

DIMENSIONES DE LAS FIBRAS DENSAS EXTERNAS DEL FLAGELO ESPERMÁTICO CAPRINO (*Capra hircus*)

Faisal F¹, Laplace R², Soto AT³, Migliorisi L³, Gómez V³, Jurado S¹

¹Servicio Central de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.²Jardín Zoológico y Botánico de La Plata, Municipalidad de La Plata. ³Catedra de Reproducción Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. ffaisal@fcv.unlp.edu.ar

Resumen: Las fibras densas (FD) externas forman parte del flagelo espermático y cumplen la función de dar flexibilidad a la cola junto con la vaina fibrosa. El objetivo del presente trabajo fue determinar si existen diferencias en el diámetro de las FD a lo largo de la pieza intermedia del flagelo de los espermatozoides de machos cabríos de Camerún, para poder identificar en los cortes transversales las gotas citoplasmáticas proximales de aquellas en posición distal. Para la determinación de los diámetros de las FD se observaron cortes longitudinales espermáticos por medio de microscopía electrónica de transmisión. El diámetro promedio de las FD medidos en la porción proximal y distal de la pieza intermedia fue de 92.6 nm y 49 nm, respectivamente ($p < 0,001$). Esta diferencia dimensional en el diámetro de las FD entre las dos porciones permitiría establecer la posición de la gota citoplasmática en los cortes transversales de espermatozoides caprinos mediante microscopía electrónica y clasificar la morfoanomalía espermática en primaria o secundaria.

Palabras clave: espermatozoide, ultraestructura, fibra densa, macho cabrío.

DIMENSIONS OF THE OUTER DENSE FIBERS OF THE BUCK SPERMATIC FLAGELLUM (*Capra hircus*)

Abstract: Outer dense fibers (DF) are part of the spermatic flagellum and it giving flexibility to the tail together with fibrous sheath. Dimensional differences both in diameter as can be seen in its structure. Based on sperm extractions of Cameroon goats male sperm obtained samples, the objective of this work was the find significant differences in the diameter of the DF between the proximal and distal part of the middle piece of the flagellum to identify cross-sections observed the transmission electron microscope, proximal cytoplasmic droplet (primary abnormalities) and distal cytoplasmic drops (secondary abnormalities). According to data obtained there significant dimensional differences between DF proximal and distal portions of the middle piece, which lets you determine the position of the cytoplasmic droplet in cross-sections of caprine sperm using electron microscopy and classify the source of the droplet in primary or secondary.

Key words: spermatozoa, ultrastructure, goat.

INTRODUCCIÓN

En el proceso de espermatogénesis, las células espermáticas experimentan complejas transformaciones morfológicas que culminan entre otras, con la condensación del núcleo, la formación del axonema, el ordenamiento de las mitocondrias en la pieza intermedia, y la síntesis y ensamble de las estructuras fibrosas accesorias del flagelo, tales como las fibras densas (FD) externas y la vaina fibrosa (11, 6).

El flagelo de la célula espermática está organizado en tres piezas, intermedia, principal y terminal, cada una con una composición estructural diferente. La estructura interna del flagelo espermático es muy similar al de las cilias y flagelos de otras células y organismos. El axonema central consiste en un par de microtúbulos rodeado por nueve dobletes de microtúbulos, en un modelo que parece haberse conservado a través de la evolución (10). El axonema que contribuye a la motilidad del flagelo, está rodeado por nueve FD externas y por la vaina fibrosa (1). La pieza intermedia contiene una vaina mitocondrial que rodea las FD asociadas con los nueve dobletes, mientras que en la pieza principal, la vaina fibrosa está organizada en dos columnas longitudinales, puentes semicirculares que rodean a las FD externas y el resto del axonema (8). La vaina fibrosa y las FD cumplen un papel en la motilidad flagelar al controlar la flexibilidad del mismo de manera mecánica (4).

La presencia de las nueve fibras densas externas alrededor del axonema (9+9+2), es característica en la mayoría de las especies animales con fertilización interna, diferenciándose en la forma y en el diámetro al corte transversal (5). En muchas especies, las tres fibras con los números 1, 5 y 6 son más grandes (5). Cada FD está unida en la parte superior a las columnas estriadas y al *capitulum* de la pieza de conexión, cuello, dirigiéndose longitudinalmente hacia caudal de manera cercana al doblete correspondiente del axonema (7).

