituye el límite entre este primer segmento y el segmento conocido como pieza principal (fig. 4 y 9).

El flagelo pierde su forma cilíndrica a nivel de la pieza principal que tiene forma angulosa (fig. 4 y 9) y recobra su forma cilíndrica a nivel de la pieza final (fig. 4).

GOTA CITOPLASMICA.

En las muestras de semen estudiadas, los espermatozoides que presentaron gota citoplasmática fueron esporádicos, localizándosele generalmente en la parte final de la pieza media del flagelo. fig 10.

III.- MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION.

La microscopía electrónica de transmisión requiere de cortes muy delgados entre 50 y 90 nanómetros de grosor, de tal forma que cortes de espermatozoides con este grosor, permiten visualizar la organización interna de las diversas estructuras espermáticas.

En el presente trabajo se reconocieron 32 estructuras internas del nemaspermo; el cuadro número 1 contiene la lista de los organelos observados, agrupados en los cinco segmentos anatómicos que constituyen el gameto. Los planos de corte realizados en el espermatozoide por medio de la ultramicrotomía están señalados esquemáticamente en el cuadro número 2, así como la terminología que en el presente trabajo se emplea para señalar la ubicación de las diferentes estructuras que conforman el gameto.

Los términos cefálico, apical o anterior corresponden al sitio que se esté describiendo ubicado hacia la cabeza o hacia el borde del inicio de la misma. Los términos caudal, distal posterior se utilizan para señalar aquellos sitios que se localizan hacia el flagelo o hacia el extremo final del mismo.

RESULTADOS DE CORTES FINOS.

El nemaspermo se encuentra cubierto en su totalidad por la membrana plasmática o plasmalema, la cual presentó las siguientes características; ondulante a nivel de cabeza y suelto prácticamente en todo el resto del espermatozoide, a excepción de tres puntos en donde la membrana se fusiona al gameto:

- a) *Cuerpo apical en donde el plasmalema se adhiere al acrosoma (Fig. 11, 12 y 13).*

- b) *Zona posacrosomal (tercio posterior de la cabeza) en donde el plasmalema se fusiona íntimamente con la envoltura posacrosomal (Fig 12 y 15).*
- c) *Anillo de Jensen. Estructura triangular localizada entre la pieza media y la pieza principal del flagelo en donde el plasmalema se adhiere estrechamente a esta estructura (Fig. 29).*

CABEZA.

La cabeza del espermatozoide presenta una morfología constante, es elíptica, se caracteriza por una fuerte electrodensidad a excepción de su base en donde se pueden observar vacuolas (Fig. 11, 24 y 25).

Las estructuras que conforman la cabeza son: Núcleo cubierto por el acrosoma en un 60% de su extensión y la lámina densa posacrosómica que corresponde a la extensión restante del núcleo desnuda de acrosoma.

NUCLEO:

El núcleo tiene la forma de la cabeza, es fuertemente electrón-denso presentando áreas irregulares con densidades menores y pequeños puntos electrón-lucidos, dispersos heterogéneamente (Fig. 11, 24 y 25). Los cortes sagitales de la cabeza (cuadro 2) muestran al núcleo adelgazado en su extremo anterior, mientras que en su extremo posterior se ensancha dando lugar a la fosa de implantación, sitio en donde se inserta el flagelo (Fig. 16).

La membrana nuclear es muy difícil de identificar, sólo se logró hacerlo en muy pocos cortes afortunados como lo muestran las (Fig. 16, 19, 20 y 21). Cortes sagitales mediales muestran a la carioteca como una línea

densa interrumpida por pequeños espacios claros (Fig 26). La membrana nuclear se continúa hasta la pieza conectora en donde presenta ciertas características que serán señaladas en su oportunidad.

ACROSOMA:

Estructura a la que se le identifica una membrana propia que cubre el 60% de la superficie anterior del núcleo. Morfológicamente está constituido por tres regiones: región apical, principal y ecuatorial (Fig. 12, 13 y 14). La membrana propia del acrosoma lo separa por un lado del espacio subplasmalemal y por el otro del compartimento perinuclear (Fig. 13, 15, 16, 18), siendo las dos membranas acrosomales interna y externa las que conforman el acrosoma, organelo cuyo contenido es de menor densidad que el núcleo (Fig 12, 13, 14, 23, 17 y 18).

En el material estudiado se pudo distinguir en el acrosoma a las tres regiones que lo constituyen:

*1) **Cuerpo apical.**- Región localizada en el ápice del núcleo. Está constituido por un engrosamiento y doblez sobre sí mismo del acrosoma. El doblez se proyecta hacia una de las caras de la cabeza en forma cóncava, a esta cara la hemos denominado arbitrariamente cara ventral (Fig. 6 M/EB, 12 y 17). El cuerpo apical acrosomal contiene en su parte final una vesícula, la cual a su vez presenta una pequeña vacuola esférica que se logra observar sólo en algunos espermatozoides (Fig. 17). La membrana interna acrosomal proyecta un apéndice o falange dentro del cuerpo apical justo en el ápice del núcleo. Esta proyección de la membrana interna acrosomal dentro del cuerpo apical recibe el nombre de perforatorium (fig. 18).*

2) **Cuerpo principal del acrosoma.**- *constituye la región más amplia del acrosoma, se visualiza en cortes coronales (Fig. 11), sagitales (Fig. 12, 13 y 17), así como en cortes transversales de la cabeza (Fig. 11, 12, 13, 14, 17 y 18).*

3) **Cuerpo ecuatorial de acrosoma.**- *Se trata de una elongación del segmento principal como lo documentan cortes sagitales de la cabeza. El segmento se inicia en el punto donde se estrecha la región principal del acrosoma (Fig. 12 y 13) y termina en forma de saco hacia el tercio posterior del núcleo (Fig. 12), formando el anillo ecuatorial (Fig. 12 y 15) que en imágenes de microscopía de barrido hemos descrito como línea dentada, (Fig. 4, 5, 6, 7 y 8).*

Entre la membrana interna y la carioteca se distingue un espacio el cual rodea al núcleo siendo de mayor amplitud por debajo de la envoltura posnuclear o mitad posterior de la cabeza. Este espacio perinuclear contiene un material de densidad parecida al contenido acrosomal claramente identificado dentro del perforatorium, esta substancia perinuclear va desvaneciéndose conforme se aproxima a la base de la cabeza ya que en este sitio el espacio perinuclear toma mayor amplitud (Fig. 13, 15 y 18).

LAMINA DENSA POSACROSOMICA.

Lámina que empieza a partir de la terminación de la zona ecuatorial del acrosoma, es la envoltura que cubre el tercio inferior del núcleo, junto con el plasmalema se fusiona íntimamente desde el anillo nuclear hasta la base de la cabeza donde la membrana plasmática se separa nuevamente para continuar suelta por el cuello (Fig. 26), la lámina densa posacrosómica se observó en un corte sagital como una línea electrón-densa de aspecto granular (Fig. 15), ondulante y separada del núcleo, observándose una mayor

amplitud del espacio perinuclear. La membrana plasmática, la lámina densa y remanentes de la membrana nuclear forman el citado anillo posterior (Fig. 25).

CUELLO.

Es la región limítrofe entre la cabeza y el flagelo, esta región articular se encuentra delimitada anteriormente por el anillo posterior y caudalmente por el inicio de la hélice mitocondrial (Fig. 26). Dentro del cuello se reconocieron a las siguientes estructuras espermáticas: Capitulum o pieza conectora, columnas estriadas o de implantación, centriolo proximal o yuxtannuclear, membrana nuclear, remanentes de la membrana nuclear, poros nucleares, cisterna perinuclear, plato basal, anillo posterior y bolsas basales. (Fig. 19, 20, 21, 22, 26 y 27).

Cortes sagitales de la superficie plana de la cabeza muestran los diferentes aspectos del capitulum según la incidencia de corte; en la Fig. 20, la pieza conectora presenta forma de clavija adaptándose a la concavidad de la fosa de implantación, de esta pieza emergen tres columnas segmentadas que se observan como bandas claras electrodensas interrumpidas por espacios translúcidos. En la figura 19 la pieza conectora presenta forma de hoz, en el centro de ella se distingue un espacio circular de baja densidad electrónica, sitio ocupado por el centriolo proximal, que a través de un corte sagital a 90 grados por la superficie angosta de la cabeza, se observa la disposición de 9 tripletas microtubulares dispuestas concéntricamente a un par de microtúbulos centrales, clásica formación de los centriolos.

En la micrografía (21) se observa a la pieza conectora como una serie de varillas orientadas perpendicularmente al axonema, en el centro y por debajo de ellas se distingue un núcleo electrodenso que representa al

centriolo proximal. En la figuras 26 y 27 se observa la fosa de implantación, la concavidad está delimitada por una línea densa separada del núcleo. En sus extremos (bolsas basales) la membrana nuclear penetra al cuello como remanentes nucleares pudiéndose identificar zonas que sugieren cisternas perinucleares y discontinuidad de la membrana nuclear evidenciando poros nucleares.

