UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TECNICA PARA EL ESTUDIO DE LA ULTRAESTRUCTURA DEL ESPERMATOZOIDE BOVINO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

JOSE M. GOMEZ MENDOZA

México, D. F.

1972

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

TECNICA PARA EL ESTUDIO DE LA ULTRAESTRUCTURA DEL ESPERMATOZOIDE BOVINO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

JOSE M. GOMEZ MENDOZA

MEXICO, D. F. 1972

Dedicada con cariño
A mi madre

Al recuerdo de mi padre

A mis hermanos

A mi asesor:
M.V.Z. Aurora Velázquez E.

A mi H. Jurado

Con agradecimiento al Sr. Moisés Fraire y esposa, sin la ayuda de quienes no habría sido posible la realización de este trabajo.

CONTENIDO:

I. INTRODUCCION
II. MATERIAL Y METODOS
III. RESULTADOS Y DISCUSION
IV. CONCLUSIONES
V. BIBLIOGRAFIA

I. INTRODUCCION

El espermatozoide es una célula de tipo único que cumple las funciones de fertilización y por lo tanto de transmisión de la información genética del padre al nuevo ser.

El conocimiento de la estructura del espermatozoide podría aclarar principios básicos en la Fisiología de la reproducción, y en el caso particular del espermatozoide bovino sería de gran utilidad, dada la importancia económica de esta especie.

El propósito de este trabajo es dar a conocer la técnica empleada en el departamento de Microscopía electrónica de la F.N.M.V.Z., así como estimular la realización de otros estudios relacionados a la estructura de los espermatozoides de las especies domésticas.

II. MATERIAL Y METODOS

A. Material.

1. Microscopio electrónico CARL ZEISS EM 9.
2. Ultramicrotomo Sorvall "Porter Blum" MT 2.
3. Semen de un toro de raza Holstein Friesian de 5 años de edad, obtenido por vagina artificial según la técnica descrita por Pérez y Pérez (7).

1.-Buffer acetato-veronal de Michaelis

Mezcla base:	Na-acetato	19.428	gr.
	Na-veronal	29.428	gr.
	Na-Cl	34.0	gr.
	Agua destilada a	1 000	ml.
Mezclar	Mezcla base	5	ml.
	H Cl N/10	7	ml.
	Agua destilada	13	ml.
	$Ca\ Cl_2$	0.25	ml.

Esta solución se utiliza en la preparación de los fijadores, del líquido para lavado y de la solución de agar al 2%.

2.-**Fijadores:**

a) Glutar aldehido al 4% en buffer acetato-veronal.

b) Tetróxido de osmio al 1% en buffer acetato-veronal.

3.-**Medio de inclusión:**

Epon	3.0 ml.
Araldita	9.0 ml.
Anhidrido dodecenil succínico (DDSA)	8.0 ml.
Anhidrido metil nadico (NMA)	7.0 ml.
2, 4, 6-tri (dimetil-aurinometil) fenol (DMP 30)	.5 ml.

Soluciones para tinción:

1.-**Solución de acetato de uranio al 5% en agua tridestilada.**

2.-**Solución de citrato de plomo:**

Nitrato de plomo	1.33 gr.
Citrato de sodio	1.76 gr.
Agua destilada	30 ml.

Se agita y, a 30 minutos, se agrega Na OH 8 ml.; se diluye cn agua a 50 ml. y se mezcla por inversión.

B. **Métodos**

El semen fresco sin diluir se llevó al laboratorio en el menor tiempo posible y, una vez ahí, se sometió a los procesos previos a su observación en el microscopio electró-

nico, siguiendo las técnicas de doble fijación y doble tinción descritas por González Santander (3) y por Haggis (5).