Estas fibras llegan a ser menos visibles a nivel de la pieza principal y no están presentes en la pieza terminal (12).

Aunque hay una variación muy pequeña entre los mamíferos en la estructura básica del flagelo del espermatozoide hay diferencias en el tamaño inicial de estas fibras y a lo largo de ellas (3). Las fibras son siempre más gruesas en la parte proximal de la pieza intermedia y disminuyen progresivamente en diámetro hacia la pieza principal. En el hombre, el mono y el murciélago son relativamente pequeñas en su base, se afinan rápidamente hacia abajo y culminan cerca de la mitad proximal de la pieza principal (3). En la rata, el hámster, el conejillo de Indias, la ardilla (3) y la cabra (2) las fibras externas son considerablemente grandes al principio, disminuyendo el diámetro gradualmente y extendiéndose a través de toda la longitud de la pieza principal (3) y (9).

El objetivo de este trabajo fue determinar el diámetro de las FD entre la porción proximal y distal de la pieza intermedia del flagelo con el propósito de identificar en los cortes transversales de los flagelos la ubicación de las gotas citoplasmáticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron machos cabríos adultos enanos de Camerún (*Capra Hircus*) (n=5) clínicamente sanos, de 30- 35 Kg de peso vivo. La obtención de los eyaculados se realizó con un electroeyaculador (Original Electronic Siremaster Eyaculator[®], Ice Company) mensualmente durante un año. Para la evaluación ultraestructural, la muestra de semen fue fijada en glutaraldehído al 2% (LADD[®]) por 2 horas a 4°C y centrifugados a 1.500 rpm durante 15 min. Los pellets obtenidos se fijaron en tetróxido de osmio al 1% (LADD[®]), se deshidrataron en una batería de concentraciones crecientes de alcoholes (50, 75, 80, 90 y 100°) y en acetona. Finalmente, se infiltraron en resina epoxi (Epon[®]). Los cortes semifinos de 3 µm se realizaron en

el ultramicrotomo (Reichert- J Modelo SuperNova[®]) y teñidos con azul de Toluidina (Chromo[®]). Los mismos se observaron en un microscopio óptico como orientación de campo. Los cortes ultrafinos de 60 nm se obtuvieron con el ultramicrotomo y montados sobre grillas de cobre. El contraste se realizó con acetato de uranilo y citrato de plomo (LADD[®]). La observación y la evaluación de la ultraestructura espermática se realizaron mediante un microscopio electrónico de transmisión (MET) Jeol JEM 1200 EX II (Japón) del Servicio Central de Microscopía Electrónica de la Facultad de Cs. Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

Los diámetros de las FD a nivel de la porción proximal y distal de la pieza intermedia se midieron en cortes longitudinales (n=100) del axonema de espermatozoides normales. Para obtener las medidas se utilizó la escala graduada de la pantalla del MET.

El análisis estadístico se realizó utilizando el análisis de varianza (ANOVA) y el test de Tukey de comparaciones múltiples mediante el programa SPSS 11.5.

RESULTADOS

El diámetro promedio de las fibras densas fue de 92,6 nm y 49 nm ($p < 0,001$) respectivamente para la porción proximal y distal en los cortes longitudinales espermáticos.

La ultraestructura del flagelo espermático se mantuvo conservada tanto en los espermatozoides normales como en aquellos que poseían gota citoplasmática independientemente de su ubicación flagelar (Foto 1, 2 y 3).

DISCUSIÓN

De acuerdo a los datos obtenidos, existe una diferencia dimensional significativa entre las FD de las porciones proximal y distal de la pieza intermedia los machos