El cuello es la única región donde la membrana nuclear está desprovista de protección, sólo la membrana plasmática se encuentra protegiéndola ya que ésta penetra como remanentes espirales, (Fig. 19, 20, 21, 26 y 27).

Las columnas de la pieza conectora constituidas por bandas densas que alternan con bandas claras corresponden a las columnas estriadas citadas en la literatura.

Un corte transversal a nivel de la fosa de implantación muestra las bolsas basales del núcleo y una serie de membranas íntimamente relacionadas distinguiéndose los remanentes en espiral de la membrana nuclear, membrana nuclear, poros nucleares, lámina densa, plasmalema y cisterna perinuclear (Fig. 25).

FLAGELO

El flagelo del nemaspermo se caracterizó por dos envolturas especiales:

- 1.- La envoltura mitocondrial del primer segmento o pieza media (Fig. 28)
- 2.- La envoltura fibrosa del segundo segmento o pieza principal (Fig. 29 y 30)

HELICE MITOCONDRIAL:

En el morueco se observa que las dos primeras mitocondrias son las más largas y se encuentran situadas a uno y otro lado del axonema (Fig. 11 y 21), la primera es la más larga, delimita la región del cuello con respecto al flagelo y empieza justo al lado de las columnas estriadas, (Fig. 21), la más pequeña se sitúa un poco más abajo a nivel de las fibras densas externas (Fig. 21), el resto de las mitocondrias son morfológicamente semejantes -de forma rectangular, sus polos cóncavos- se enrollan helicoidalmente, al axonema en una triple y cuádruple hélice figura (11, 21), la capa mitocondrial termina en una estructura triangular electrón-densa con el vértice dirigido hacia el polo caudal de la célula formando un anillo (Fig. 29).

La envoltura fibrosa de la pieza principal, consiste en una serie de anillos orientados circunferencialmente al axonema (Fig. 35), los cuales terminan en dos columnas que corren longitudinalmente al axonema (Fig. 30 y 34).

Esta envoltura empieza inmediatamente por debajo del anillo flagelar, el cual marca la división entre la pieza media y la pieza principal (Fig. 29). En su porción inicial la envoltura fibrosa se fija a las fibras densas externas 3 y 8, las cuales terminan abruptamente persistiendo las 7 restantes (Fig. 34).

FIBRAS DENSAS EXTERNAS.

Estas fibras se fijan anteriormente a las columnas segmentadas de la pieza conectora (Fig 20), y corren paralelamente a los dobletes microtubulares (Fig. 32 a 36). Las fibras difieren una de la otra tanto en forma, como en longitud, según el nivel del flagelo que van recorriendo.

En cortes transversales, estas fibras presentan las siguientes características: En la región proximal al cuello las fibras densas externas tienen forma regularmente triangular, todas separadas del doblete microtubular del axonema (Fig. 32), a medida que se alejan del polo cefálico las FDE adoptan formas irregulares que van disminuyendo paulatinamente de grosor (Fig. 33) y parecen adosarse al doblete microtubular correspondiente cerca de su terminación, en el inicio de la pieza principal por debajo de anillo de Jensen (Anillo flagelar) las fibras 3 y 8 desaparecen para formar parte de las columnas longitudinales que corren paralelas al axonema, las 7 restantes van terminando escalonadamente a diferentes niveles dentro de la pieza principal (Fig. 34).

Las fibras densas externas en cortes longitudinales del flagelo se observan como líneas de baja densidad que corren paralelas a los dobletes microtubulares del axonema (Fig. 28, 29, 30 y 31).

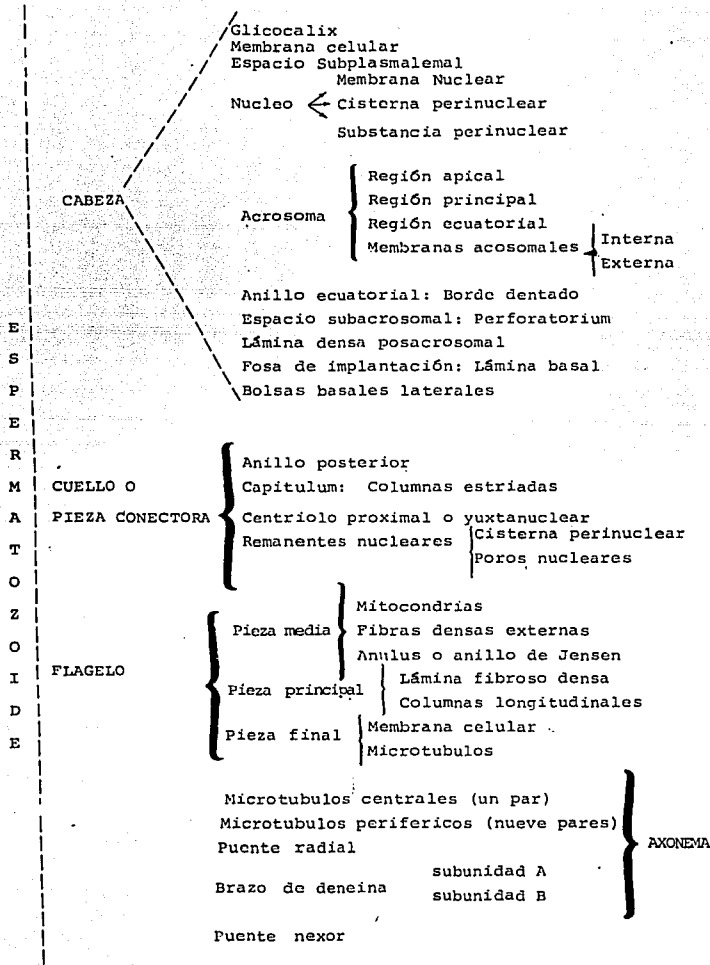
AXONEMA.

El complejo microtubular axial, consiste en un par de microtúbulos centrales con nueve dipletos dispuestas concéntricamente al par central (Fig. 32, 33, 34, 35 y 36). Esta formación se encuentra desde el cuello hasta el tercer segmento del Flagelo donde aún persisten (Fig. 31).

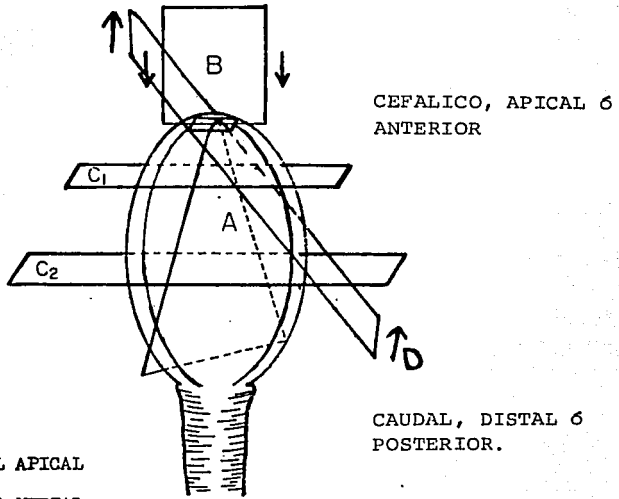
Los microtúbulos centrales se observan como círculos completos, mientras que en los periféricos sólo uno de cada par es completo, el otro es incompleto y está sobrepuesto en forma de C (Fig. 32, 33, 34, 35 y 36).

Los microtúbulos periféricos presentan un enlace radial hacia el par central el cual se une también mediante una línea densa (Fig. 36). Estos microtúbulos proyectan un pequeño brazo en forma de coma (Fig. 32, 33, 34, 35 y 36). En cortes longitudinales los microtúbulos se observan como túbulos paralelos (Fig. 28, 29, 30 y 31).

CUADRO



ESQUEMA



- A) CORTE SAGITAL
- B) CORTE CORONAL
- C1) CORTE TRANSVERSAL APICAL
- C2) CORTE TRANSVERSAL MEDIAL
- D) CORTE OBLICUO

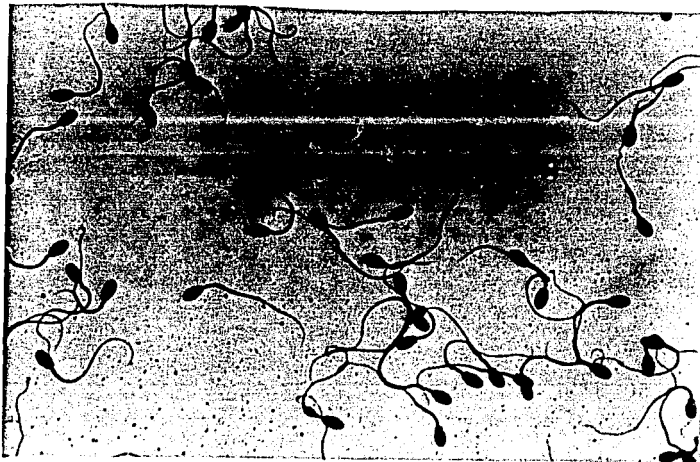


Fig. 1. Microscopía Óptica. Impronta de semen fresco de ovino lavado antes de la fijación y teñido con azul de toluidina. Obsérvese la dispersión de los gametos 536X.



