

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS  
QUE PARA OPTAR AL TITULO DE  
BIOLOGO  
PRESENTA  
ERNESTO RODRIGUEZ - AGUILERA

1969

2397



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.

A MIS PADRES  
CON GRATITUD INFINITA

A MIS HERMANOS

A MIS MAESTROS

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS.

Hago patente mi agradecimiento al Biólogo Horacio Merchant L. por la orientación y ayuda prestada para la realización del presente trabajo de tesis, y al M. en C. Jesús M. León Cázares, al Dr. Alfredo Laguarda F. y a la Dra. Ma. Elena Castillo R., por sus valiosos consejos en la corrección del manuscrito.

## INTRODUCCION

Muchos de los organismos que se reproducen sexualmente son el resultado de la multiplicación y diferenciación de las células formadas a partir del huevo fertilizado, el cual procede de la unión de una gameta masculina y una femenina. El origen y la formación de las gametas en el organismo adulto siempre ha llamado la atención y ha sido motivo de diversos estudios. Entre las primeras publicaciones encontramos las de Leeuwenhoek y su discípulo Hamm en 1673, quienes empleando su recién inventado microscopio observaron líquido seminal, al cual encontraron pululante de lo que ellos denominaron "animaliculus", que actualmente conocemos con el nombre de espermatozoides. Posteriormente en 1677, el mismo Leeuwenhoek observó la fecundación, es decir la unión de un óvulo y un espermatozoide. Con estos descubrimientos surgieron diversas teorías como la de la Preformación en 1694 de Hartsoker, apoyada por Swammerdan y Bonnet la cual enunciaba: "En el huevo existe todo el animal perfectamente formado y sólo necesita del estímulo del espermatozoide

para iniciar el crecimiento definitivo, ó bien que, los espermatozoides están constituidos por organismos preformados que solamente aumentan de tamaño dentro del óvulo".

En 1759-69 Wolff y von Baer, en base a las observaciones hechas en embriones de pollo pudieron demostrar que la región germinativa consiste, al principio, de "globulos" (células), los cuales gradualmente se organizan formando rudimentos que pueden identificarse con los diversos órganos del embrión; este desarrollo progresivo de lo simple a lo complejo mediante la utilización de unidades celulares, constituye la teoría de la Epigénesis. Más tarde, a fines del siglo XVIII se establece la teoría de la Pangénesis, apoyada por Lamarck y aceptada por Darwin, la cual dice que las células reproductoras están compuestas por partículas representativas segregadas por el somatoplasma. A esto contraponen Weismann (1883), quien propone la teoría del Plasma Germinal, y afirma que: "El plasma germinal se perpetúa a si mismo incidentalmente engendra la formación del resto del cuerpo".

Actualmente, se considera el desarrollo estrictamente preformativo en lo que se refiere a los genes, pero rigurosamente epigénico en cuanto a las actividades constructivas.



En todos los vertebrados las células sexuales se identifican precozmente en relación con el endodermo del saco vitelino, estas células sexuales primordiales emigran hasta su ubicación final en la gónada. Se han descrito en el intestino primitivo, en el mesodermo que lo rodea, en el torrente circulatorio y en el epitelio de la gónada en desarrollo. Para algunos investigadores, las células sexuales definitivas se originan de las primordiales por sucesivas mitosis, aunque para otros no hay relación directa entre éstas y las germinales definitivas. En lo que todos coinciden es en que las células germinativas se originan del epitelio de la gónada embrionaria, dirigiéndose por grupos desde el epitelio germinal hacia los tejidos más profundos de las gónadas, en donde dará principio la diferenciación que las transformará en óvulos ó espermatozoides, fenómenos conocidos con el nombre de ovogénesis y espermatogénesis, respectivamente.

De acuerdo con Conklin (1), la espermatogénesis es el proceso mediante el cual, células poco diferenciadas sufren una completa transformación, hasta llegar a convertirse en "la célula más altamente diferenciada de los metazoarios, el espermatozoide", gameta transportadora de la información genética paterna.

Este proceso particular ha sido abordado por diferentes autores, pero es hasta el siglo pasado en que en-

contramos reportes de estudios sobre ésto llevados a cabo por observadores tales como Meves, Mc. Gregor y --- Ballowits, quienes en 1890 empiezan a hacer estudios sobre la metamorfosis de las células germinales masculi--nas en varias especies de vertebrados, entre los que - aparecen estudios en anfibios urodelos, tan precisos y detallados que poco es lo que ha sido agregado a ello - desde entonces, (7) Sin embargo, hasta años recientes - se ha prestado una mayor atención a este proceso en anfibios anuros. Uno de los anuros más estudiados, desde diferentes puntos de vista, ha sido el sapo Bufo arena-rum Hensel, en él se ha investigado el control hipofi--siario de la función testicular (Houssay, 1954), la his--tología normal del testículo (Burgos y Mancini, 1948), - y los procesos mitóticos (Sáenz, Rojas y De Robertis, - 1936). Recientemente, encontramos trabajos sobre ul--traestructura como el de Burgos y Fawcett (7), sobre la diferenciación de las espermátidas observadas al micros--copio electrónico, y el de Burgos y Vitale-Calpe (8) sobre la relación célula de Sertoli-espermatozoide.

En el anfibio urodelo Ambystoma, existen pocos estudios llevados a cabo sobre espermatogénesis; el - primero lo encontramos en 1933, en él Carrick (9) repor--ta la estructura del testículo, el número cromosómico y la estruc ura y forma de división de las espermatogo

nias. Con relación a ésto, Noble y Brady (19), tratan sobre la disposición de los espermatozoides en el espermatóforo y Baker y Taylor (5), estudian el sistema urogenital de siete especies de Ambystoma, basándose en diversos estudios practicados en afibios por otros autores.

Con el objeto de obtener información adicional sobre el conocimiento de la espermatogénesis en Ambystoma mexicanum, se desarrolló el presente trabajo de tesis con la ayuda del microscopio electrónico, haciendo hincapié en la espermiogénesis, en cuyo estudio dicho instrumento ha probado ser de un valor considerable. Sin embargo, fueron indispensables estudios con el microscopio de luz para la observación de los resultados obtenidos con técnicas citoquímicas.



M A T E R I A L   Y   M E T O D O S

Para llevar a cabo este estudio se recolectaron ejemplares adultos de Ambystoma mexicanum (axolote) en el Lago de Xochimilco, México. Se descerebraron y se les extrajeron los testículos, una vez obtenidos éstos, se tomó un pequeño fragmento de ellos y se depositaron en dos soluciones fijadoras diferentes, a saber: Glutaraldehído al 4% y tetróxido de osmio ( $OsO_4$ ) al 1% y 2%, ambos en buffer de fosfatos según la fórmula de Millioning (15), para de ahí, reducirlos a fragmentos más pequeños, rebanándolos con una navaja de rasurar bien afilada sobre un vidrio despulido, con el fin de evitar en lo posible la alteración mecánica de los tejidos; esto se llevó a cabo pasando los fragmentos a una segunda y tercera gota de fijador, con el fin de ir lavando el tejido de grasa y eritrocitos así como de enzimas, ya que las primeras neutralizan mucho fijador y las últimas pueden ocasionar autólisis. El tiempo total de fijación fue de:

- a) Glutaraldehído: 1 hora +  $OsO_4$ : 1 hora (24).
- b)  $OsO_4$ : 1 hora (15).

ambos fijadores en buffer de fosfatos, y manteniendo el tejido en refrigeración durante el tiempo de fijación.