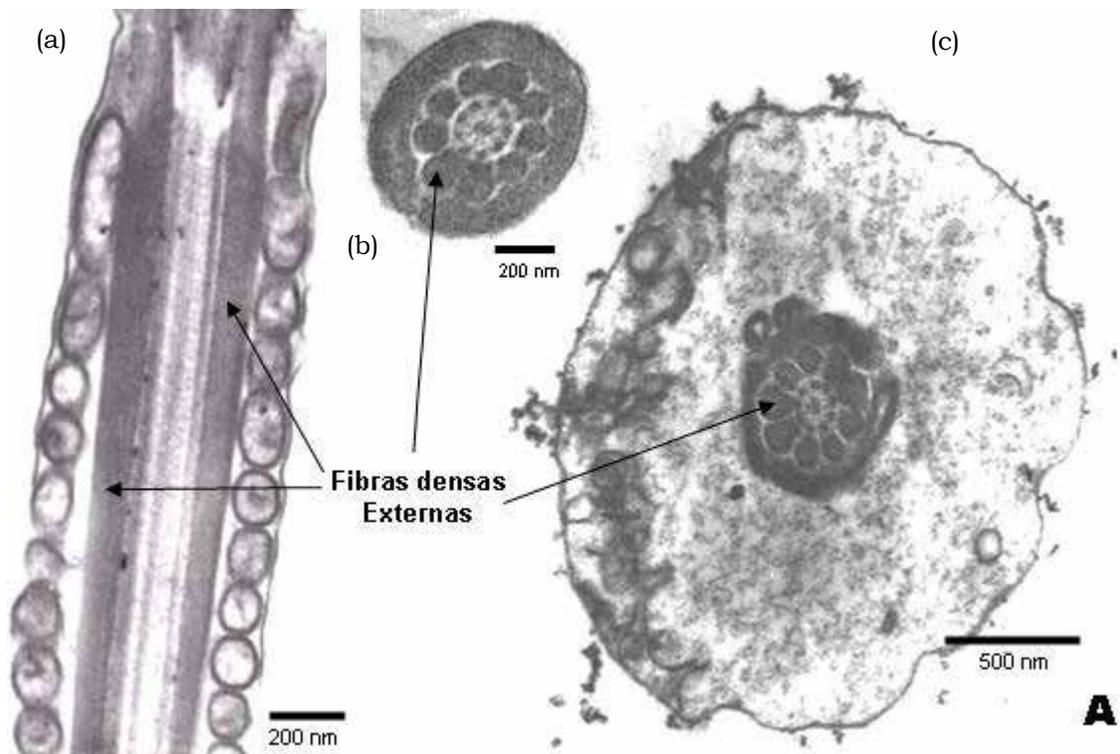


Foto 1. Corte longitudinal (a) y cortes transversales de un flagelo normal (b) y con presencia de una gota citoplasmática (c) de la porción proximal de la pieza intermedia del flagelo espermático.