Fig. 2. Microscopía Óptica. Impronta de semen fresco de ovino fijado sin previo lavado y teñido con azul de toluidina. Obsérvese el predominio de espermatozoides aglutinados 268X.

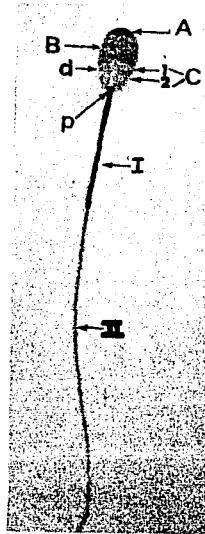


Fig. 3. Microscopía Óptica. Espermatozoide completo. En la cabeza se observan: Cuerpo apical (A) y región principal (B) del acrosoma. El segmento (C) dividido por el anillo nuclear (d) en región ecuatorial del acrosoma (1) y envoltura posacrosomal (2). Punto denso basal (p) que corresponde a la inserción del flagelo.

En el flagelo se distinguen dos segmentos de diferentes densidades y grosor, pieza media (I) y pieza principal (II) 2000X.

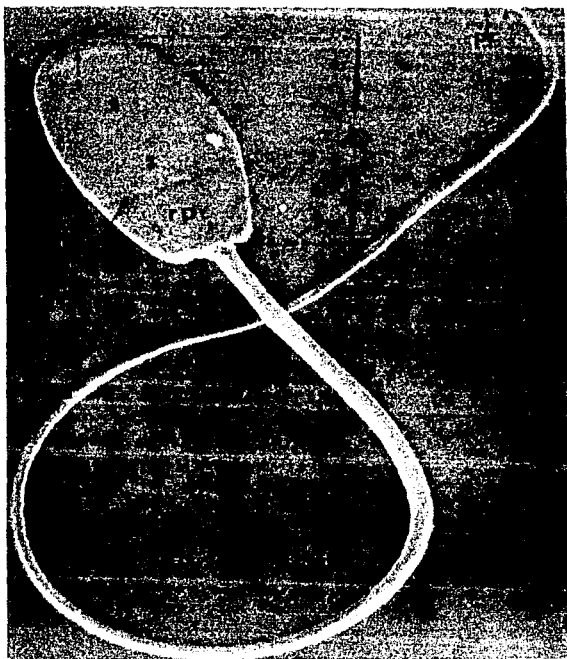


Fig. 4. Microscopía electrónica de barrido (M/EB). Espermatozoide completo. Cabeza (C), cuello (CU), pieza media (PM), pieza principal (PP) y pieza final (PF). En la cabeza se observan las tres regiones del acrosoma: Cuerpo apical (1), regiones principal (2) y ecuatorial (3). Anillo nuclear (an) y la región posacrosomal (rp). 6000X.

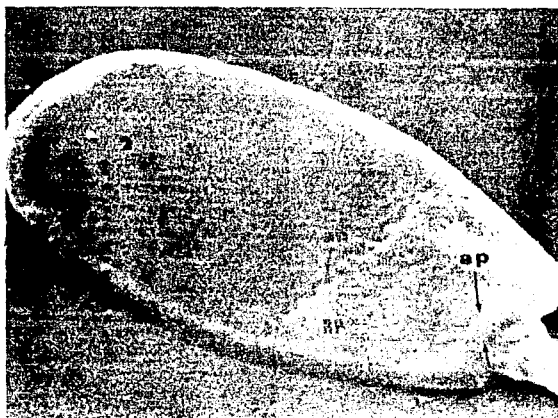


Fig. 5. M/EB. Cara dorsal de la cabeza de un espermatozoide. Extremo apical del acrosoma discretamente convexo (flecha) Región principal del acrosoma (2), anillo nuclear (an), región posacrosomal (rp) y anillo posterior (ap). Obsérvese la ausencia de la depresión en forma triangular que claramente muestra la cara ventral. 12702X.

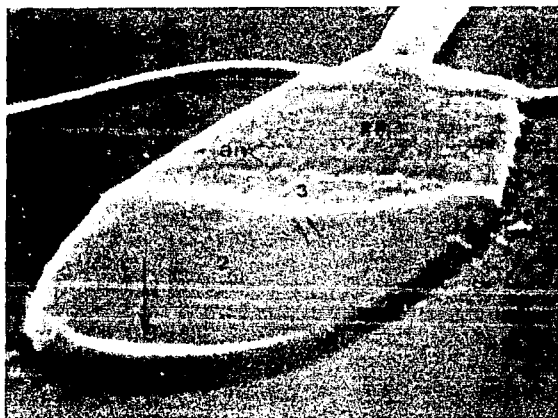


Fig. 6. M/EB. Cara ventral de la cabeza de un espermatozoide. Extremo apical con una concavidad franca (flecha) región principal del acrosoma (2); nótese una zona en bajo relieve en forma triangular que corresponde a la región ecuatorial (3) del acrosoma, región posacrosomal (rp) y anillo nuclear (an). 15000X.

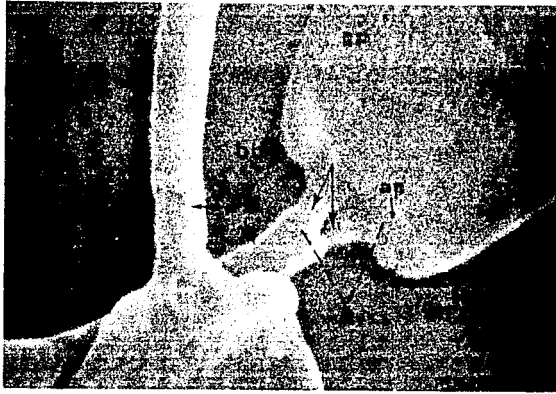


Fig. 7. MJE. Características morfológicas de la superficie de la región del cuello (C), columnas de implantación (flechas), anillo posterior (ap), bolsas basales (bb); región posacrosomal (RP) y pieza media (PM) 17280X.

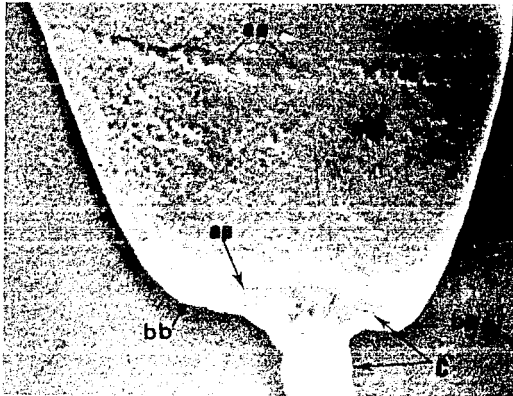


Fig. 8. MJE. Cara dorsal de la cabeza (ausencia de la región triangular en bajo relieve), que muestra el aspecto en sierra de anillo nuclear (an), una superficie rugosa con depresiones de la región posacrosomal (RP), anillo posterior (ap) que limita anteriormente a la región del cuello (C) y las bolsas basales (bb) 20066X.

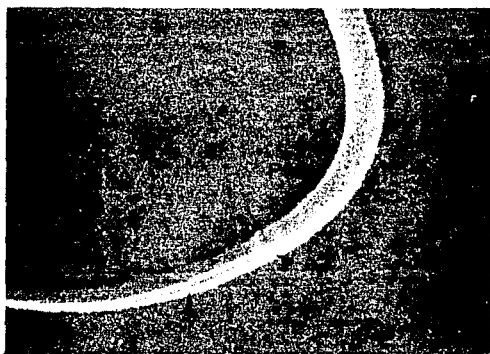


Fig. 9. MIEB. Detalle del anillo de Jensen o anulus (AJ) límite entre la pieza media (PM) y pieza principal (PP) del flagelo. Nótese que la pieza principal (PP) no es cilíndrica y presenta una hendidura longitudinal (flecha) 9333X.



Fig. 10. MIEB. Gota citoplasmática, localizada al fina de la pieza media (PM), obsérvese la envoltura helicoidal de este segmento. Anillo de Jensen (AJ) y hendidura longitudinal (hl) de la pieza principal del flagelo 8600X.