Después de la fijación se pasaron al buffer por 24 horas. Se lavaron en alcohol etílico al 70% y se deshidrataron en concentraciones progresivas de alcohol etílico al 70, 80 y 95%, permaneciendo 5 minutos en cada paso; luego se hicieron tres cambios en alcohol etílico absoluto con duración de 20 minutos cada uno. Posteriormente, se pasaron a dos baños de óxido de propileno de 30 minutos cada uno. Finalmente se colocaron los cortes en una solución 1:1 de óxido de propileno-Epon (mezcla final) en un vidrio de reloj descubierto, para permitir la evaporación del óxido de propileno, en la cual permanecieron poco más de 12 horas. La inclusión se llevó a cabo colocando los fragmentos en el fondo de cápsulas de gelatina con la mezcla de Epon 812 (14). Para polimerización, se dejaron las cápsulas en la estufa a 58° C, -- aproximadamente, 12 horas (14). Una vez obtenida la polimerización, se talló cada cápsula por la parte redondeada, dándole la forma de una pirámide truncada, quedando por tanto en la base menor el tejido por analizar.

Los cortes se hicieron en un ultramicrotomo LKB con cuchillas de vidrio. Para la observación al micros-

copio electrónico se utilizaron cortes de tono dorado y plateado (13), que se recogieron en rejillas de cobre de 200 mallas, unas recubiertas con una película de formvar y otras sin ella.

Para aumentar el contraste se utilizaron soluciones de acetato de uranilo según técnica de Watson (27), y citrato de plomo según técnica de Reynolds (23).

Las observaciones se hicieron en un microscopio electrónico Akashi, con una apertura en la lente objetivo de 100  $\mu$  y aumentos directos de 1,500 a 10,000 diámetros. Las micrografías electrónicas se imprimieron en películas Ilford de 130 ASA, de 35 mm. Otras observaciones se realizaron en un microscopio electrónico Zeiss modelo EM-9, imprimiendo las micrografías electrónicas en placas Geavert, con aumentos directos de 1,800 y 7,000 diámetros.

Para observaciones con el microscopio de luz se siguieron los siguientes procesos:

- a) Testículos enteros fijados en formol al 10% y en líquido de Zenker, se incluyeron en parafina según las técnicas clásicas, para observaciones al microscopio de luz, y para efectuar en ellos la reacción de Feulgen.

b) Se obtuvieron espermatozoides maduros del conducto de Wolff, anudando cada uno de los extremos de este conducto y vertiendo su contenido a una solución Ringer, para hacer observaciones "in vivo". Además, se hicieron frotis a partir de esta solución, los cuales se tiñeron con azul de toluidina al 1% en una solución de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 2%. En algunos frotis se practicó la reacción de Feulgen para detectar la porción constituida por ácidos nucleicos, y en otros se llevó a cabo esta tinción más la de verde luz, para teñir también la porción no constituida por ácidos nucleicos y, así, poder observar el espermatozoide completo. Otros fueron tratados con naranja de acridina con el mismo fin, y en algunos más se llevó a cabo la tinción con mercurio-azul de bromofenol (16) para teñir específicamente proteínas.

La solución Ringer empleada se preparó al 10% a partir de una solución concentrada, preparada mezclando 6.6 g de cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ) con 0.015 g de cloruro de potasio ( $\text{KCl}$ ) y 0.015 g de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}$ ), añadiendo esto a un litro con agua destilada y ajustando el pH a 7.8.



## RESULTADOS

El sujeto en estudio, Ambystoma mexicanum, taxonómicamente pertenece a la Clase Amphibia, Orden Urodela, Familia Ambystomidae.

En cuanto al nombre genérico, Gallien (12) indica que debido a ser el ajolote mexicano una larva neoténica, el género debe denominarse Siredon (Ambystoma) mexicanum; sin embargo seguiremos refiriéndonos a él como Ambystoma mexicanum por no estar aún debidamente reconocido este sinónimo.

El macho de esta especie lo encontramos en una muy baja proporción en relación con la hembra, es posible reconocerlo en estado adulto gracias a que presenta un ligero abultamiento externo en la región cloacal.

Practicando la disección, encontramos los testículos recubiertos por una capa de material graso y situados a ambos lados de la línea media por dentro del sitio que ocupan los largos pulmones; los testículos son largos y lobulados, compactos, de no mas de tres cm. de longitud y en número de dos, como en los géneros estudiados por Baker y Taylor (5), a diferencia de otros urodelos que los presentan múltiples (Francis, 1934 Humprey, 1922) (Fig.1); la superficie de los testículos en esta especie no es pigmentada.

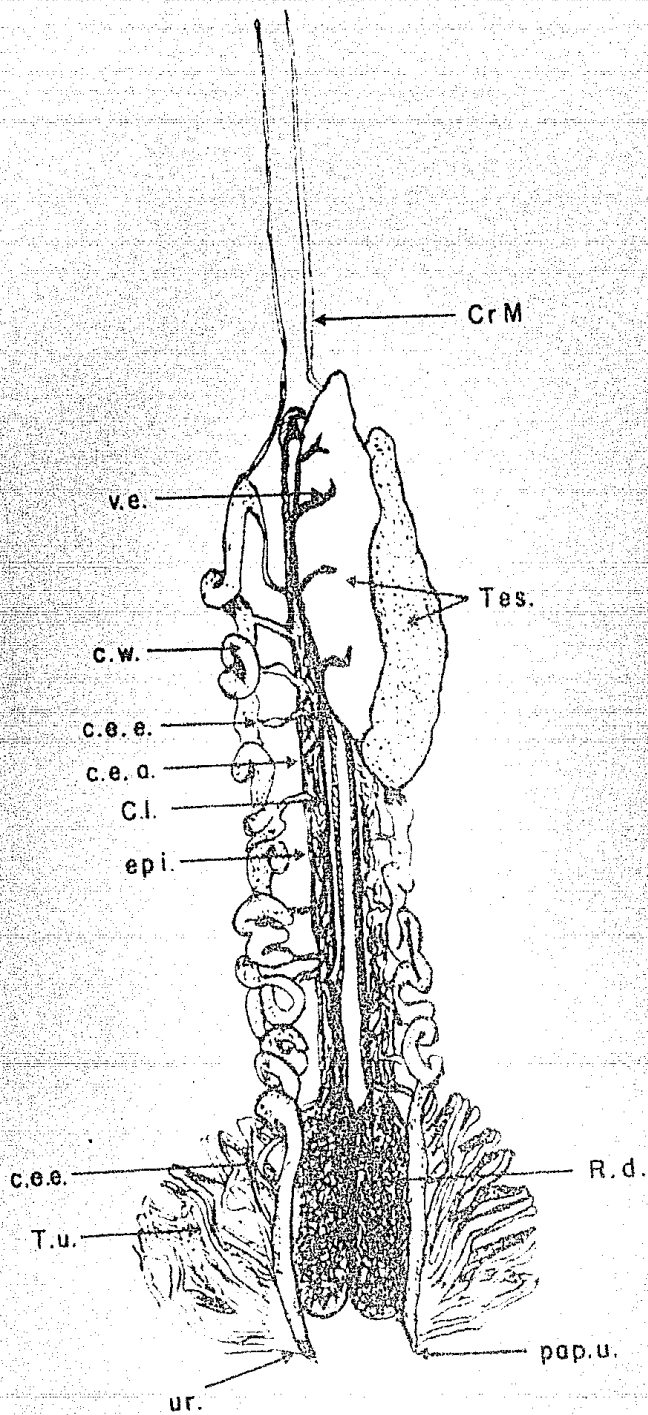


Fig. 1. Disposición del Sistema Genital en Ambystoma mexicanum ♂. (Terminología tomada de Baker y Taylor). CrM: Conducto rudimentario de Müller. v. e.: vasos eferentes. tes: testículos. c.w.: conducto de Wolff. c.e.e.: conducto epididimal eferente. c.l.: Canal longitudinal (cardinal). epi: epididimo. R.d.: Riñón definitivo. T.u.: túbulos urinarios. ur. ureter pap. u.: papila genital.

