

## Ultraestructura del espermatozoide de rata (*Rattus norvegicus*). Aplicación de tres técnicas para Microscopía Electrónica de Transmisión

Francisco Ureña

Unidad de Microscopía Electrónica, Universidad de Costa Rica.

Hiroshi Akahori

Naka Works, Hitachi Ltd., Japan.

Alfredo Azofeifa

Unidad de Microscopía Electrónica, Universidad de Costa Rica.

(Recibido el 16 de agosto de 1986)

**Abstract:** Ultrastructures spermatozoa taken from the seminiferous tubules of rat testes (*Rattus norvegicus*) were observed under transmission electron microscopy, using the techniques of ultrathin sections, microspreading specimens and replicas. The heads of isolated spermatozoa were of homogeneously high electron density, and had a slightly curved end; in longitudinal sections these zones were composed of a compact homogeneous DNA, covered by a nuclear envelop, cell membrane and small amounts of acrosomal material. The middle piece contained the modified centriols in the junction zone and flagellar microtubules. In transverse sections as well as in replicas, this region consisted of 10 pairs of microtubules and 9 dense fibers surrounded circularly by the mitochondria (mitochondrial sheath).

La ultraestructura del espermatozoide maduro y durante la espermiogénesis ha sido estudiada en diferentes especies mediante la utilización de las técnicas de secciones finas y microscopía electrónica de barrido. (Fawcett 1956; Fawcett e Ito 1965; Bedford 1966; 1973; Pedersen 1979; Holstein 1977; Ureña y Malavasi 1978). En el presente trabajo se hace un estudio ultraestructural de la superficie y del interior del espermatozoide de rata (*Rattus norvegicus*), mediante la aplicación de dos nuevas técnicas de transmisión (Microextendidos: Solari 1979; Réplicas: Akahori 1983), que permiten obtener información morfológica superficial con microscopía electrónica de alta resolución como lo es la de transmisión.

### MATERIAL Y METODOS

En las observaciones ultraestructurales del espermatozoide fueron usadas las siguientes técnicas para microscopía electrónica de transmisión:

**Secciones finas:** Pequeñas piezas de testículo de *Rattus norvegicus*, fueron cortadas y sometidas a una primera fijación con una solución de glutaraldehído al 2.5% en un amortiguador de fosfatos 0.1M y pH7.00 por dos horas a 4 °C. Después de lavadas las piezas de tejido con amortiguador, se sometieron a una segunda fijación con tetróxido de osmio al 1% en amortiguador de fosfatos. El tejido fue embebido en resina Taab (fórmula Spurr) y cortado en secciones de color plateado y teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo. La revisión de las secciones se hizo con el microscopio electrónico Hitachi, modelo HU-12A.

**Técnica de microextendido:** Los microextendidos fueron hechos con la técnica para extendidos de espermatocitos de mamíferos (Moses 1977), modificada por Solari (1977). Se hace una suspensión de células del tubo seminífero en medio de cultivo mínimo de Eagle. Se toma una gota de suspensión de células y se coloca en la superficie de una solución del NaCl al 4.5%. Los núcleos extendidos sobre la super-

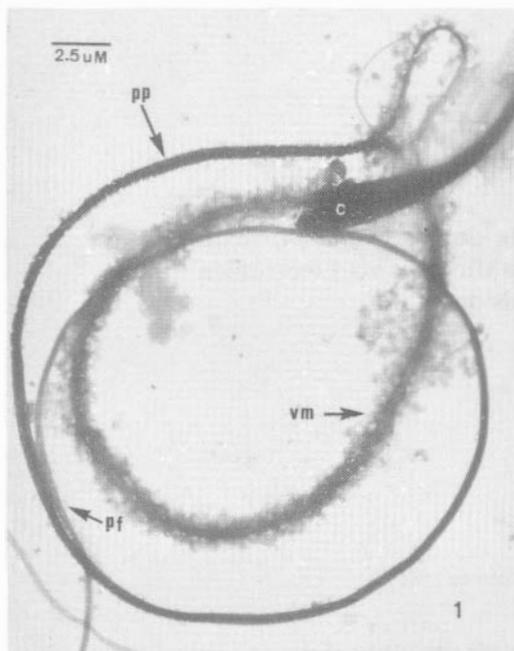


Fig. 1. Espermatozoide de *Rattus norvegicus* con la técnica de microextendidos. C: cabeza; vm: vaina mitocondrial; PP: pieza principal; pf: pieza de la cola. 6.000X.