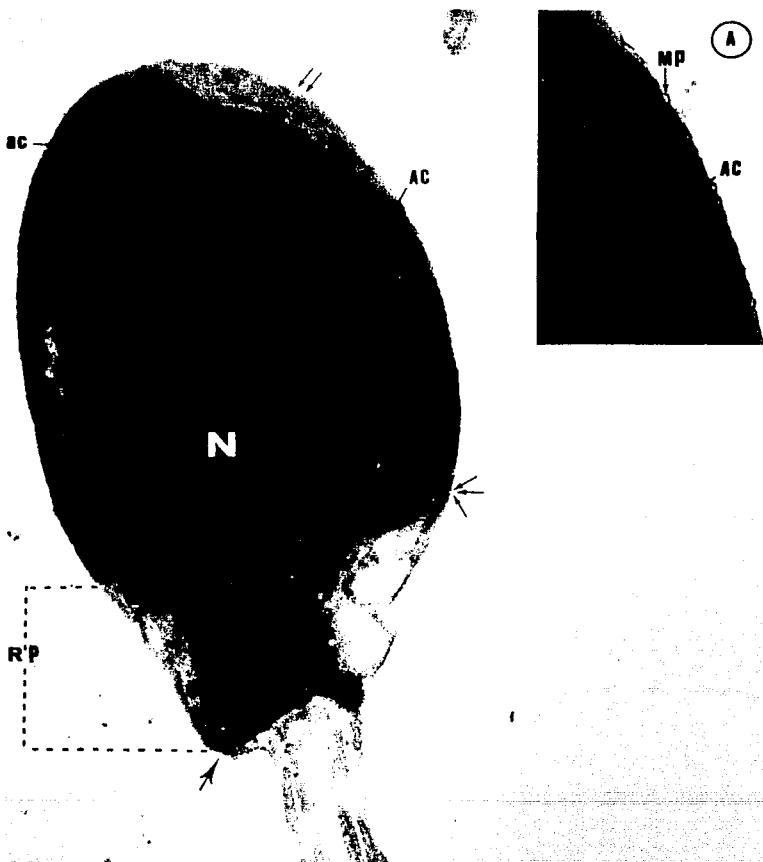


Fig. 11. ME/T. de un corte coronal de cabeza (C) del nemasperm. En el recuadro (A) obsérvese a la membrana plasmática ondulante, la cual se adhiere; en el ápice de la cabeza (dos flechas) y en la región posacrosomal (RP), tercio inferior de la cabeza. Obsérvese la menor densidad del acrosoma (AC) vs. el núcleo (N) que cubre los dos tercios anteriores de la cabeza, límite terminal del acrosoma (tres flechas) y límite del anillo posterior (una flecha). 14910X.

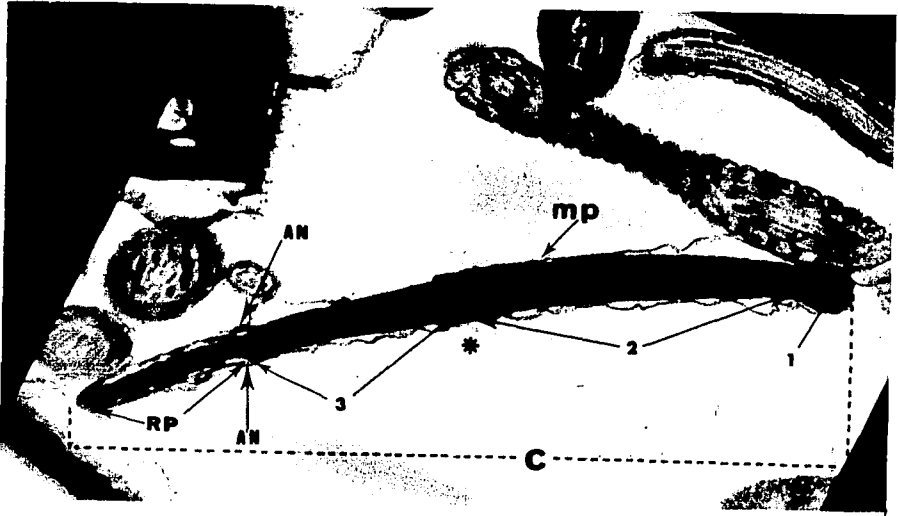


Fig. 12. ME/T. Corte sagital de la cabeza de un espermatozoide. Obsérvese las tres regiones del acrosoma: Región apical (1) dilatada y flexionada hacia la cara ventral que es discretamente cóncava (*), la región principal (2) la de mayor extensión y la región ecuatorial (3) que es la zona más adelgazada del acrosoma. Nótese que la membrana plasmática (MP) es ondulante a excepción del borde apical (1) y en la región posacrosomal (RP) en donde se adhiere íntimamente, anillo nuclear (AN). 36000X.

Fig. 13. ME/T. Corte sagital de la cabeza de un espermatozoide en donde se aprecian las siguientes estructuras: Membrana plasmática (MP), Espacio subplasmalemal (ESP), Membrana externa acrosomal (MEA), Membrana interna acrosomal (MIA), Espacio perinuclear (EPN), Carioteca (C), cuerpo apical (1), Región principal (2) y segmento ecuatorial del acrosoma (3). Inicio de la región ecuatorial del acrosoma (*), Núcleo (N) 88000X.

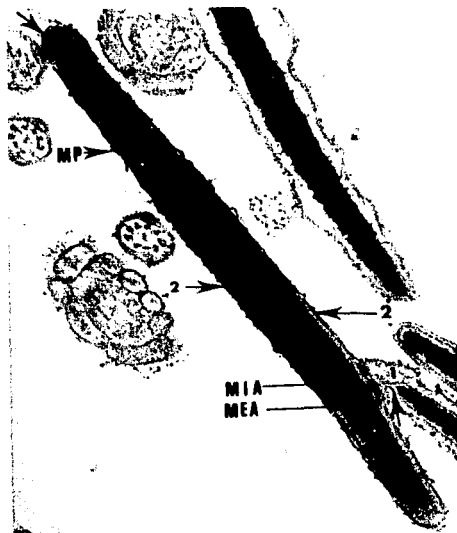
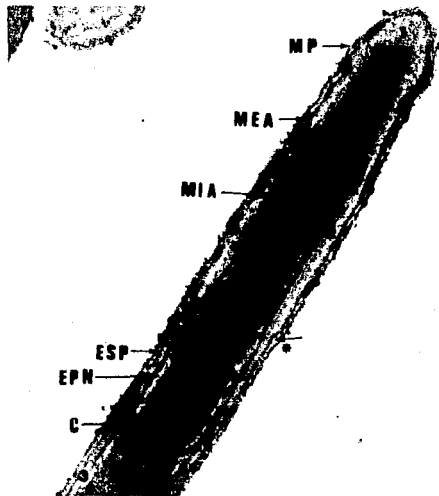


Fig. 14. ME/T. Corte oblicuo de cabeza. El núcleo (N) se encuentra rodeado por la región principal del acrosoma (2), en el extremo superior izquierdo se observa el perforatorium (flecha) dentro del cuerpo apical (1), se distingue la membrana plasmática (MP), la membrana interna acrosomal (MIA), la membrana externa acrosomal (MEA) 52111X.

Fig. 15. ME/IT. Corte sagital de cabeza en la región posacrosomal, donde la lámina densa posacrosómica (LDP) presenta aspecto granular, el espacio perinuclear es evidente (EPN), la membrana plasmática (MP) se observa suelta en la región ecuatorial del acrosoma y precisamente en la terminación de éste (*) se fusiona estrechamente a la lámina densa posacrosómica (LDP) o envoltura posnuclear, el espacio subplasmalemal (ESP) es notorio. Segmento ecuatorial (3). 38280X.

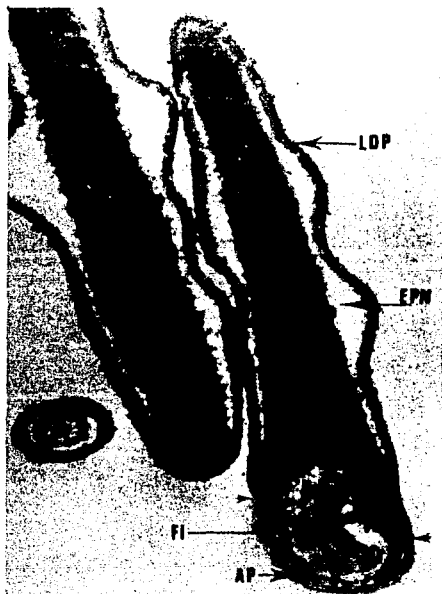
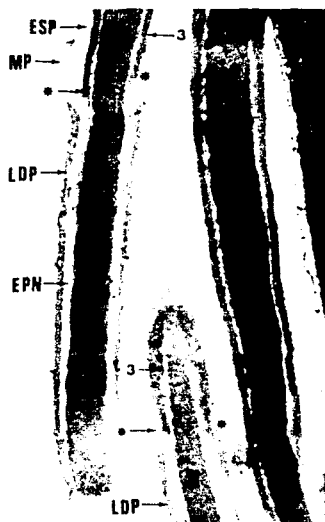


Fig. 16. ME/IT. Corte sagital en la base del núcleo (N). Nótese la terminación (puntas de flecha) de la lámina densa posacrosómica (LDP) en donde el anillo posterior (AP) empieza a formarse; fosa de implantación (FI) y espacio perinuclear (EPN) 25172X.

Fig. 17. ME/T Corte sagital del Núcleo (N). Nótese en el ápice el doblez del cuerpo apical (1) hacia la cara que arbitrariamente conotamos como ventral; nótese al final de cuerpo apical una vesícula (flecha) dentro de la cual se observa una vacuola (*). En la membrana plasmática (MP) se observa configuración trilaminar, membrana externa acrosomal (MEA), membrana interna acrosomal (MIA), segmento principal del acrosoma (2) y núcleo (N) 64000X.