## ESTUDIOS CON EL MICROSCOPIO DE LUZ.

Los espermatozoides observados "in vivo", en solución Ringer y al microscopio de contraste de fases, tienen una morfología acicular, presentándose casi todos curvados sobre sí mismos, sobre todo en la parte final del extremo posterior (fig. 2); unos se encuentran agrupados, en tanto que la mayoría se mueven independientes en el medio; su aspecto es de espira y su movimiento se efectúa en forma helicoidal a manera de tirabuzón, lo que se lleva a cabo gracias al impulso conferido por la membrana ondulatoria que presentan en su porción caudal (fig. 2 C). Esta membrana, cuando el movimiento es activo, no se vé, debido a la alta velocidad que desarrolla, pero conforme se va de secando la solución, y por tanto aumentando la concentración, el movimiento se va atenuando y es posible apreciarlo. Además, "in vivo", la gran mayoría presenta una esférula (E) hacia la porción anterior (PA), en el interior de la cual se puede ver un activo movimiento browniano; esta esférula se pierde posteriormente, conforme el espermatozoide disminuye en actividad.

Desgraciadamente, nuestras observaciones efectuadas sobre material incluido en parafina y teñido con las técnicas habituales, nos proporcionaron muy pobre información respecto a la estructura de los espermatozoides, debi

do fundamentalmente a su gran longitud y al hecho de encontrarse éstos en manojos demasiado compactos.

En los frotis teñidos con azul de metileno (fig.3), se aprecia mejor su estructura, así, se pudo observar que el espermatozoide maduro consta de las siguientes partes: una porción nuclear (N), una porción infranuclear (PI) y una larga porción caudal (C) que termina en un flagelo libre (L).

Algunos espermatozoides fueron medidos; la variación entre su longitud total y la de sus partes no es significativa; en promedio presentan una longitud total de  $40.53 \mu$ , correspondiendo  $10.874 \mu$  a la porción nuclear,  $1.10 \mu$  a la porción infranuclear y  $28.556 \mu$  a la porción caudal.

El núcleo, que es muy alargado, se va adelgazando hacia su porción anterior, en donde no ha sido posible definir un acrosoma, ni ninguna otra estructura además de su estrecho filamento.

La porción infranuclear se advierte con esta tinción sólo como un segmento de diferente refringencia en la porción basal del núcleo, midiendo aproximadamente, un décimo de su longitud total (fig. 3 PI).

La porción caudal esta constituida por un largo eje que se dirige hacia atrás acompañado en todo su trayecto de una membrana ondulante.

## ESTUDIOS CITOQUIMICOS.

Los frotis tratados con la reacción de Feulgen, presentan el aspecto que se aprecia en la fig. 4, en ellos claramente se puede ver que el núcleo en toda su longitud, incluso el estrecho filamento anterior, está constituido por material Feulgen positivo (N).

La porción infranuclear que sólo se observaba con refringencia diferente a la del núcleo con azul de metileno, se aprecia como constituida por material Feulgen negativo (PI). La porción caudal se puede seguir en toda su longitud; sin embargo, tampoco se tiñó (C).

Con naranja de acridina se observa el núcleo teñido de distinto color que el resto del espermatozoide, lo que comprueba lo observado con la reacción de Feulgen.

Finalmente en los frotis tratados con mercurio-azul de bromofenol, tinción específica para proteínas, se tiñó perfectamente la porción infranuclear (la cual es ahora claramente distinguible; fig. 5 PI), así como la porción caudal (C) con la membrana ondulante (MO).

Con esta tinción, observamos también que el núcleo se halla rodeado por citoplasma (identificado al microscopio electrónico como rico en material membranoso) en toda su longitud (fig. 5 MM).

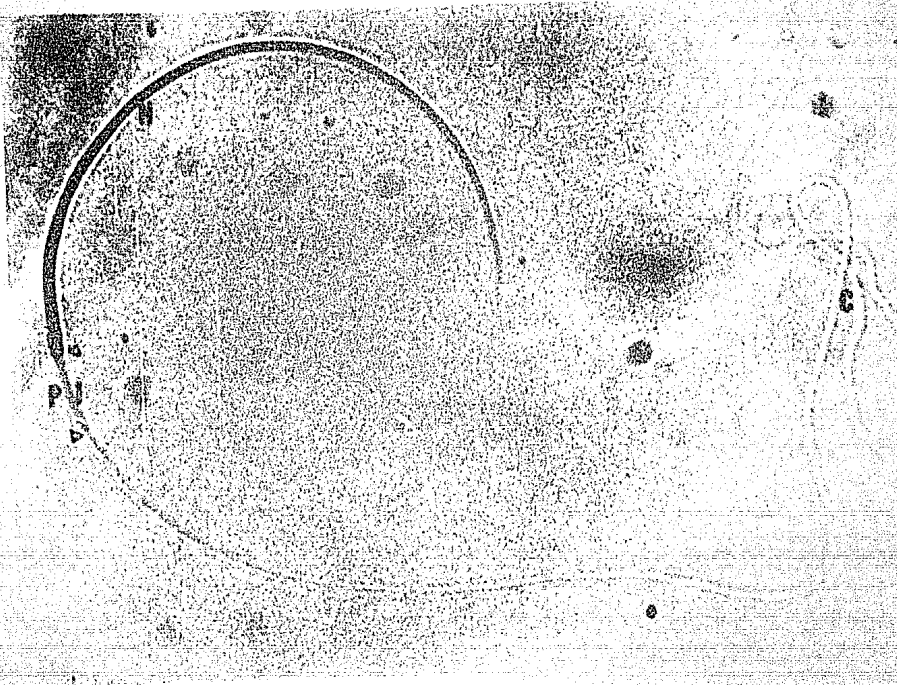


Fig. 4. Reacción de Feulgen, 1000 X.  
 N: Núcleo, (intensamente teñido). PI: Porción  
 infranuclear, (entre fechas). C: Porción  
 caudal.

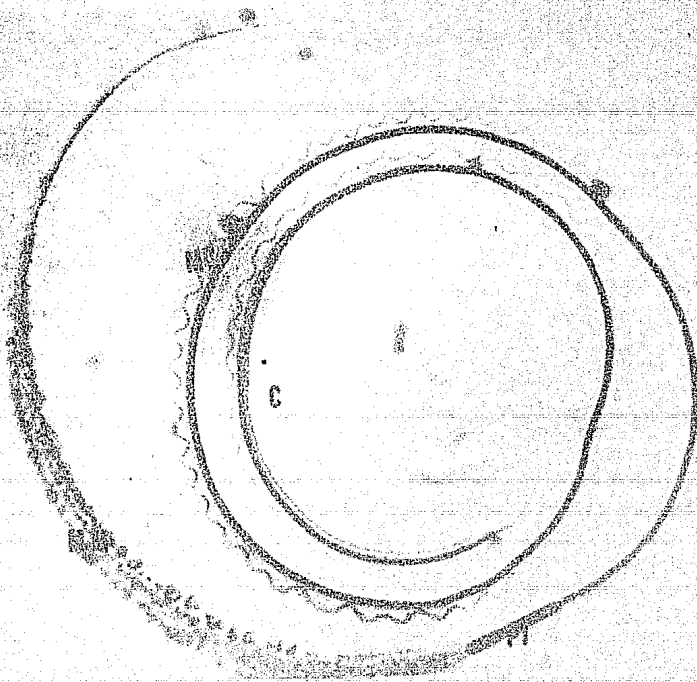


Fig. 5. Reacción azul de bromofenol, 1000 X.  
 I: Membrana membranosa (envolviendo al núcleo)  
 y porción infranuclear. II: Porción caudal,  
 que incluye el aparato Golgi.

## ESTUDIOS CON EL MICROSCOPIO ELECTRONICO.

Las observaciones realizadas al microscopio electrónico podemos resumirlas en dos aspectos:

- a) Estudio de la metamorfosis nuclear y estructuras anteriores.
- b) Estudio de la morfología de la porción posterior.

Los cambios en el núcleo constituyen una de las características más importantes de estas células, las cuales tienen la necesidad de retener la cantidad indispensable de cromatina en un reducido volumen, lo cual les permite poseer una forma estrecha y alargada que les facilite el desplazamiento con un gasto mínimo de energía.