Dos ml. de semen fueron mezclados con 8 ml. de glutaraldehido al 2% en solución buffer de Michaelis (P. H. 7.3), la cual permite una mejor y más rápida penetración del fijador en el tejido, en un tubo para centrífuga de 12.5 ml., dejándose fijar durante 2 horas a temperatura ambiente, para después centrigufarse a 1500 rpm. durante 15 minutos. El glutar-aldehido se utiliza como agente fijador porque permite un mayor período de conservación de la muestra mientras no se procesa.

Se desechó el sobrenadante y a 1 ml. del sedimento se agregaron 4 ml. de tetróxido de osmio al 1% en solución buffer; el semen así fijado se dejó en el refrigerador durante 12 horas. El tetróxido de osmio preserva los detalles citológicos, protege las lipoproteínas naturales de los tejidos evitando su ruptura ante la acción de los disolventes y, estabiliza y tiñe especialmente los fosfolipidos constituyentes de las membranas citoplasmáticos. Claude y Fullan, 1946 (2).

Al día siguiente el semen se diluyó en solución buffer y así fijado y diluído se centrifugó a 2000 rpm. durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el sedimento se mezcló con 4 ml. de agar al 1% a 40° C., el cual evita la dispersión de los espermatozoides, teniendo la precaución de que esta mezcla fuera homogénea.

Unas gotas de la mezcla semen-agar fueron colocadas en un porta-objetos y se dejaron solidificar. Posteriormente estos geles se cortaron en cubitos de 2 mm.[3]

Los cubitos de gel, conteniendo el semen fijado, se deshidrataron por pases sucesivos en alcohol etílico de 30, 40, 50 y 60° G.L. durante 10 minutos cada uno; después se sumergieron en alcohol etílico de 70° G.L. saturado con acetato de uranio durante 24 horas. Al término de este tiempo se hicieron dos pases más, de 10 minutos, en alcohol etílico de 80 y 90° G.L.

Una deshidratación más completa se logró con tres pa-

ses en alcohol absoluto durante 20 minutos, y dos pases en óxido de propileno de 30 minutos cada uno.

La deshidratación con alcohol tiene la ventaja de ser miscible con el óxido de propileno, el cual disuelve las epoxi resinas.

Los geles así tratados se sumergieron en una solución a partes iguales de óxido de propileno y epon-araldita durante 24 hrs.

Al día siguiente se colocaron en cápsulas de gelatina, las cuales se llenaron de epon-araldita. Esta sustancia se endurece por polimerización, dando a la muestra una consistencia suave y firme que evita el desgarre de los cortes y permite su observación en el microscopio de luz, por lo que se colocaron las cápsulas en una estufa, primero a 37°C. durante 24 horas para permitir que la inclusión de la resina fuera mejor y evitar que las burbujas de aire quedaran atrapadas en las cápsulas, y después a 60°C. durante otras 24 horas.

Al final de este tratamiento las muestras de semen estaban listas para ser cortadas con el ultramicrotomo.

Los cortes se hicieron de aproximadamente 850 Å de espesor, y fueron recibidos en el receptáculo lleno de agua destilada que se había formado sobre la hipotenusa de la cuchilla con un trocito de tela adhesiva.

Las cuchillas utilizadas fueron elaboradas con cristal de 6 mm. según la técnica de "Corte libre" descrita en el instructivo sobre el manejo del ultramicrotomo Sorvall "Porter Blum", y en el mismo día en que se ocupaban para evitar su contaminación con el polvo.

Para pasar los cortes que flotaban en el receptáculo a las rejillas del microscopio, que previamente se habían preparado con membranas de formar, como describe Sjostrand (9), se utilizó un cabello fijado al extremo de un palillo.

Los cortes se adhirieron a la membrana sobre la rejilla, quedando fijos una vez que se evaporó el agua.