ficie son recogidos con una rejilla con membrana y colocados en paraformaldehído al 4% en amortiguador de borato de Na a pH 8,2 durante 10 minutos. Se coloca la rejilla en photoflo al 0.4% y pH 8.2 por 10 segundos y se seca con papel. Las rejillas fueron teñidas con ácido fosfotúngstico al 4% en agua por un minuto y lavadas en alcohol de 95° durante 10 segundos. Las células fueron fotografiadas con el microscopio electrónico Hitachi, modelo HU-12A.

**Técnica de réplica:** Las réplicas fueron hechas con la técnica del Dr. Akahori (comunicación personal, 1983). Una gota de suspensión de células del tubo seminífero fue colocada en un portaobjetos y secada con el secador de punto crítico UCP-1. Las células fueron cubiertas con una capa de platino y carbón en el evaporador al vacío HUS-5 a un ángulo de 20° con rotación de la muestra y a  $10^{-6}$  torr de vacío. Las células se cubren con cemento plástico instantáneo ("Cemedine-C") y cuando éste está seco se separa del vidrio y se digiere la materia orgánica en hipoclorito de  $\text{Na}^+$  durante 15 minutos. Luego se seca y se cubre con una

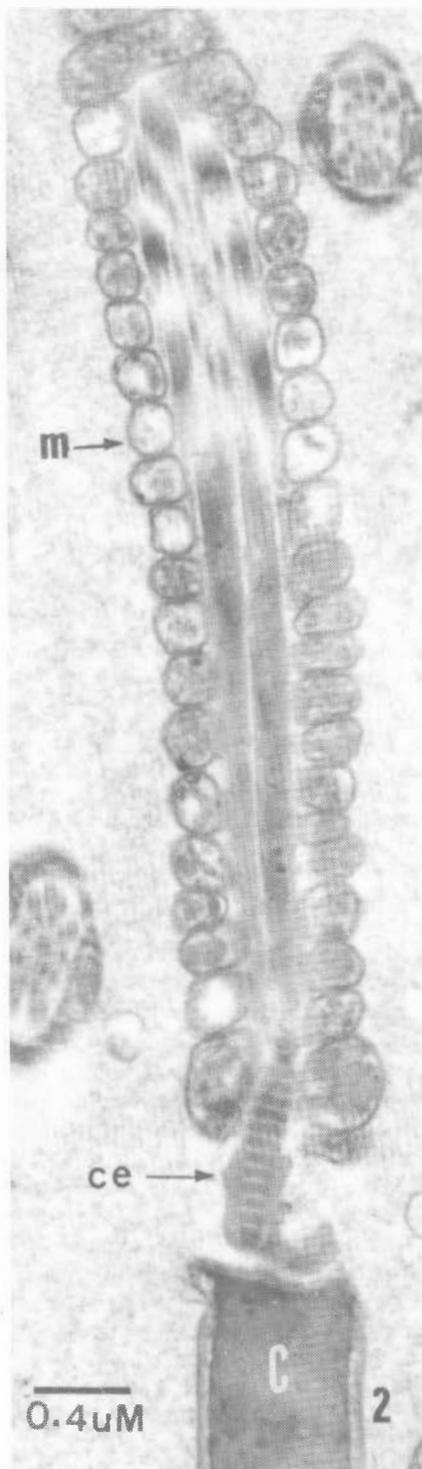


Fig. 2. Secciones longitudinales de la cabeza, centriolos y vaina mitocondrial del espermatozoide de *Rattus norvegicus*. C: cabeza; ce: centriolos; m: mitocondrias. 25.000X.



Fig. 3. Réplica de la cabeza de un espermatozoide de *Rattus norvegicus*. C: cabeza. 12.500X.

capa de carbón en el HUS-5 por el lado de la réplica. Se coloca en acetona para eliminar la capa de cemento y se lava la réplica con H<sub>2</sub>O destilada y se recoge en una rejilla. Las réplicas fueron revisadas en un microscopio electrónico Hitachi, modelo HU-12A, con el cual se tomaron las micrografías electrónicas.