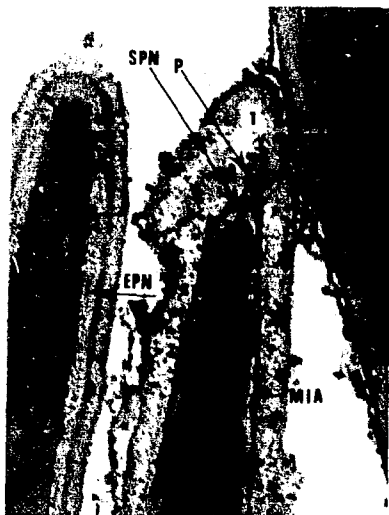
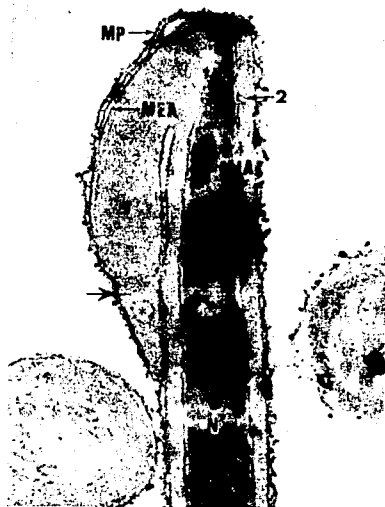


Fig. 18. ME/T: Corte sagital de cabeza que muestra en detalle la proyección de la membrana interna acrosomal (MIA) hacia el ápice del núcleo (N) formando el perforatorium (P), substancia perinuclear (SPN), cuerpo apical (1), región principal del acrosoma (2) y región ecuatorial del acrosoma (3), espacio perinuclear (EPN) y núcleo (N). 90000X.

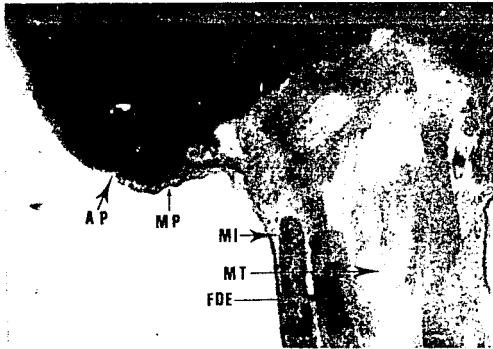


Fig. 19. ME/T. Corte coronal a nivel de cuello en donde se observa la clásica disposición de la pieza conectora en forma de hoz (PC), anillo posterior (AP), mitocondria (MI), microtúbulo del axonema (MT), fibra densa externa (FDE), membrana plasmática (MP), 54290X.



Fig. 20. ME/T. Corte coronal por el lado angosto de cabeza. Plato basal (PB) pieza conectora (PC), remanentes de la membrana nuclear (*), columnas estriadas (CE), fibras densas externas (FDE). 53760X.

Fig. 21. ME/T. Corte coronal de cuello en donde la pieza conectora se observa segmentada (PC), línea del plato basal (PB), anillo posterior (AP), remanentes de la membrana nuclear (*) y fibras densas externa (FDE) 73920X.

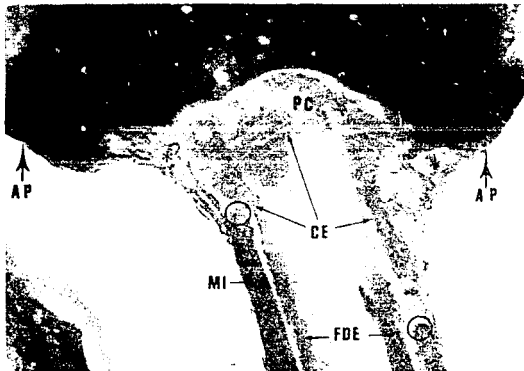
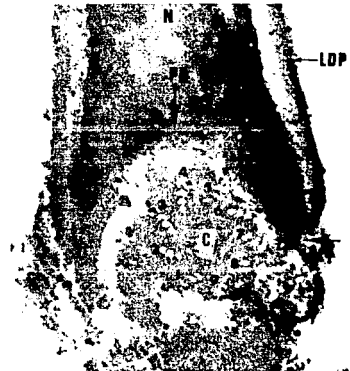


Fig. 22. ME/T. Corte sagital en la zona centriolar. Nótese los nueve tripletos microtubulares del centriolo proximal (C) cortados transversalmente, línea del plato basal (PB), lámina densa posacrosómica (LDP), la flecha señala el inicio del cuello sitio del anillo posterior. 68400X.



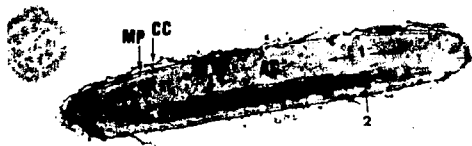


Fig. 23. Corte transversal apical de cabeza en donde se puede apreciar la forma aplastada del núcleo en sentido dorso-ventral. Membrana plasmática (MP), cubierta celular (CC), membrana interna acrosomal (MIA), membrana externa acrosomal (MEA), cuerpo apical del acrosoma (1), región principal del acrosoma (2) y acrosoma (AC). 128916X.

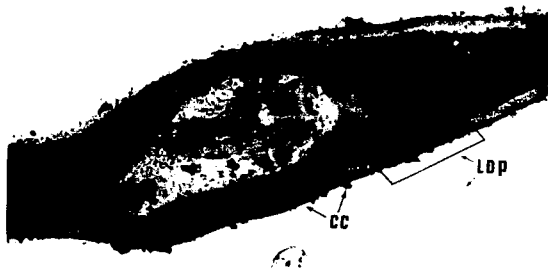


Fig. 24. Corte transversal de cabeza en donde se aprecia la fosa de implantación (FI), microtúbulos (MT), zona centriolar (ZC). En el recuadro obsérvase el detalle de las membranas de la lámina densa pos-acrosomal (LDP) y en la superficie la cubierta celular (CC) y núcleo (N). 33440X.

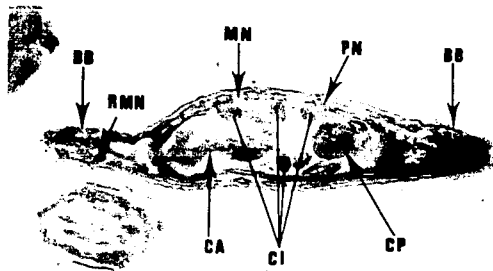


Fig. 25. Corte transversal de cabeza a nivel del anillo posterior. Nótese la íntima relación de membranas que constituyen el anillo posterior y las bolsas basales (BB), en los extremos del núcleo en donde se observa remanentes de la carioteca (RMN), membrana nuclear (MN), poro nuclear (PN), capitulum (CA), columnas de implantación (CI) y centriolo proximal (CP). 48658X.

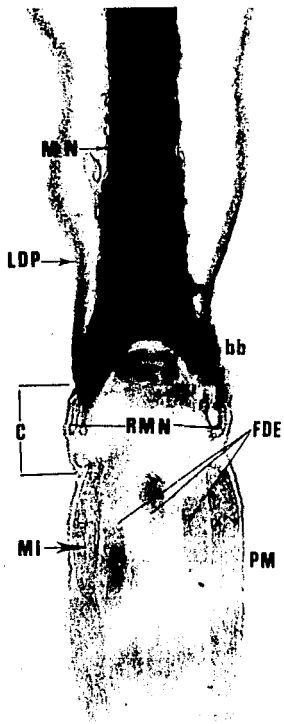


Fig. 26. Micrografía electrónica que muestra en un corte sagital a través de cuello el punto donde la membrana celular se separa de la envoltura posacrosomal para proseguir suelta por el cuello y resto del flagelo. Membrana nuclear (MN), lámina densa posacrosómica (LDP), cuello (C), mitocondria (MI), zona centriolar (ZC), remanentes de la membrana nuclear (RMN), fibras densas externas (FDE) y pieza media (PM). 57680X.

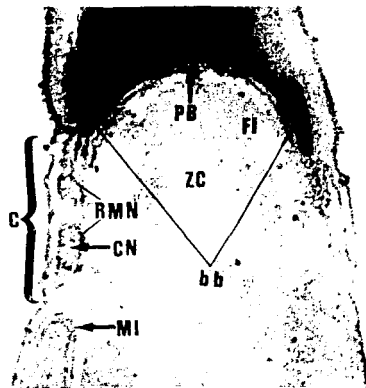


Fig. 27. Corte sagital a través del cuello en donde se aprecian poros nucleares y la línea del plato basal como una línea completa cóncava transversal. Cuello (C), remanentes de la membrana nuclear (RMN), cisterna nuclear (CN), mitocondria (MI), bolsas basales (bb), zona centriolar (ZC), plato basal (Pb) y fosa de implantación (FI). 125800X.