Ya sobre la rejilla se les hizo flotar en una gota de acetato de uranio al 5%, el cual tiñe el ADN y el ARN, y se

BIBLIOTECA CENTRAL
U. N. A. M.

colocaron en una cámara húmeda a 60°C. durante 20 minutos. Al final de este tiempo se lavaron con agua destilada y se hicieron flotar sobre una gota de citrato de plomo al 50%, para teñir las membranas basales, colocándose entonces en una caja de Petri con cristales de hidróxido de sodio para absorver el bióxido de carbono del ambiente y formar carbonato de sodio para evitar los precipitados de plomo, permaneciendo ahí a temperatura ambiente durante 15 minutos; se repitió el lavado con agua destilada estéril y después de secarse al aire y a la temperatura de la habitación, las preparaciones quedaron listas para ser observadas.

Para tomar las fotografías se seleccionaron las preparaciones que en su observación mostraban mejor definición de las estructuras, utilizando el diafragma de contraste de 25 micras.

III. RESULTADOS Y DISCUSION

La preparación de espermatozoides recién obtenidos para su observación en el microscopio electrónico evita la presencia de artificios, formados por envejecimiento de las células.

De acuerdo con Saacke y Almquist (8) y según se observa en un corte longitudinal, la cabeza está totalmente ocupada por el núcleo (foto 1 N), el cual presenta un ligero y gradual adelgazamiento hacia su porción anterior y un ensanchamiento hacia su base, donde se observa un hueco para la inserción del cuello, en tanto que en un corte perpendicular, y por su parte ancha, se observan tres huecos de inserción (foto 3 Hi).

El núcleo es una sustancia con alta densidad en electrones y compuesto en un 43% de ADN y otras proteínas (6); está totalmente cubierto por la membrana nuclear que es doble y con poros (8); en preparaciones con buena tinción aparece casi homogéneo, excepto por la presencia de vacuolas (foto 3 V), especialmente en su parte posterior. En las fotografías 2 y 3 se observa demasiada coloración del núcleo debido a que la tinción fue enfocada hacia una mejor observación de las membranas y estructuras flagelares.

Una estructura importante de la cabeza es el capuchón cefálico el cual está formado por tres capas: interna, intermedia o acrosómica y externa (foto 1 Mi, Ma, Me). El capuchón alcanza su máximo grosor en el ápice de la cabeza y fue denominado cuerpo apical por Blom (1) (foto 1 Ca). Según estudios de Fawcett (2) las membra-

nas interna y externa representan la pared de la vesícula acrosómica presente durante la espermatogénesis, mientras que la intermedia, homogénea y moderadamente densa en electrones, es de origen acrosómico.

La fijación con el tetróxido de osmio dio excelentes resultados para la observación de las membranas celulares puesto que aparecen nítidamente contrastadas en finas líneas intensamente oscuras y sobre un fondo bien claro, especialmente por la inclusión del tejido en epon.

El capuchón postnuclear se extiende desde la base de la cabeza hasta el margen posterior del capuchón cefálico; generalmente parece estar fijo a la base de la cabeza, pero hacia su parte anterior llega a estar progresivamente suelto (foto 1 Cpn).

La cola del espermatozoide se subdivide en: cuello, pieza media, pieza principal y pieza terminal.

La parte medular de la cola está formada por el complejo filamento axial (foto 4 Cfa), que se extiende desde el cuello hasta la pieza terminal; presenta una disposición similar a la de los cilios y flagelos incluyendo, del centro a la periferia, dos delgados túbulos rodeados por una doble serie de fibrillas (18 en total).

En las piezas media y principal la parte medular presenta un anillo externo adicional de nueve fibrillas, burdas en relación a las centrales; de ellas, tres son gruesas, cinco delgadas y la otra presenta un grosor intermedio (foto 4 Ae).

El cuello es la parte más corta de la cola; está situado entre la base de la cabeza y la primera mitocondria de la pieza media. Se caracteriza por la presencia de fibras laminares transversas que encajan en el hueco de la base de la cabeza (foto 2 Flt). Estas fibras laminares son las placas de implantación, que están limitadas en su parte anterior por una sección modificada de la membrana nuclear; la placa basal (foto 2 Pb).