## RESULTADOS

**Cabeza del espermatozoide:** En las secciones longitudinales la cabeza se observa de forma alargada con una pequeña curvatura en el extremo distal. El ADN es muy compacto, homogéneo y de gran densidad electrónica; está cubierto por las membranas nuclear, celular y material acrosómico (Figs. 2a, 2b). En los espermatozoides aislados y extendidos. La cabeza presenta gran densidad electrónica, muy homogénea y ligeramente curva en el extremo distal (Fig. 1). En las réplicas de la cabeza se observa una superficie homogénea y la curvatura del

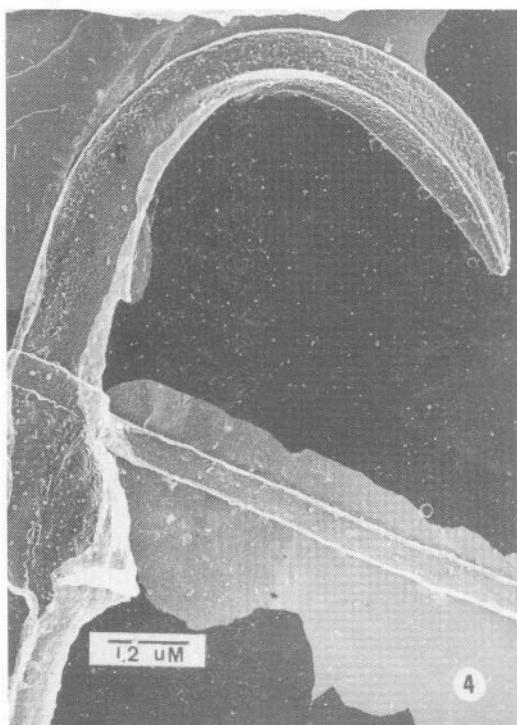


Fig. 4. Réplica de la cabeza de un espermatozoide de *Rattus norvegicus*. C: cabeza. 12.000X.

extremo distal se caracteriza perfectamente (Figs. 3,4).

**Pieza media:** En las secciones longitudinales de la pieza media se observa: los centrólos de gran densidad electrónica y modificados en la pieza de unión a la cabeza y en los microtúbulos del flagelo. Las mitocondrias se ordenan en una capa que rodea las fibras densas y los microtúbulos del flagelo (Figs. 2a, 2b, 5, 6). En las secciones transversales y en las réplicas de éstas a nivel de la vaina mitocondrial se observan dos microtúbulos centrales, rodeados de 9 pares de microtúbulos y 9 fibras muy gruesas. Una monocapa de mitocondrias rodea el exterior de las fibras densas y una pequeña cantidad de citoplasma separa las mitocondrias de la membrana citoplasmática (Figs. 5a, 5b).

**Segmento final de la cola:** En secciones transversales del segmento final de la cola se observa: membrana celular, citoplasma y microtúbulos. Los microtúbulos conservan el arreglo de dos centrales y nueve pares que los rodean en disposición circular (Fig. 5b). La réplica de la superficie externa de esta zona de la cola