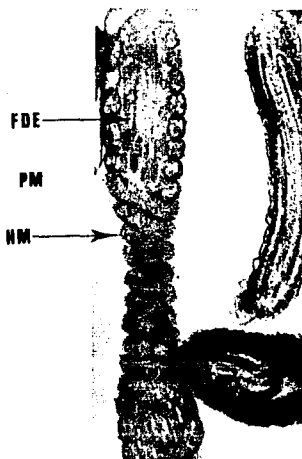


Fig. 28. ME/T. Corte longitudinal de pieza media. Nótese la hélice mitocondrial (HM), fibras densas externa (FDE) y pieza media (PM). 41225X.

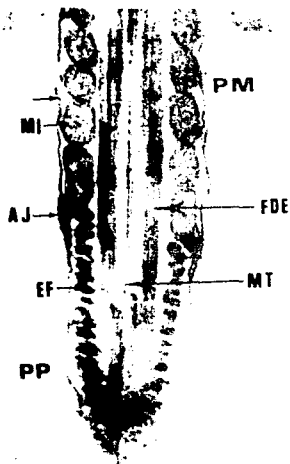


Fig. 29. ME/T. Corte longitudinal a nivel del anulus (Límite entre la pieza media y la pieza principal del flagelo) en donde se aprecia el anillo de Jensen en forma de coma invertida. Mitochondria (MI), anillo de Jensen (AJ), envoltura fibrosa (EF), pieza principal (PP), pieza media (PM), fibras densas externa (FDE) y microtúbulos del axonema (MT). 49280X.

Fig. 30. ME/T. Corte longitudinal de pieza principal mostrando los anillos de la envoltura fibrosa cortados transversalmente, envoltura fibrosa (EF), membrana plasmática (MP) y las fibras densas externas (FDE) que corren paralelas al complejo microtubular axial 84000X.

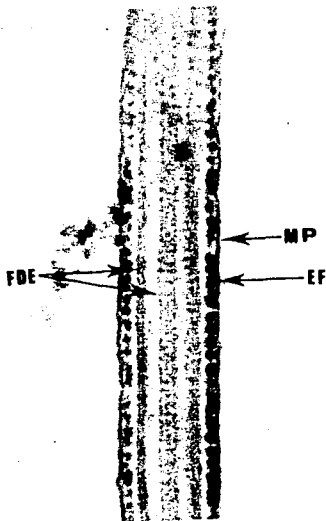
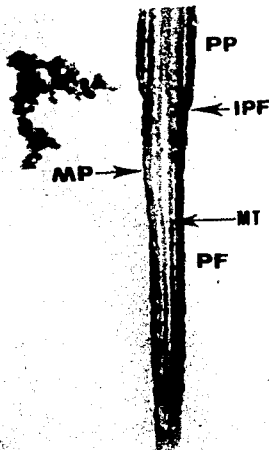


Fig. 31. ME/T. Corte longitudinal en la terminación de la pieza principal (PP) e inicio de la pieza final del flagelo (IPF) microtúbulos (MT) membrana plasmática y pieza final (PF). 42000X.



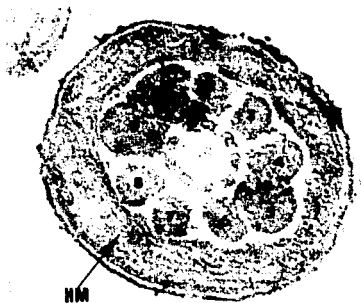


Fig. 32. ME/T. Corte transversal en la pieza media. Hélice mitocentral (HM), fibras densas externas (1 a 9). 78000X.



Fig. 33. ME/T. Corte transversal en la pieza media cerca del anillo de Jensen. Nótese que las FDE cambian de forma. 924000X.

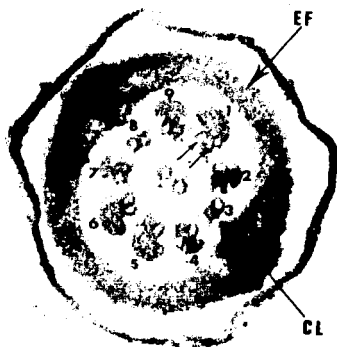


Fig. 34. ME/T. Corte transversal de la pieza principal. Nótese que las fibras densas externas (1 a 9) tercera y octava desaparecen para formar parte de las columnas longitudinales (CL), envoltura fibrosa (EF). 134000X.

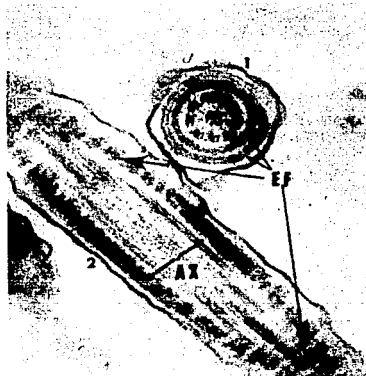


Fig. 35. ME/T. Corte transversal de pieza principal (1) en su terminación, obsérvese que las columnas longitudinales ya desaparecen y la envoltura fibrosa (EF) presenta su disposición de anillos concéntricos. Corte longitudinal de la pieza principal (2) en un nivel superior del flagelo dentro de la pieza principal; axonema (Ax). 52500X.

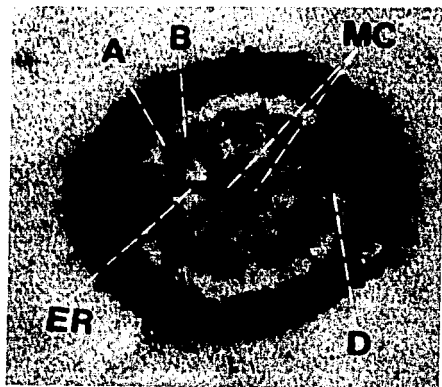


Fig. 36. ME/T. Corte transversal de pieza principal en donde se observa el axonema o sistema locomotor del flagelo: microtúbulo completo (A), microtúbulo en forma de "c" (B), par central de microtúbulos (MC), Enlace radial (ER) y brazo de dineína(D) EXTERIOR.

DISCUSION

A pesar que la morfología de los espermatozoides resisten a diversos factores fisicoquímicos cuando son obtenidos del líquido seminal el manejo requiere de mucho cuidado en los pasos preparativos de la técnica, primero porque en el líquido seminal existen factores que inactivan al fijador inicial y segundo porque deben de ser centrifugados durante el procesamiento. Para estudios ultraestructurales es sumamente importante cuidar la isotonicidad y PH de los medios utilizados así como la concentración de cationes divalentes utilizados para la preservación de estructuras nucleares

CABEZA:

La forma de la cabezas es relativamente constante para todo el eyaculado y para cada individuo. Se puede encontrar ciertas desviaciones de la configuración normal, las cual se estas uniformes se consideran como fisiológicas.

La morfología de la cabeza está determinada por los complejos de proteína del A.D.N. y cada especie presenta características propias. (7, 20, 22, 23, 26, 27, 28, 47, 48)

ACROSOMA

Es el único elemento citoplasmático presente en la cabeza del espermatozoide. El término fue originalmente aplicado por Lenhossek en 1898 al observar un gránulo dentro de una clara vácuola en el idiosoma de la espermátida. El acrosoma contiene numerosas enzimas hidrolíticas, estudios citoquímicos y ultraestructurales sobre el complejo de Golgi en el espermátida

demonstraron que es el acrosoma en formación del espermatozoide maduro (22, 23, 35, 51). Esta contribución formuló al concepto de que el acrosoma es un lisosoma especializado(2), a raíz del descubrimiento en la década de los 60' de los lisosomas por Cristian de Duve (21).

El acrosoma en su región frontal presentó un hinchamiento notable el cual fue llamado cuerpo apical por Blom & Brich Andersen (13, 14). En el presente estudio fue una característica constante y además se constató la presencia de una vesícula y vacuola acrosómica (Fig. 17). Así como también una estructura a manera de apéndice o falange formada por la membrana interna acrosomal en el ápice del núcleo proyectada dentro del cuerpo apical a la cual se le denominó perforatorium, siendo estas estructuras una característica de especie (37) (Fig. 18). La región principal del acrosoma es la de mayor amplitud y prácticamente no existen diferencias entre una especie y otra (4, 5, 6, 26, 30).

El segmento ecuatorial siendo la región más angosta del acrosoma, varía en longitud dependiendo la especie que se trate, no encontrándose significado funcional al respecto (25, 28, 30).

En el presente trabajo el contenido acrosomal apareció homogéneo y de menor densidad que el núcleo, sabemos que la densidad del acrosoma varía significativamente según el método de fijación empleado, en el material empleado se distinguieron zonas electrón densas y electrón lúcidas homogéneamente distribuidas. Sin embargo estudios de análisis bioquímicos, electroforéticos y técnicas de criofractura han demostrado claramente un ordenamiento específico del contenido enzimático del acrosoma (18, 21, 27, 36, 47, 51).

Durante la reacción acrosomal, son de particular interés la membrana interna acrosomal, perforatorium y el segmento ecuatorial, debido a que son las únicas estructuras que persisten antes de que penetre al óvulo el núcleo del espermatozoide, y aún se les observa en el espacio perivitelino (8, 12, 27, 30, 52, 57).