La espermatida es una célula de gran tamaño en relación con el espermatozoide, esférica, con núcleo voluminoso (el cual ocupa la mayor parte del contenido celular fig. 6 N) en él la cromatina se halla condensada hacia la membrana nuclear (MN), presentando un aspecto microfibrilar. Conforme avanza la maduración se observan en la parte central del núcleo grumos fuertemente electrodensos, en un principio disgregados, pero que se van comprimiendo conforme el núcleo se va alargando (fig. 7 y 8), siendo su densidad, por tanto, cada vez mayor.



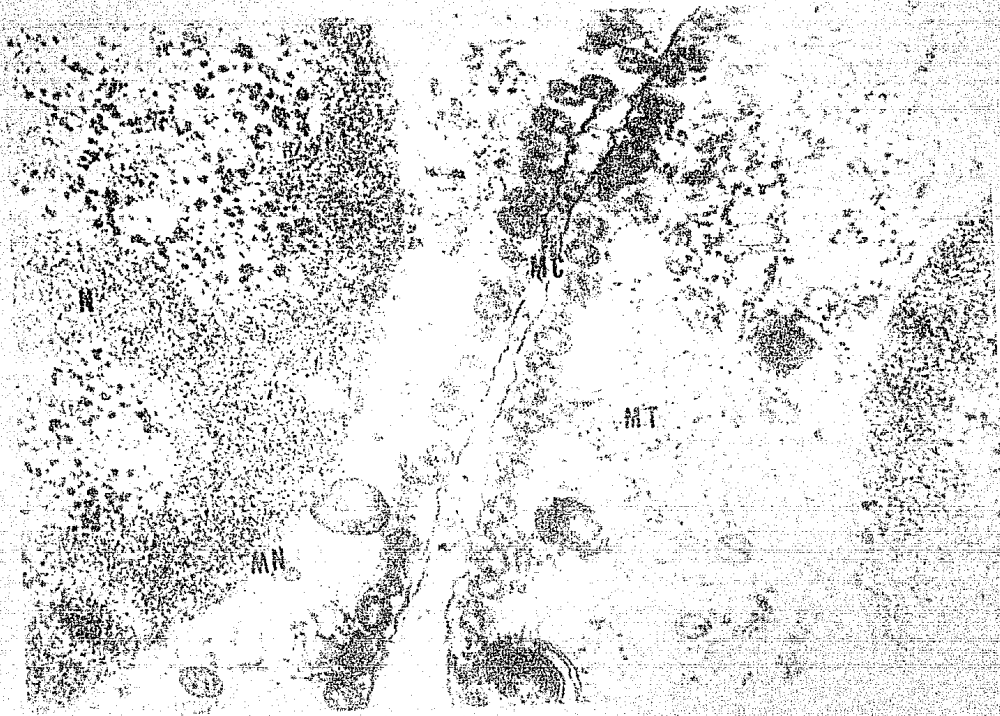
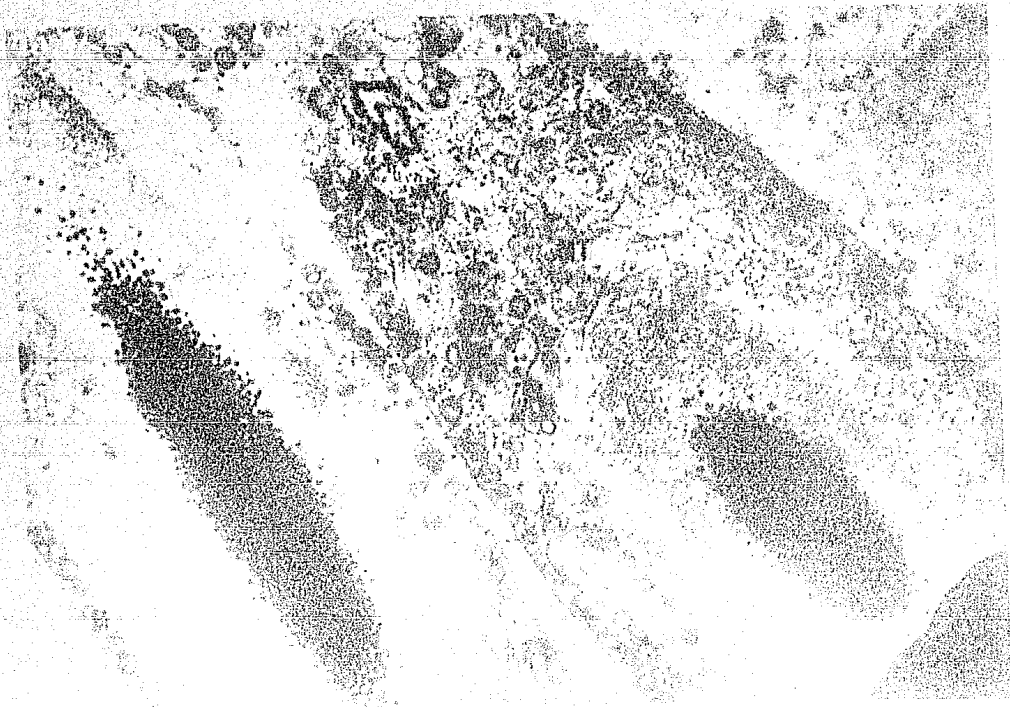


Fig. 6. Separatidas. 20,000x.  
 N: Material nuclear.  
 D: Desmosomas.  
 M: Mitocóndrias.

MG: Membrana nuclear.  
 MT: Microtubulos.  
 MC: Membrana celular.



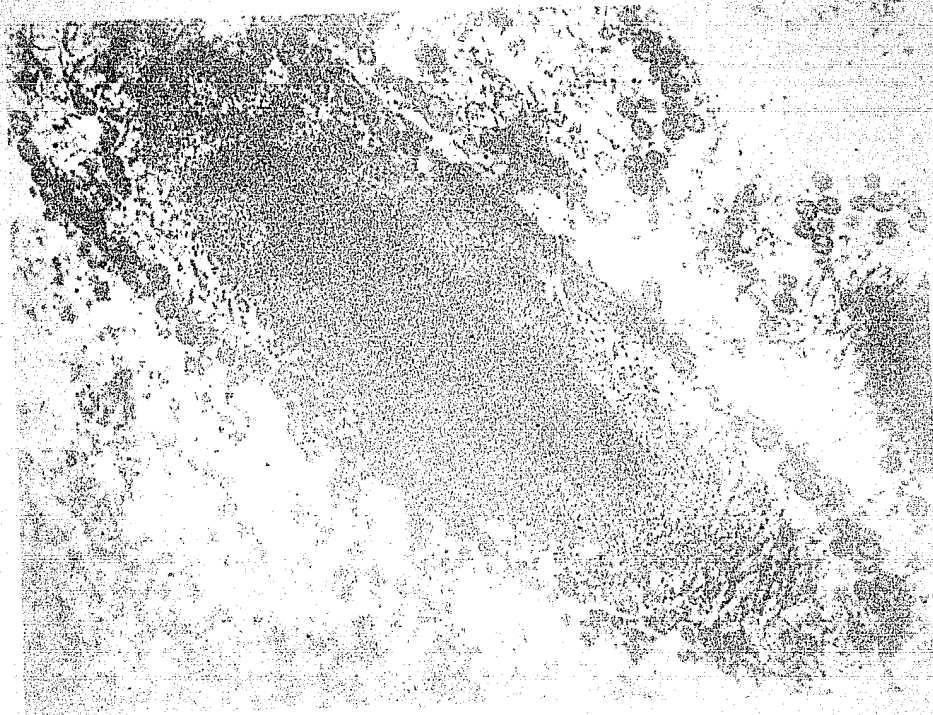
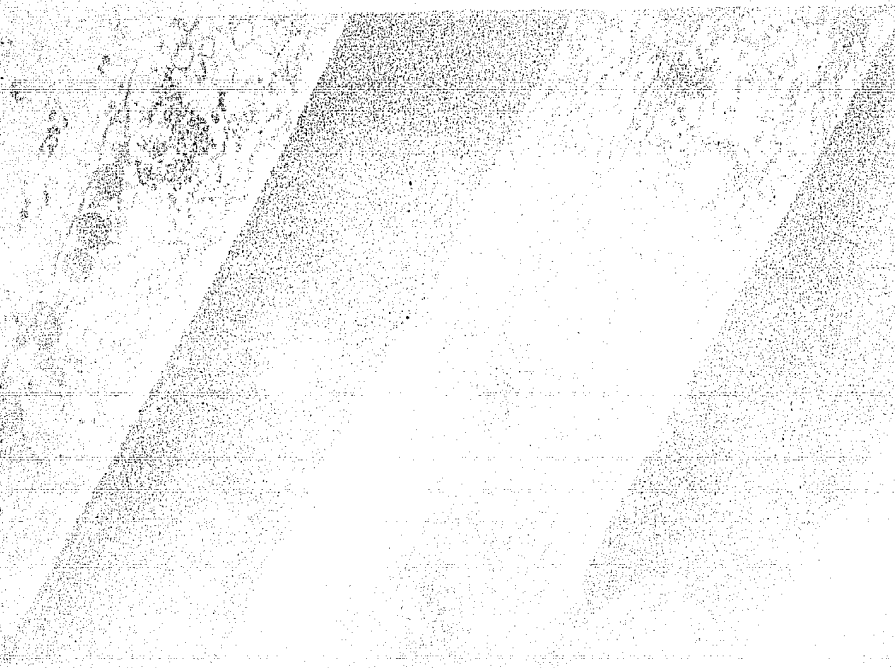