La pieza media está caracterizada por la capa de mitocondrias o hélice mitocondrial (foto 2 Hm). Esta hélice está formada por aproximadamente 65 a 75 vueltas des-

de el cuello hasta el anillo de Jensen y están enredadas al eje central (8).

La pieza principal es la parte más larga del espermatozoide. Está rodeada por una envoltura fibrosa que reemplaza a la capa mitocondrial. Esta envoltura está formada por dos columnas paralelas, denominadas elementos longitudinales, colocadas en lados opuestos de la cola y articuladas una a otra por varillas circunferenciales.

Aparentemente, los elementos longitudinales empiezan en la extremidad anterior de la envoltura fibrosa y se adelgazan posteriormente, al grado de no ser observables en secciones transversales de la pieza terminal (8).

En la pieza terminal de la cola del espermatozoide hay una desaparición gradual de las estructuras que forman la pieza principal, quedando sólo las fibras burdas más gruesas, la doble serie de fibrillas periféricas y el par central. Sólo la membrana celular rodea los filamentos restantes (4).

Es necesario hacer un gran número de preparaciones para poder observar todas las estructuras espermáticas, ya que los planos de corte se presentan completamente al azar con la técnica seguida.

IV. CONCLUSIONES

La técnica descrita, de fijación e inclusión de células en agar, es útil para el estudio de la ultraestructura del espermatozoide bovino.

Con las técnicas empleadas se logra una tinción adecuada para la observación de la ultraestructura de los espermatozoides.

V. BIBLIOGRAFIA

(1) Blom E. **The galea capitis as part of the acrosom cap in the bull sperm.** Congr. Int. Rep. I. A. Trento. 1964.

(2) Fawcett D. **The structe of mammalian spermatozoon.** Intern. Rev. Cytol. 7. 1958.

(3) González Santander. **Técnicas de microscopía electrónica en Biología.** Edit. Aguilar, S. A. España. 1968.

(4) Hadek R. **Mammalian fertilization.** Academic Press. New York and London. 1969.

(5) Haggis G. H. **The electron microscope in Molecular Biology.** Longmans, Green and Co. London. 1966.

(6) Luechtemberger C. **Decreased amounts of desoxyribonucleic acid (DNA) in male germ cells as a possible cause of human male infertility.** Acta Genet. 1956.

(7) Pérez y Pérez F. **Reproducción e inseminación artificial ganadera.** Edit. Científico-Médica. 1966.

(8) Saacke y Almquist. **Ultrastructure of mammalian spermatozoa.** Am. J. Anat. 1963. 143-147, 165-172.

(9) Sjöstrand F. **Electron microscopy of cells and tissues.** Vol. 1. Instrumentation and techniques. Academic Press. New York and London. 1967.

Foto 1. *Corte longitudinal de la cabeza 18000 X.*

Mc — Membrana celular.
N — Núcleo.
Mi — Membrana interna.
Ma — Membrana acrosómica.
Me — Membrana externa.
Ca — Cuerpo apical.
Cpn — Capuchón postnuclear.

FOTO 2. *Corte longitudinal en que se observa parte de la cabeza, el cuello y parte de la pieza media 6000 X.*

Flt — Fibras laminares transversas.

Hm — Hélice mitocondrial.

Pb — Placa basal.

FOTO 3. *Corte perpendicular de la cabeza por su parte ancha 18000 X.*

Hi — Hueco de inserción.

V — Vacuales.

Cpn — Capuchón postnuclear.

Foto 4. *Corte transversal de la cola a la altura de la pieza media 18000 X.*

Cfa — Complejo filamento axial.

Ae — Anillo externo.

M — Mitocondrias.

Mc — Membrana celular.

BIBLIOTECA CENTRAL
U. N. A. M.

ERRORES DE IMPRESION

	DICE	DEBE DECIR
METODOS	membranas de formar	membranas "formvar"
BIBLIOGRAFIA (2)	structe	structure
Foto 1	Cpn Capudión	Capuchón
Foto 3	V Vacuales	Vacuolas