LAMINA Densa POSTACROSOMICA:

A esta envoltura se le ha dedicado un creciente interés debido a que durante la fertilización es aquí donde se realiza la adhesión y fusión de las membranas, tanto del óvulo como del espermatozoide (27, 34).

Hancock y Das postulan que esta capa se origina del manchete de la espermátida y que está formada por fibras ricas en sulfuro (38).

En el presente trabajo esta lámina se observó granulosa, ésta granularidad representa microtúbulos que han sido cortados transversalmente y se interconectan con la membrana plasmática a manera de una empalizada (23, 26, 41).

Esta envoltura posacrosómica se encuentra adherida a la base de la cabeza y progresivamente suelta hacia el anillo nuclear (27, 55). En la base de la cabeza, esta envoltura presenta un cinturón de naturaleza intramembranosa denominado anillo posterior (39, 41, 63) conformado por una hendidura formada por una triple fusión de membranas, las dos membranas nucleares y la lámina densa.

Fawcett sugiere que esta envoltura ayuda a mantener la integridad estructural de la cabeza del espermatozoide por mecanismos de enlace de membranas, esta hipótesis es apoyada por observaciones que indican que la membrana plasmática está fuertemente adherida a esta lámina (27).

Es también concebible que esta envoltura simplemente represente productos no específicos de condensación de sobrenadantes citoplasmáticos de la espermátida principalmente del manchette.

Por otra parte investigaciones realizadas por otros autores (27) muestran que esta estructura aparentemente no existe en todos los espermatozoides de mamífero. En el presente trabajo todos los nemaspermos estudiados presentaron esta lámina.

Reflexionando sobre la localización y extensión del cinturón basal se sugiere que es una banda de material que puede actuar como mecanismo de bloqueo de la continuidad citoplasmática entre la cabeza y el tallo. Este bloqueo puede ser usado en restricción de metabolitos empleados en procesos de motilidad de la región en donde ellos son utilizados. Alternativamente el cinturón basal soporta el movimiento a lo largo del plato basal para mantener la integridad de la unión de la cabeza y el cuello. (27, 30)

CUELLO

El cuello del espermatozoide de morueco se caracteriza por la ausencia de mitocondrias y la presencia de poros nucleares vistos en los remanentes nucleares.

Esta región del espermatozoide ha recibido menor atención que otras regiones, debido a su complejidad estructural y su variable apariencia en diferentes cortes obtenidos en diferentes planos.

Las columnas segmentadas que forman la pieza conectora presentan bandas cruzadas, estructuras consistentes en anchas bandas densas separadas por espacios de bandas claras. Las columnas segmentadas en ambos lados de la pieza conectora se funden cerca de la base de la cabeza para formar una fuerte estructura articular llamada capitulum que varía algo en número y configuración dependiendo de la especie de que se trate (31, 32). El centriolo proximal es paralelo al lado plano de la cabeza y está orientado en un ángulo de 45 grados con respecto al axonema del tallo.

Una de las columnas segmentadas se relaciona con la primera mitocondria orientada longitudinalmente al axonema, como todas las demás, pero ésta se caracteriza por ser la más larga y se estima que es ésta la que provee de energía para la iniciación de la onda del movimiento flagelar (31, 32).

La presencia de los remanentes de la membrana nuclear dentro del cuello es una característica de los espermatozoides de mamíferos (27). Esta membrana en forma de espiral es reincorporada dentro de las envolturas nucleares después de la fertilización cuando la cabeza del espermatozoide se ensancha para formar el pronúcleo masculino (23, 27, 71).

EL FLAGELO.

El flagelo del espermatozoide de morueco, no varía significativamente del resto de los espermatozoides de mamíferos, sus características morfológicas han sido ya descritas, haciendo notar que cada especie presenta

variaciones individuales principalmente en la morfología individual de las mitocondrias, así como también en las fibras densas externas, y por supuesto en la longitud de cada segmento del flagelo (1, 54, 67). Las mitocondrias proveen de la energía necesaria para el movimiento flagelar, siendo las fibras densas externas elementos tensibles accesorios del aparato locomotor o axonema.

En el presente estudio se observó que las mitocondrias que se enrollan al axonema en una triple y hasta cuádruple hélice como lo señaló Blom en el espermatozoide de toro (11).

La gota citoplásmica en el flagelo se presentó esporádicamente, aumentando de volumen el segmento en donde se localiza, presentando morfología propia (15, 19).

CONCLUSIONES

Se identificaron las estructuras reportadas en la literatura, y se resaltaron las estructuras características de esta especie, lo que indica que la técnica para la toma de la muestra y el procesamiento de la misma es el adecuado. Hacemos hincapié que el líquido seminal de ovino antes de fijarse debe lavarse con solución amortiguadora para dispersar a los espermatozoides, esto probablemente se debe a la enorme cantidad de espermatozoides en un reducido volumen de líquido seminal, condición que caracteriza a esta especie. La aplicación de peso durante la polimerización dio resultados satisfactorios por la gran incidencia de cortes longitudinales de espermatozoides, lo que permitió establecer que:

- *El acrosoma presentó de manera constante el cuerpo apical.*
- *La presencia del perforatorium como una proyección de la membrana interna acrosomal fue una característica constante en esta especie.*
- *El segmento ecuatorial siempre se observó como una elongación del acrosoma.*
- *El espacio subacrosomal se observó constantemente, la sustancia perinuclear se identificó con facilidad.*
- *La presencia de vacuolas nucleares se observaron pero no en forma constante.*
- *La membrana celular se observó separada y ondulante.*
- *Se estableció un método que permite el estudio ultraestructural de espermatozoides del morueco.*
- *La membrana nuclear se pudo identificar a nivel de cuello como remanentes nucleares y en algunos cortes afortunados dentro de la cabeza principalmente en la región posacrosomal.*

- *El plato basal se presentó como una línea completa que delimita la fosa de implantación.*
- *El semen del morueco presentó una gran homogeneidad en el grado de maduración de los espermatozoides.*
- *El núcleo de los espermatozoides son homogéneamente muy densos.*

LITERATURA CITADA.

- 1.- Afzelius, B. *Electron microscopy of the sperm tail.* Lbiophy. biochem. Cytol. 5:269-277. (1959)
- 2.- *Estructura y dinámica celular.* Alex. B. Novikoff and Eric Hotzman.: *Cells and organelles*, by Molt, Rinehart & Winston, inc (1970).
- 3.- Anberg, A. *The ultrastructure of the human spermatozoa.* Acta Obstet. Gynec. Scand. 36 Suppl. 2, 12-23. (1957)
- 4.- Austin, C.R., y M.W.H. Bishop. *Some features of the acrosoma and perforatorium in mammalian spermatozoa.* Proc. Roy. Soc. B. 148:234. (1968)
- 5.- Bane, A. y I. Nicander. *The structure and formation of the perforatorium in mammalian spermatozoa.* Int. J. Fertil. 8:865. (1963)
- 6.- Bedford, J.M., Cooper, G.W., and Calvin, H.I.: *Post-meiotic changes in the nucleos and membranes of mammalian spermatozoa.* *Proc. Int. Symp. In "The Genetics of the Spermatozoa"* 69-89 (1971).
- 7.- Bedford, J.M. *Fine structure of the sperm head in ejaculated and uterine spermatozoa of the rabbit.* J. Reprod. Fertil. 7:221-228 (1964)
- 8.- Bedford, J.M.: *An electron Microscopic study of sperm penetration into the rabbit egg after natural moating.:* Amer. J. Anat. 133-213, (1971).
- 9.- Bishop, M.W.W.H. y A. Walton. *Spermatogenesis and the structure of mammalian spermatozoa.* *Marshall's Physiology of Reproduction.* Edited by A.S. Parkes. Bol. I, tomo 2. Cap. 7, pp. 1-30 (1960).
- 10.- Blom, E. y A. Birch-Andersen. *Ultrastructure of the Bull Sperm. in The Middle Piece.* Nord. Vet. Med. 12:261-279. (1960)
- 11.- Blom, E. y A. Birch-Andersen. *Ultrastructure of the sterilizing knobbed sperm defect in the bull.* Nature. 194:989-990. (1962)

- 12.- Blom, E. *The galea capitis as part of the acrosome cap in the bull sperm.* Proc. 5 Int. Congr. Animal Reproduct. Trento 4:655-550. (1964)
- 13.- Blom, E. y A. Birch-Andersen. *The ultraestructure of bull sperm.* Nor. Vet. Med. 17:193-208 (1965).
- 14.- Bloom, G. y I. Nicander. *On the ultraestructure and development of the protoplasmic droplet of spermatozoa.* Z. Zellforschung, 55:833-844 (1916).
- 15.- Bretschneider, I.H.: Kon. Ned. Akad. van Wetenschappen 50: 75-181 (1974).
- 16.- Burgos, M.D. y D.W. Fawcett. *Studies on the fine structure of the mammalian testis.* J. Biophys. Biochem. Cytol. 1:287-289 (1955).
- 17.- Buongiorno-Nardelli, M., and B. Bertolini.: *Subcellular localization of some acid hydrolases in triturus cristatus spermatozoa.* Histochemie, 8: 34-44 (1967).
- 18.- Bustamante, C. G.: *Acción del Sulfoxido de dimetilo y glicerol como agentes crioprotectores del acrosoma del espermatozoide de carnero durante la congelación.: Tesis presentada para la obtención del grado de Maestro en Producción Animal.* Fac. de Med. Ve. Zoot. UNAM.(1980)
- 19.- Cecil, E.H.: *Microscopía Electrónica, Segunda Edición* Ediciones Urmo, España (1970).
- 20.- De Duve, C. *the Lysosome.* Sci. Amer., 208 (5) (1963)
- 21.- Edelman, G.M., and Millette, C.F.; *Molecular probes of spermatozoon structure.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 2436-2440. (1971).
- 22.- Fawcett, D.W., and Mollenberg, R.: *Changes in the acrosome of ginea pig spermatozoa during passage throughtout the epididymis.* Z. Zellforsch. 60,276-292 (1963).
- 23.- Fawcett, D.W., and Phillips D.M.: *Observation on the release of spermatozoa and on changes in the head during passage throught the apididymis.* J. Reprod. Fertil. Sspl. 6 405-418 (1969).