Fig. 7. Zarcocantocido (3031). Se muestra parte de la porción nuclear (N), y el principio de la porción infranuclear (PI). (12,000 X)



El núcleo continúa elongándose, condensándose y perdiendo material citoplásmico, como lo podemos apreciar en un corte longitudinal (fig. 9), en el cual vemos en su porción basal una zona ya observada con el microscopio de luz (fig. 5), identificada como porción infranuclear; ésta aparece aquí como una zona de menor densidad a los electrones que la zona nuclear Feulgen positiva (fig. 9 N); la última envuelve a la primera en toda su longitud a manera de una delgada capa, la cual se interrumpe hacia la porción basal, en donde aparentemente existe cierta continuidad entre la porción infranuclear y el "complejo basal" (fig. 10 CB). A partir de dicho complejo se inicia la porción caudal (C). Después de la lámina de mayor densidad electrónica, encontramos un espacio de muy baja densidad que delimita al material de aspecto fibrilar que integra a la porción infranuclear (figs. 8, 9 y 10 PI).

La región anterior (fig. 10), formada por la porción nuclear (N), la infranuclear (PI) y el complejo basal (CB), permanece envuelta por material citoplásmico rico en sistemas de membrana, mitocondrias (M), dictiosomas (D) y microtúbulos, sin embargo, estas estructuras citoplásmicas tienden a perderse hacia la madurez del espermatozoide adulto, que en esta región conserva únicamente una pequeña



Fig. 10. Sección longitudinal de un espermatozoido en etapa de maduración. Se ve la parte de la porción nuclear (N), la porción infranuclear (BI), y la porción basal (BA) del eje. Parte de la porción anterior (A).

cantidad de citoplasma con algunos sistemas de membrana; ésto se puede apreciar en una serie de cortes transversales realizados a distintos niveles (fig. 11 a, b, c y d)

En la parte terminal de la porción infranuclear se encuentra el "complejo basal" (fig. 10 CB) que se inicia por una estructura infundibuliforme cuyo ápice converge hacia la porción infranuclear; en él se encuentra el centriolo, del que parte el flagelo que se prolonga en toda la porción caudal (fig. 10, 11e y 12); el borde opuesto de la estructura mencionada se haya engrosado, de manera que en un corte transversal, se aprecia como un óvalo cuyo borde interno posee membrana celular, de esta parte hacia afuera un complejo sistema microfibrilar de densidad moderada (fig. 11e).

Hacia la parte caudal de la estructura mencionada, encontramos un ovillo de mayor densidad, cuyo eje mayor está situado perpendicularmente con respecto al eje mayor de la estructura infundibuliforme, de manera que en cortes longitudinales del espermatozoide, puede apreciarse unas veces más cercano al centro (fig. 13) y otras más alejado, según el plano del corte (fig. 10).

Después del ápice de la estructura infundibuliforme y dispuesto en el centro de ella, encontramos un patrón



Fig. 11. Secciones transversales de un espermatozoide a diferentes niveles. a) Porción nuclear; b) Al fin de porción nuclear y principio de la infranuclear. c) y d) En la porción infranuclear (se aprecia la zona clara envolviéndola, la que a su vez es envuelta por una capa de material nuclear). e) Porción engrosada de la pieza infundibuliforme del complejo basal. Delimitándola por dentro se encuentra una membrana citoplásmica (flecha) y en el centro se ve el patrón ciliar y la varilla axial.

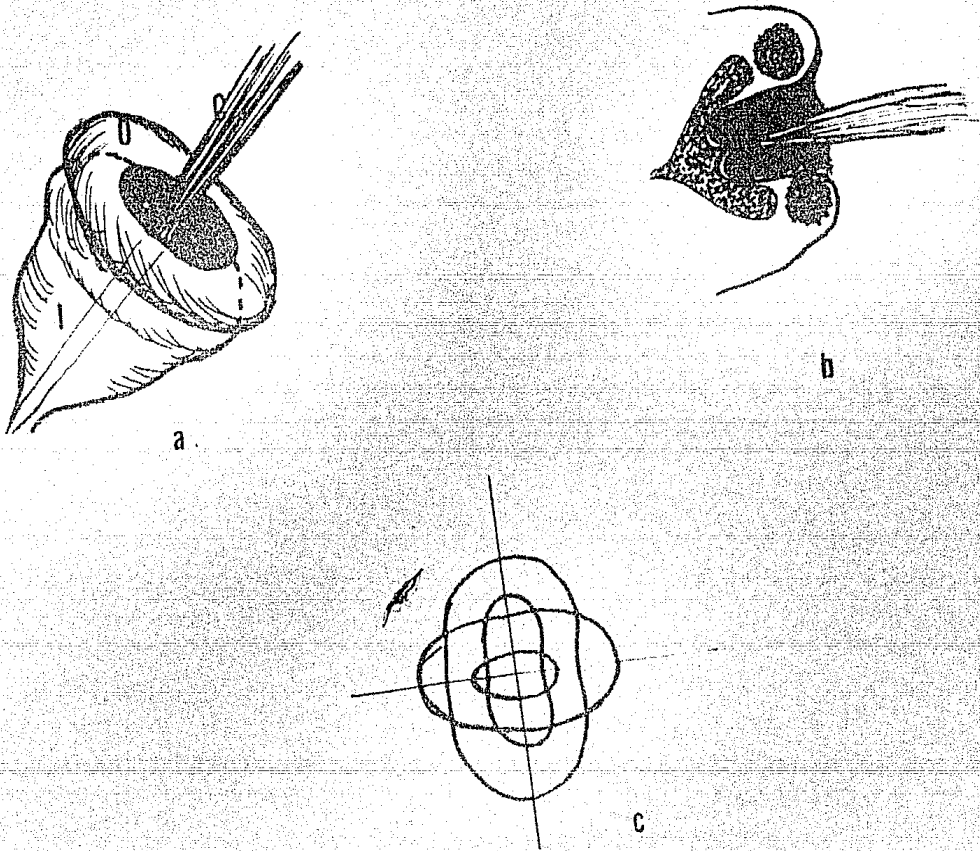


Fig.12. Complejo basal. a) Esquema tridimensional (tomado de Fig. 10, CB; Fig. 11 c y 13). I: Porción infundibuliforme; O: Ovillo; C: Porción caudal. b) Esquema en corte transversal (Tomado de Fig. 10, CB). c) Esquema para indicar que la porción infundibuliforme y el ovillo, de frente presentan la forma de óvalos perpendiculares.