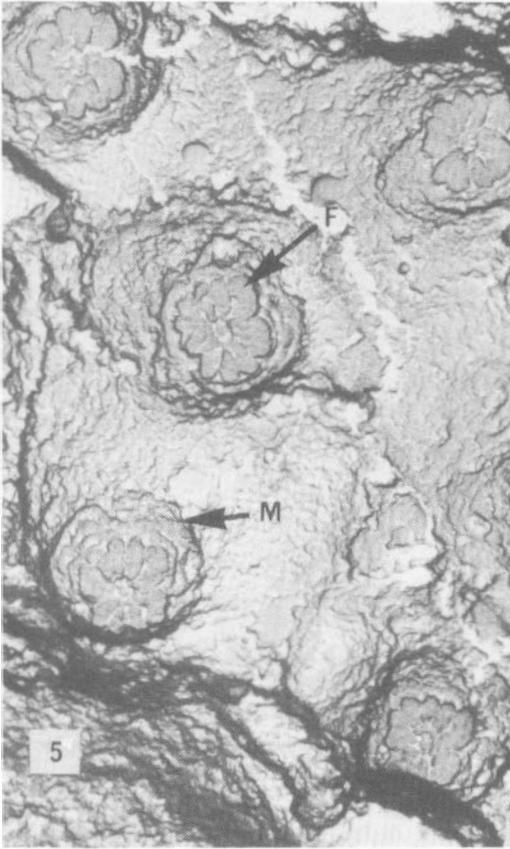


Fig. 5. Réplica de secciones transversales a nivel de la vaina mitocondrial de espermatozoides de *Rattus norvegicus*. F: filamentos densos, M: mitocondrias. 27.000X.

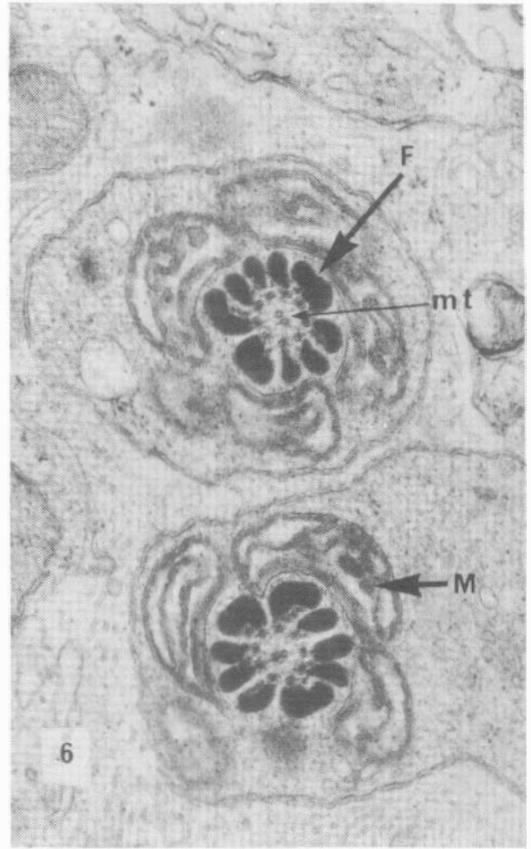


Fig. 6. Dos secciones transversales a nivel de la vaina mitocondrial en espermatozoides de *Rattus norvegicus*. M: mitocondrias; F: filamentos; mt: microtúbulos. 36.000X.

indica que la membrana celular presenta depresiones en forma de anillos (Figs. 7b, 7c).

## DISCUSION

Nuestros resultados demuestran que mediante la aplicación de las técnicas de microextendidos, réplicas y secciones finas, se puede obtener información ultraestructural en la superficie e interior de la cabeza, cuello y piezas media, principal y final del espermatozoide con microscopía electrónica de transmisión. En este trabajo sólo se hizo observaciones ultraestructurales de la morfología externa e interna del espermatozoide tomado del tubo seminífero, pero la metodología aplicada puede ser muy útil en los estudios sobre maduración de los espermatozoides en la vía seminal.

En varias especies se ha demostrado que los

espermios adquieren gradualmente su total capacidad fertilizante a medida que viajan por las vías espermáticas (Orgebin-Crist 1967; 1969). Esta capacidad fecundante consiste en un complejo proceso que comprende cambios físico-morfológicos que corren paralelos a cambios fisiológicos y bioquímicos del gameto. De estos complejos fenómenos y en relación con la estructura fina ha sido parcialmente estudiado lo relativo a la evolución ultraestructural del aparato de Golgi y la formación del acrosoma en algunas especies (Fawcett y Hollenberg 1963; Holstein 1977; Ureña y Malavasi 1978). Nuestras observaciones ultraestructurales del espermio tomado a nivel tubular indican que estas técnicas pueden ser de mucha utilidad en la caracterización de los cambios ultraestructurales durante la evolución morfológica de espermios normales y anormales en las diferentes zonas del epididimo y conducto deferente,