- 24.- Fawcett, D.W.: *A comparative view of sperm ultrastructure.* Biol. Reprod. (aUPPL) 2, 90-127. (1970)
- 25.- Fawcett, D.W., and Ito, S.: *Fine structure of bat spermatozoa.* Amer. J. Anat. 116, 567-610 (1965).
- 26.- Fawcett, D.M.: *The anatomy of the mammalian spermatozoon with particular reference to the ginea pig.* Zeitsch. F. Zellforsch. 67, 279-296 (1965).
- 27.- Fawcett, D.W.: *The Mammalian Spermatazoa.* Develop. Biol. 44: 349-436 (1975)
- 28.- Fawcett, D.W., Anderson, W., and Phillips, D.M.: *Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head.* Develop. Biol. 26, 220-251 (1971).
- 29.- Freudlich, M.: *Origin of the Electron Microscope.* Science 142: 185-188 (1963).
- 30.- Fawcett, D.W. *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 (1958).
- 31.- Fawcett, D.W. *Sperm tail structure in relation to the mammalian spermatozoa.* Int. Review Cyto. (1962).
- 32.- Fawcett, D.W. *Sperm tail structure in relation to the mechanism of movement.* Proc. Symp. Sperm. Mot. Am. Ass. Adv. Sci. 72:147-169. (1962 b).
- 33.- Fawcett, D.W. y D.R. Hellenberg. *Changes in the acrosome of Gyinea pig spermatzoa during passage throughtout the epididymis.* Z. Zellforsch 60: 276-292
- 34.- Fied. D.S. and Tawsett, D.W.: *Membrane differentiation in freeze-fracture mammalian sperm.* J. Cell Biol. 63,641-664 (1974)
- 35.- Goldfisher, S., A.B. Novikoff, E. Essner and B. Runling.: *Enzymatic staining studies in the Golgi Apparatus and relatetd lysosomes.* Prac. Amer. Soc. Cell Biol., p. 71 (1961)

- 36.- Gordon, M., and R.J. Barnett.: *Fine structural cytochemical localization of phosph activities of rat on ginea pig.* Exp. Cell Res., 48:395-412 (1967)
- 37.- Gunter, B. y D.E. Zeitler. *Study of bull spermatozoa.* J. Cell Biology 21: 175-189 (1964).
- 38.- Hancock and Das: *The postacrosomal region of man and macaca artoides.* J. Ultrastr. Res. 40, 366-377 (1972).
- 39.- Hancock, J.I. *the ultraestructure of mammalian spermatozoa* *Advances in reproduction* 1:125-124 (1965).
- 40.- Hayat, M.A.: *Principles and Techniques of Scanning Electron Microscopy.* Van Nostrand Reinhold Col. 1: 44-112 (1974).
- 41.- Healy, P.: *Efect of freazing on the ultraestructure of spermatozoana of some domestical animal.* J. Report. Fert. 18: 21-27 (1969).
- 42.- Hellstöm, B. *The ultramicrotome, basic principles and summarized description of construction, Science tools (LKB) 7, 10.* (1960).
- 43.- Holdergger, Ch. and Bechter, R.: *A reliable method for obtaining longitudinal sections of sperms for electron microscopy.* Experientia 34: 1386-1387 (1978).
- 44.- Jones, R.C.: *Preparation of Spermatozoa for Electron and light microscopy.* J. Reprod. Fert. 33: 145-149 (1973).
- 45.- Koehler, J.IK. *A freeze-etching study of rabbit spermatozoa with particular reference to head structures.* J. Ultrastructure Research 33, 598-614 (1970).
- 46.- Kojima, Y. *Electron microscopyc study of the bull spermatozoa.* J. Jap. J. Vet. Res. 10:71-74 (1962).
- 47.- Lota, H. and Hortmann, J.F. *Use ar a glass edge in thin sectioning for electron microsocopy,* *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 74, 436 (1950).
- 48.- Luft, J.K.: *Improvements in epoxy resin embedding methods* J. Biophys. Biochem. Cytol. 9: 409-415 (1961).

- 49.- Mann, T. *The biochemistry of semen and of the male reproductive tract*. Edited by Butler and Tanner Ltd. Great Britain. Primera ed. pp. 19-26 (1964).
- 50.- Mann, T. *Reproduction in Domestic Animals*. Edited by H.H. Cole and T.T. Cupps. Academic Press, New York, Vol. II. pp. 19-26 (1965).
- 51.- Millioning, J. *Advantages of a phosphate buffer for OsO₄ solution in fixation*. J. Appl. Thy. 32:1637 (1961).
- 52.- Nicander, I. *Development of the fibrous sheath of the tail*. Proc. Fifth Int. Congr. Electron Microscopy Pt. 4. (1962)
- 53.- Nicander, I. and Bane, A.: *The fine structure of boar spermatozoa*. Zeitschr. F. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 57, 390-475 (1962).
- 54.- Palade, G.E.: *Study of fixation for electron microscopy* J. Exp. Med. 95: 285-287 (1962)
- 55.- Pedersen, M.: *Further observations on the fine structure of the human spermatozoon*. Z. Zellforsch 123, 305-315, (1972).
- 56.- Porter, K.R. *Ultramicrotomy*, In: *Modern Developments in Electron Microscopy*, B.M. Siegel, ed. Academic Press, New York, p. 121 (1964).
- 57.- Rahlman, F.D. *Electron microscopic study of mature bovine spermatozoa*. J. Dairy Sci. 44:915-920 (1961).
- 58.- Randall, J.T. Friendlander.: *The Micro Structure of Ram Spermatozoa*. Exp. Cell. Res. 1: 1-436 (1950).
- 59.- Retzius, G.: Biologische Untersuchungen (1902).
- 60.- Reynold, E.S. *The use of lead citrate at high pH as electron opaque stain in electron microscopy*. J. Cell Biology 17: 208-212 (1963).
- 61.- Saacke, R.G. and J.D. Almquist. J.D. *Ultra-structure of bovine spermatozoa. I. The head of normal ejaculated sperm*. J. Dairy Sci. 115:143-161 (1964).

- 62.- Sabatini, D.A., Bensch, K., and Barnett, R.J.: *Cytochemistry and electron microscopy. The observation of cellular structure and enzymatic activity by aldehyde fixation.* J. Cell. Biol. **17-19** (1963).
- 63.- Salomon, S. and Visser, D.: *Recent advances in the deep freezing of ram semen.* S. Afr. J. sci. **4**: 275-288 (1974).
- 64.- Stefanini, M.; De Martino, C.; Zamboni, L. *Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy* Nature **216**: 173 (1967).
- 65.- Tasseron, F., A Mir, D. and Schindler, H.: *Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing.* J. Reprod. Fert. **51**: 461-462 (1977).
- 66.- Telkka, A.: D.W. Fawcetts and A.K. Christensen. A. K. *Further observations on the structure of the mammalian sperm tail.* Anat. Rec **141**: 231-236 (1961).
- 67.- Valencia, J., Mendoza, G., Barrón, C. y Fernández Vaca, S. *Manejo y reproducción de ovinos en la región de Ajusco, México* D.F. Vet. Mex. **9**: 85-90 (1980).
- 68.- Watson, M.I.: *Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals.* J. Biophys. Biochem. Cytol. **4**: 475-478 (1958 b).
- 69.- Watson, P.F. and Martin. I.C.A.: *A comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram and bull spermatozoa* J. Reprod. Fert. **28**: 99-101 (1972).
- 70.- Zamboni, I. and Stefanini, M.: *The fine structure of the neck of mammalian spermatozoa.* Anat. Rec. **169**: 155-172 (1971).
- 71.- Zambani, I., Zermiganis, R. and Stefanini, M.: *The fine structure of monkey and human spermatozoa.* Anat. Rec. **169** 129-154 (1971).