8

ciliar en cuya porción ventral aparece una estructura fuertemente electrodensa que denominaremos "varilla axial"; rodeando a ambos se encuentra la membrana celular, como puede apreciarse en la fig. 11e.

#### MORFOLOGIA DE LA PORCION CAUDAL.

Esta porción la dividiremos en:

- a) Porción Intercalar.
- b) Porción Subterminal.
- c) Porción Terminal.

a) Porción Intercalar. Está formada fundamentalmente por tres partes: una porción citoplásmica, en la que se disponen ventralmente mitocondrias (M) bordeando la membrana celular y que en cortes transversales presentan aspecto de abanico; una membrana ondulante (MO) que forma el mango del abanico y un patrón ciliar (PC) que en el extremo dorsal lleva una estructura triangular de elevada densidad (RD). Entre las mitocondrias y la membrana ondulante, formando un eje que corre a todo lo largo de esta porción, encontramos la varilla axial (VA) mencionada anteriormente, la cual en esta región tiene una forma de "U" cuyos brazos se abren dorsalmente (figs.14 y 15).



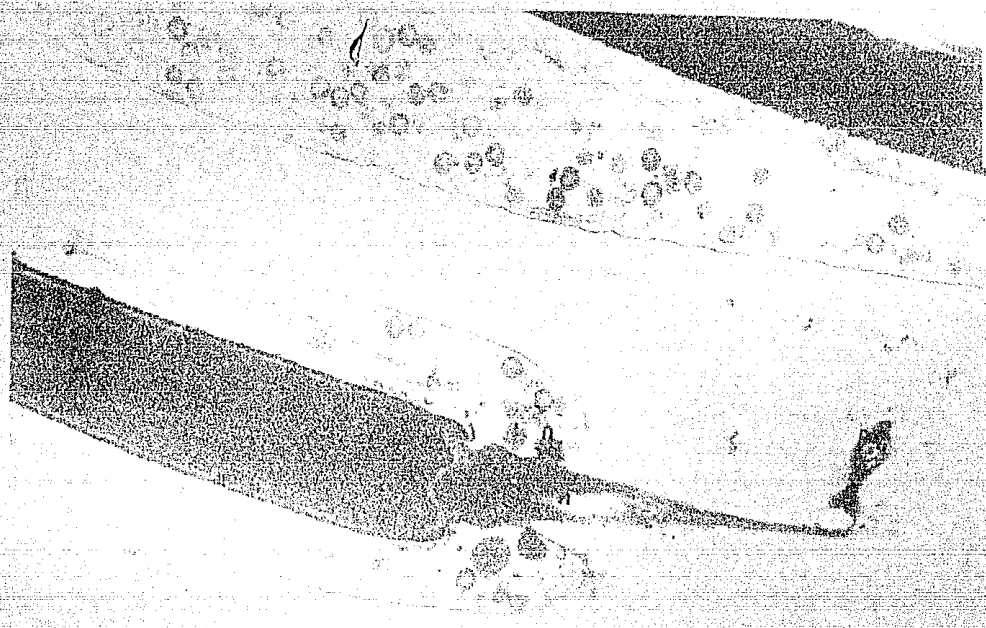


Fig. 13. Espermatozoid. Sección longitudinal. Vm: Verrón Intranuclear. VA: Varilla axial. CC: Círculo centromerico. B: Bases de los microtúbulos y O: Ovillo del complejo.

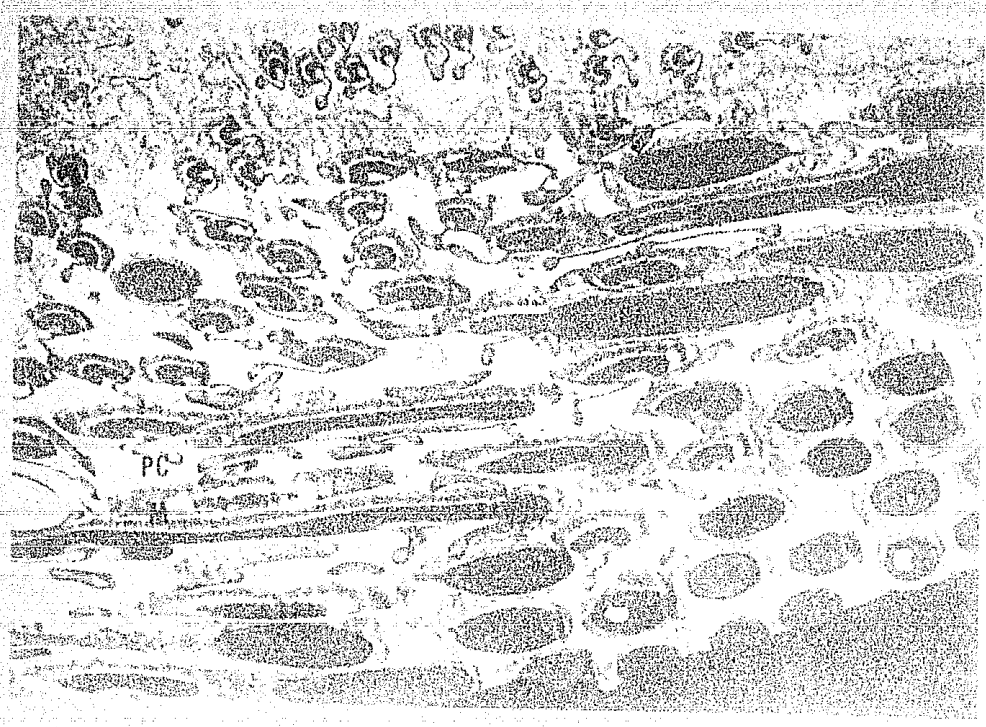




Fig. 15. Secciones transversales: N: Nucleo, MA: Matilla axial, MO: Membrana ondulante, PC: Patrón ciliar.



Fig. 16. Sección transversal. Porción Subterminal  
 MA: Matilla axial PC: Patrón ciliar. M: Membrana  
 ondulante.

b) Porción Subterminal. Ocupa aproximadamente una tercera parte de la longitud total del espermatozoide, a todo lo largo de la cual aparecen diferencias apreciables en la morfología, tales diferencias son debidas fundamentalmente a las variaciones en el aspecto de la varilla axial, y a la distancia que con respecto a ésta se encuentra el patrón ciliar, es decir, al grosor de la membrana ondulante.

Así, inmediatamente después de la porción intercalar, en cortes transversales se observa la misma morfología, pero se pierden las mitocondrias (fig. 16). Posteriormente la varilla axial cambia radicalmente su aspecto, de manera que aparece como una estructura tridentada, resultado de una inversión en la dirección de los brazos de la "U" y una prolongación de su parte central (fig. 17). El grosor de la membrana ondulante se mantiene constante hasta cierta distancia, pero posteriormente tiende a disminuir, de manera que hacia la parte posterior, se une completamente el flagelo con la varilla axial; dicha varilla tiende a acortar sus brazos (fig. 18) a tal punto, que se pierden completamente, quedando sólo la parte central. Así mismo, la parte central se va acortando hasta volver a tomar la apariencia