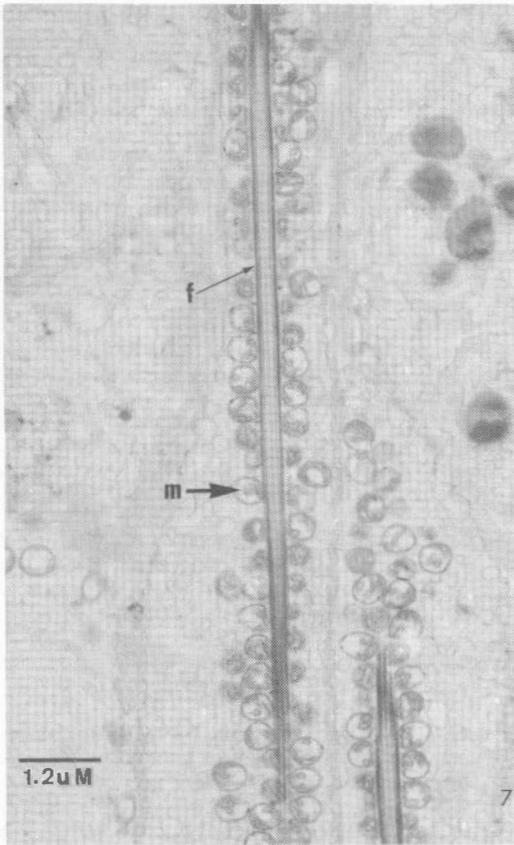


Fig. 7. Secciones longitudinales de la vaina mitocondrial del espermatozoide de *Rattus norvegicus*. F: fibra densa; m: mitocondria.

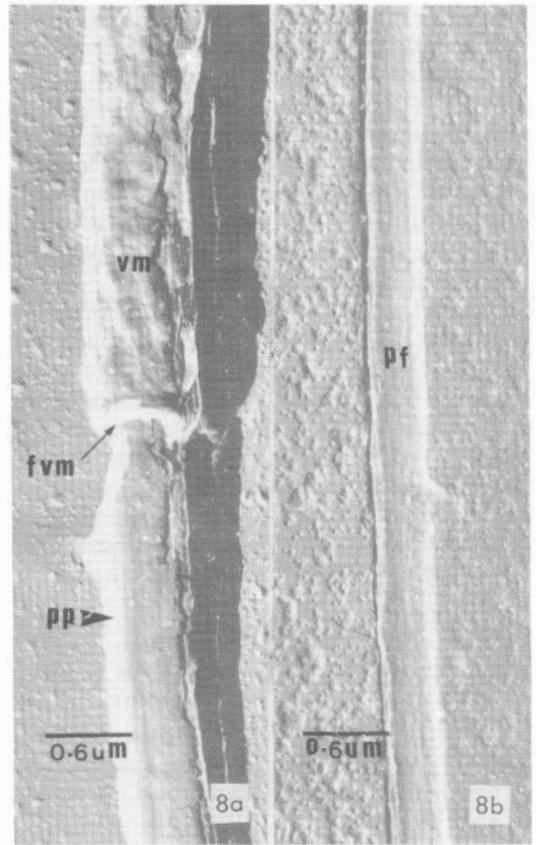


Fig. 8. Réplicas de varias zonas de la cola del espermatozoide de *Rattus norvegicus*. 8a. Réplica del final de la vaina mitocondrial (pieza media) e inicio de la pieza principal. 8b. Réplica de una zona de la pieza final. Vm: vaina mitocondrial, fVm: final de la vaina principal, pf: pieza final. 25.000X.

que junto a estudios bioquímicos y fisiológicos pueden aportar nueva información sobre fertilidad e infertilidad en los machos incluyendo al hombre ayudando así en la comprensión de los complejos fenómenos de la fisiología de la fecundación.

Finalmente nos parece de interés destacar el aporte de las técnicas de microextendidos y réplicas para microscopía electrónica de transmisión en la descripción de los cambios ultraestructurales y citoquímicos superficiales del espermio durante el tránsito por las vías seminales y el eyaculado, que permita hacer estudios topográficos de la superficie del espermatozoide como método de caracterización de los gametos de diferentes especies, relevante a estudios sistemáticos.

#### AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se hizo en la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad de Costa Rica, establecida con el apoyo de la Agencia Japonesa de Cooperación Internacional (J.I.C.A.) del Gobierno de Japón.

Agradecemos a Iris Morera Alvarado y María del Carmen Obando Jiménez por la ayuda técnica y a Damaris Orocú por su ayuda.

#### RESUMEN

Se hizo un estudio ultraestructural del espermatozoide de rata tomado del tubo seminífero, con microscopía electrónica de transmisión y

mediante la aplicación de las técnicas de: secciones finas, microextendidos y réplicas. Los espermatozoides aislados y extendidos, presentan una cabeza de gran densidad electrónica, muy homogénea y ligeramente curva en el extremo anterior; las secciones finas y longitudinales de esta zona corroboran lo compacto y homogéneo del ADN, cubierto por las membranas nuclear y celular y por una pequeña cantidad de material acrosómico.

A nivel de la pieza media, se observó los centriolos modificados en la pieza de unión o la cabeza y en los microtúbulos del flagelo. En secciones transversales y réplicas de éstas a nivel de la vaina mitocondrial se observan los 10 pares de microtúbulos y las 9 fibras densas, rodeadas por las mitocondrias que se disponen en forma circular. En el segmento final de la cola, los microtúbulos conservan el arreglo de dos centrales y 9 pares que los rodean.

## REFERENCIAS

- Bedford, J. M. 1966. Development of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the rabbit. *Exptl. Zool.* 163: 319-329.
- Bedford, J. M. 1973. Components of sperm maturation in the human epididymis. *Adv. Biosc.* 10: 145-155.
- Burgos, M. H. & D. Fawcett. 1956. An electron microscope study of spermatid differentiation in the *Bufo arenarum*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2: 223-240.
- Bustos-Obregón, E. & J. E. Flechon. 1975. Comparative scanning electron microscope study of boar, bull and ram spermatozoa. *Cell. Tiss. Res.* 161: 329-341.
- Bustos-Obregón, E. 1977. Algunos aspectos morfológicos de la maduración espermática en mamíferos. *Rev. Microsc. Elec.* 4: 97-105.
- Fawcett, D. 1956. The anatomy of the mammalian spermatozoon with particular reference to guinea pig. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 67: 279-296.
- Fawcett, D. W. 1975. The mammalian spermatozoon. *Developmental Biology* 44: 394-436.
- Fawcett, D. & R. D. Hollenberg. 1963. Changes in the acrosome of Guinea pig spermatozoa during passage through the epididymis. *Z. Zellforsch* 60: 276-292.
- Fawcett, D. & S. Ito. 1965. The fine structure of bat spermatozoa. *Am. J. Anat.* 116: 567-610.
- Holstein, A. F. 1977. La diferenciación de las espermátides en el hombre normal y en pacientes infértiles. *Rev. Microsc. Elec.* 4: 89-95.
- Moses, M. J. 1977. Synoptonemal complex kariotyping in spermatocytes of the chinese hamster. *Chromosoma (Berl.)* 60: 99-125.
- Orgebin-Crist, M. C. 1967. Maturation of spermatozoa in the rabbit epididymis: delayed fertilization in does inseminated with epididymal spermatozoa. *Ann. Biol., Animale Biochim. Biophys.* 7: 373-392.
- Orgebin-Crist, M. C. 1969. Studies on the function of epididymis. *Biol. Reprod. Suppl.* 2: 1-13.
- Pedersen, H. 1979. Observations on the axial filament complex of the human spermatozoan. *J. Ultrastruct. Res.* 33: 451-461.
- Solari, A. J. 1977. Synoptanemal complex kariotyping in melanoplus differentialis. *J. Cell. Sci.* 26: 229-250.
- Solar i, A. J. 1979. Autosomal Synoptanemal complex and sexchromosomes without axes in *Triatoma infestans* (Ruduviidae; Hemiptera). *Chromosoma (Berl.)* 72: 225-240.
- Ureña, F. & Jollyanna Malavasi. 1978. Evolución de la ultraestructura del aparato de Golgi durante la meiosis y la espermiogénesis en el hamster. (*Mesocricetus auratus*). *Rev. Biol. Trop.* 26: 371-383.