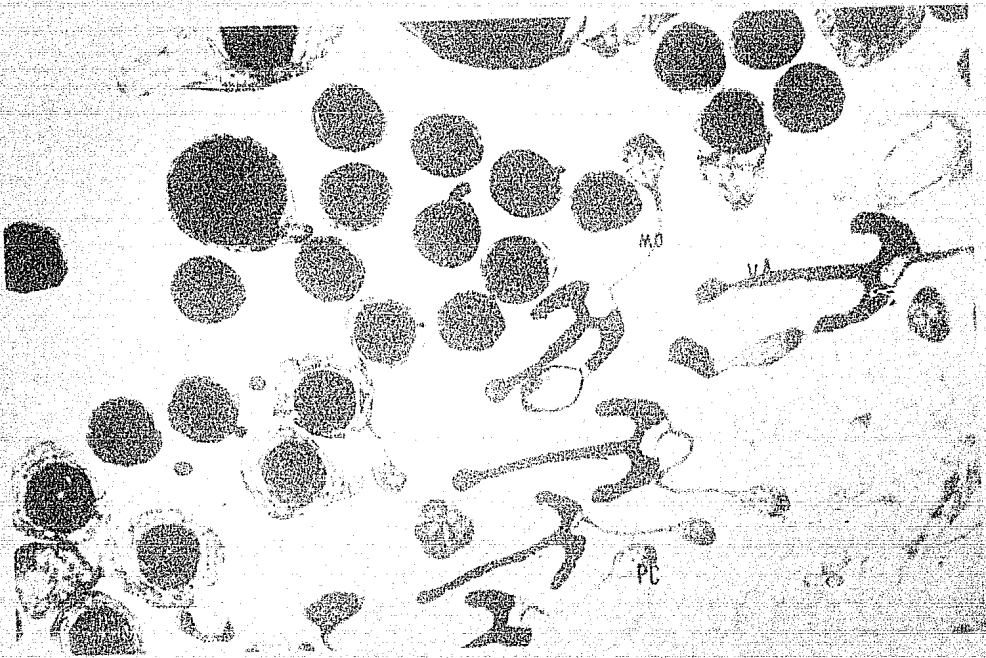


Fig. 18. Embrión transversal. Función embrionaria (Stages  
 diferenciadas)  
 VA: Vascularización, MO: Mesodermos, PC: Endodermos.

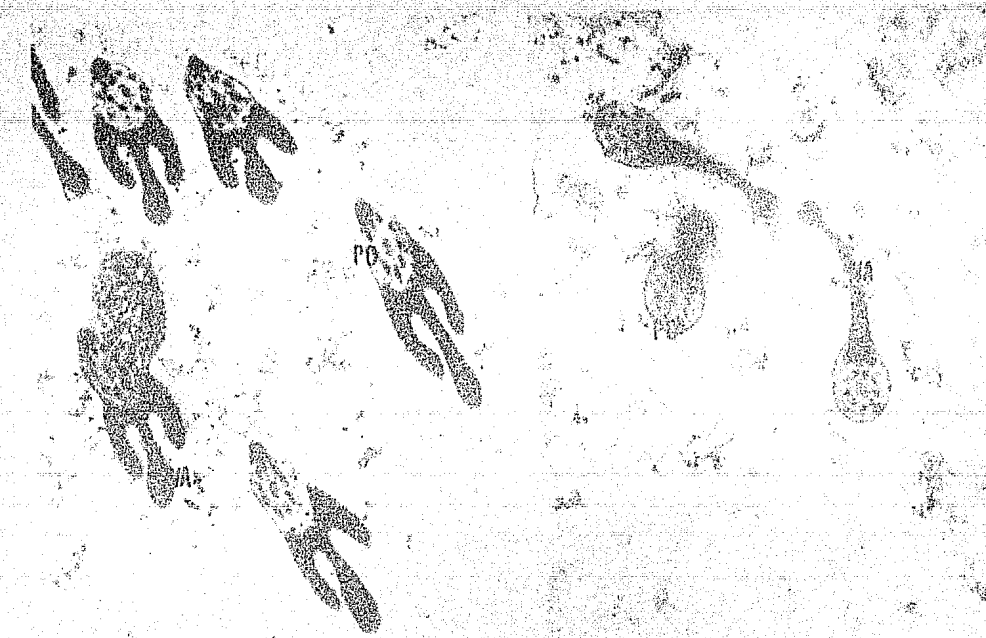


Fig. 19. Función embrionaria diferenciada (Stages  
 diferenciadas). PC: Vascularización, VA: Vascularización.

cia de "U" que presentaba en la porción intercalar; la única diferencia que existe entre ambas es la ausencia de la membrana ondulante, lo cual ubica al patrón ciliar directamente en contacto con la varilla axial (figs. 19 y 20).

c) Porción Terminal. Esta porción está formada por la prolongación del flagelo desprovisto de las demás estructuras mencionadas (fig. 21).

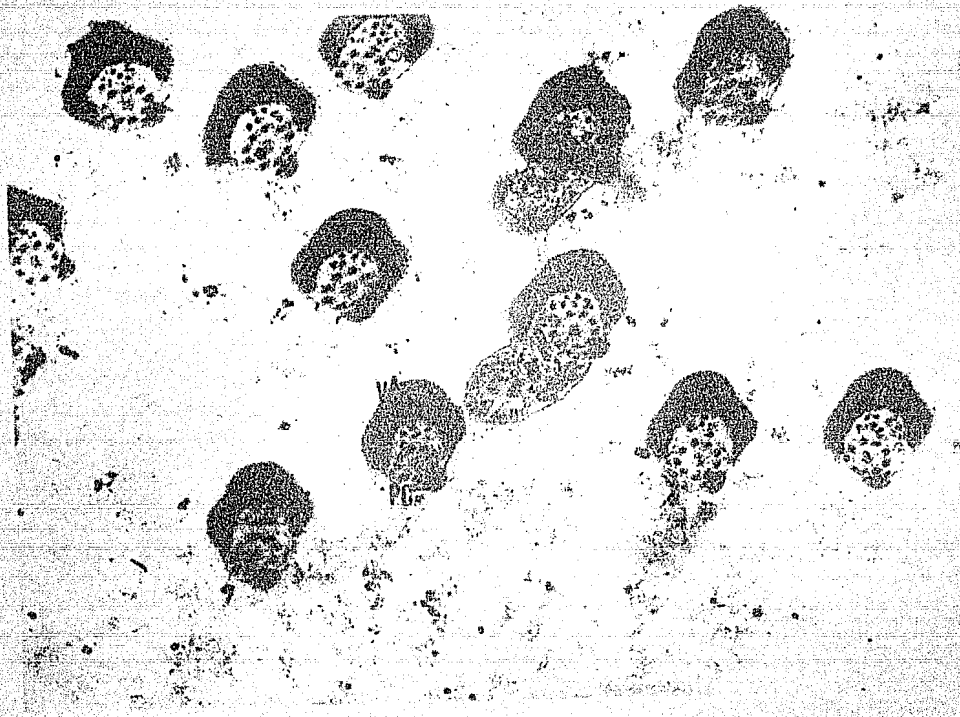


Fig. 20. Porción subterminal. Sección transversal  
 VA: Varilla axial      PG: Patrón ciliar

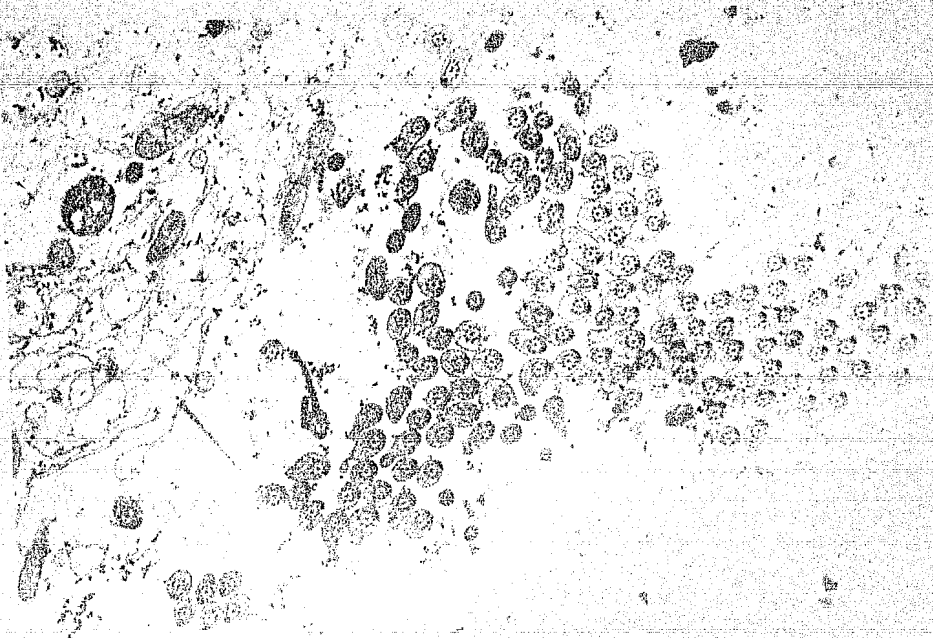


Fig. 21. Sección longitudinal. Patrón ciliar  
 VA: Varilla axial      PG: Patrón ciliar

## DISCUSSION Y CONCLUSION

De las observaciones anteriores se concluye que en el caso observado, tenemos un espermatozoide que presenta una serie de características propias que resumiremos a continuación.

De acuerdo a la clasificación que hace en su trabajo Nath (13), este caso quedaría como el de un espermatozoide flagelado atípico, ya que sabemos que el aparato de Golgi forma el acrosoma, directa ó indirectamente (13) y el acrosoma no se hizo aparente en el espermatozoide adulto en ninguna de las observaciones efectuadas, pese al empleo de diferentes técnicas, así como el de los microscopios de luz y electrónico; por lo cual, creemos que esta estructura esté ausente en este caso. Asimismo, podemos afirmar que en Ambystoma no existe ni el perforatorium, ni el idiosoma que lo precede, como indicara Meves para el caso de Salamandra maculosa, cuyo espermatozoide y estadios precedentes son semejantes (22) a las del sujeto en estudio. Sin embargo, durante las etapas tempranas del desarrollo del espermatozoide se pudieron observar abundantes cuerpecillos semejantes a los dictiosomas descritos en otros tipos celulares; en este caso, dichos organitos se encuentran distribuidos en torno a la estructura nuclear en vías de condensación,



pero al final desaparecen al ser eliminados junto con las mitocondrias al romperse la membrana y producirse la expulsión del citoplasma. Una vez producida dicha expulsión masiva, el citoplasma queda reducido a una pequeña vesícula localizada en la región en que se encuentra el complejo basal; esta estructura es observada en la mayoría de los espermatozoides adultos, de los que aparentemente se desprende con gran facilidad. (fig. 2).

Por otro lado, podemos concluir que el espermatozoide de Ambystoma presenta características especiales en cuanto a su desplazamiento, ya que a pesar de poseer una membrana ondulante bien desarrollada y con movimiento activo, ésta presenta cierta rigidez; lo que es debido fundamentalmente a la presencia de la "varilla axial", la cual como pudo comprobarse es rica en proteínas (fig. 5). La "varilla axial", sin embargo, observada al microscopio electrónico presenta un aspecto muy semejante en densidad a la porción nuclear.

La porción intercalar rica en mitocondrias, es sin duda análoga a la descrita en los espermatozoides de otros organismos, es decir es la encargada de sintetizar, por medio de las mitocondrias, las moléculas de ATP necesarias para el trabajo locomotor del flagelo y de la membrana ondulante.

En cuanto a la porción infranuclear, rica en proteínas (fig. 5) y carente de ácidos nucleicos, así como al complejo basal, resulta difícil atribuirles alguna función específica. Sin embargo, debido a la íntima relación que ambas estructuras mantienen con el centriolo, del cual parte el "patrón ciliar" que se extiende a todo lo largo de la cauda, es muy posible que su papel esté íntimamente relacionado con los movimientos del flagelo y de la membrana ondulante.

Podemos concluir de nuestro estudio, que el espermatozoide de Ambystoma presenta muchas de las características comunes a los espermatozoides de otros anfibios que han sido descritos antes; no obstante, algunas otras características lo hacen claramente distinguible de los demás, de tal manera que puede considerarse como un elemento citológico específico.

REFERENCIAS

1. ANDRE, J. 1963. Some aspects of specialization in sperm. En: D. Mazia y A. Tyler. General Physiology of cell specialization. McGraw-Hill Book. New York.
2. AOKI, A. y GUTIERREZ, L. 1967. A simple toluidine Blue-Basic Fuchsin stain for spermatozoa in epoxy sections. Stain Technol 42:307-310.
3. AREY, L. B. 1965. Developmental Anatomy. 7a. Ed. W. B. Saunders. Philadelphia. pp: 1-8 y 40-47.
4. BALINSKY, B. I. 1965. An Introduction to Embriology 2nd. Ed. W. B. Saunders. Philadelphia.
5. BAKER, C. L. y TAYLOR, Jr. W. W. 1964. The urogenital sistem of the male Ambystoma. J. Tenn. Acad. Sci. 39:1-10.
6. BRACHET, J. 1961. The Living Cell. En D. Kennedy 1965. The Living Cell. Reading from Scientific American. W. H. Freeman. pp:5-15.
7. BURGOS, M. H. y FAWCETT, D. W. 1956. An electron microscope study of spermatid differentiation in the toad Bufo arenarum Hensel. J. Biophys. Biochem. Cytol. 2: 223-240.

8. BURGOS, M. H. y VITALE-GALPE, R. 1967. The fine structure of the Sertoli cell-spermatozoan relation in the toad. *J. Ultrastruct. Res.* 19: 221-237.
9. CARRICK, R. 1933-34. The spermatogenesis on the axolotl (*Ambystoma tigrinum*). *Trans. Roy. Soc. Edimburg.* 58: 63-74.
10. De ROBERTIS, E.D.P.; NOWINSKI, W.W. y SAEZ, F. S. 1965. *Biología Celular* 6a. Ed. El Ateneo, Buenos Aires.
11. FAWCETT, D.W. 1966. *The Cell*. Saunders, Philadelphia.
12. GALLIEN, L. 1952. *Physiologie du développement et taxonomy*. *Ann. Soc. Roy. Zool. Belgique* 83: 65-85.
13. GLAUERT, M. A. 1965. The fixation and embedding of biological specimens. En: H. D. Kay 1965. *Techniques for electron microscopy*. Davis, Philadelphia. Cap. 9: 254-310.
14. LUFT, J.H. 1961. Improvement in epoxy resin embedding. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9: 409-414.

15. MILLIONING, J. 1961. Advantages of a phosphate buffer for  $\text{OsO}_4$  solution in fixation. J. Appl. Phys. 32: 16-37.
16. MAZIA, D.; BREWER, P.A. y ALFERT, M. 1953. The Cytochemical staining and measurement of protein with mercuric-bromophenol blue Biol. Bull. 104: 57-67.
17. MOORE, R. 1966. Evolución. Ed. Labor.
18. NATH, V. 1956. Cytology of Spermatogenesis. En: Review of Cytology Vol. V Academic Press, New York pp: 395-453.
19. NOBLE, G. K. y BRADY, M. K. 1933. Zoologica. New York 11: 89-132.
20. PATTEN, B. M. 1960. Embriología Humana 3a. ed. El Ateneo, Buenos Aires. pp: 19-39.
21. PORTER, K. P. y BONEVILLE, M. A. 1965. Atlas de Microscopía Electrónica. El Ateneo, Argentina.
22. PUJIULA, J. 1923. Embriología del hombre y demás vertebrados Tomo I. Ed. Pujiula, Barcelona.

23. REYNOLDS, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron-microscopy. *J. Cell Biol.* 17: 208-212.
24. SABATINI, D.D.; BENSCH, K. y BARNET, R. J. 1963. *Cytochemistry and Electron Microscopy.* The preservation of cellular ultrastructure in enzyme activity by aldehyde fixation. *J. Cell Biol.* 17: 19-58.
25. SINNOT, E. W.; DUNN, L. C. y DOBZHANSKY 1961. *Principios de Genética.* Ed. Omega. Barcelona. pp: 19-24.
26. THREAGOLD, L. T. 1967. *The ultrastructure of the Animal cell.* Pergamon. Oxford. pp: 228-238.
27. WATSON, L. L., 1958. Staining of tissue sections. For electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4: 727.