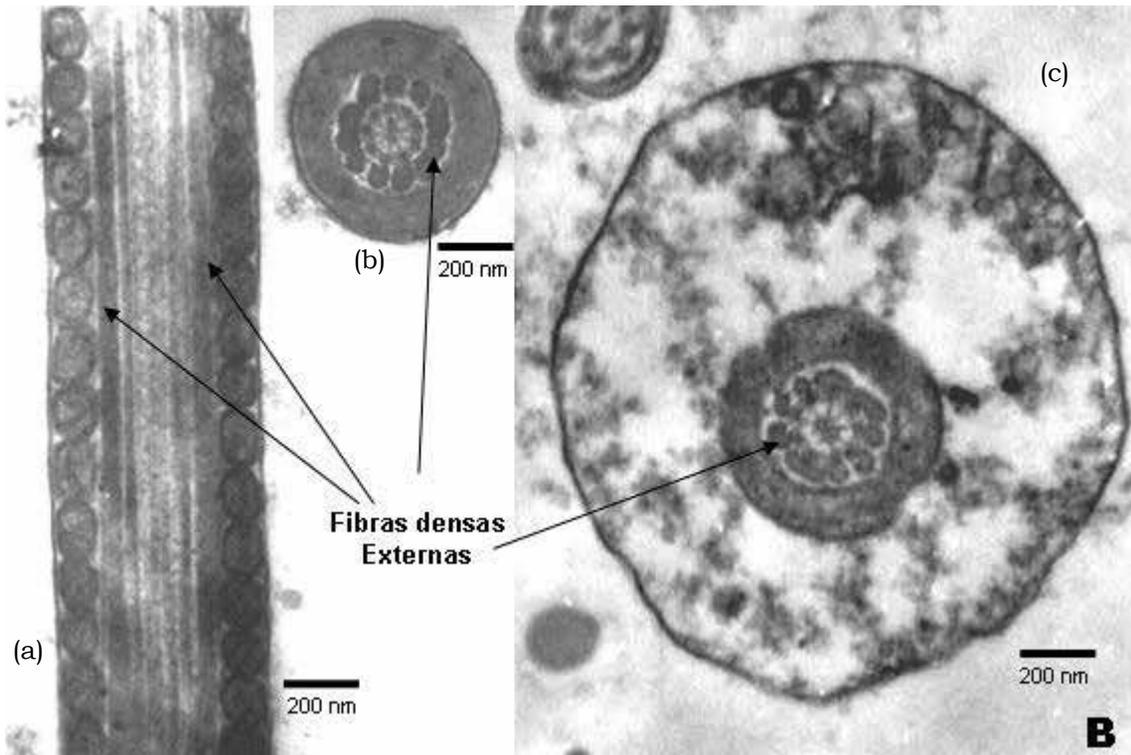


Foto 2. Corte longitudinal (a) y cortes transversales de un flagelo normal (b) y con presencia de una gota citoplasmática (c) de la porción distal de la pieza intermedia del flagelo espermático.

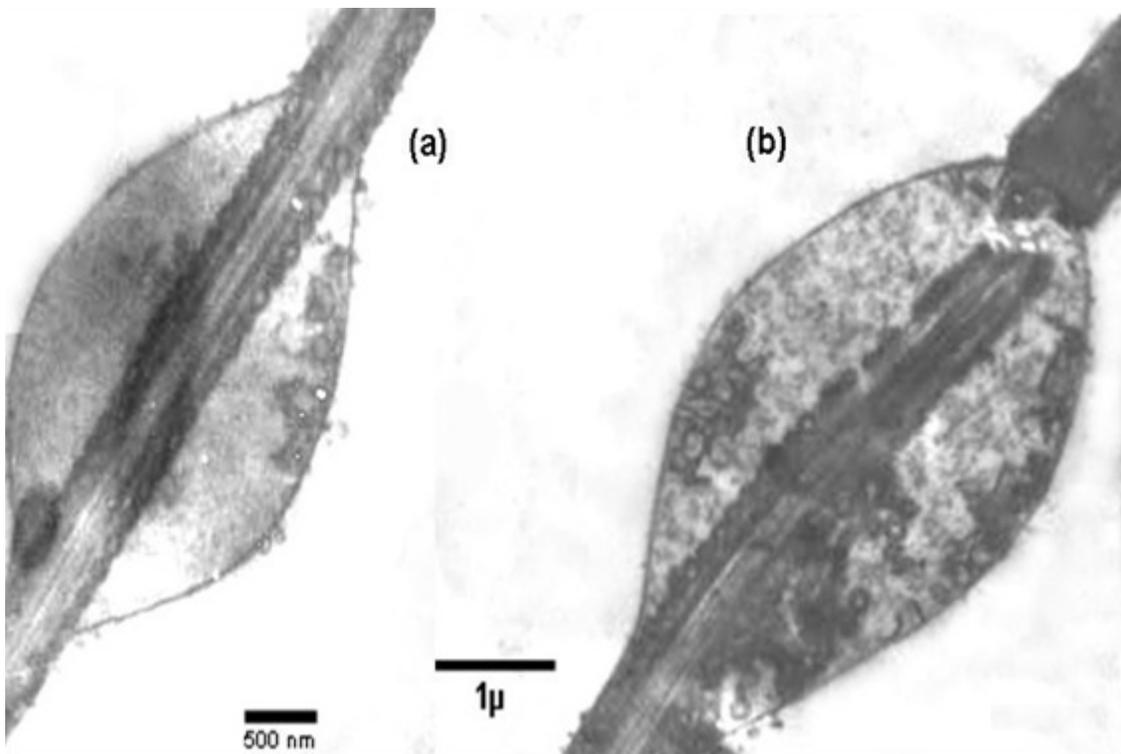


Foto 3. Cortes longitudinales de flagelos espermáticos con presencia de gota citoplasmática en la porción distal (a) y proximal (b) de la pieza intermedia.

cabríos enanos de Camerún, coincidente con las descripciones de la mayoría de las especies mamíferas (3) y (2). Este hallazgo permite determinar la posición de la gota citoplasmática en los cortes transversales de espermatozoides caprinos mediante microscopía electrónica de transmisión. La ubicación de la gota citoplasmática en el flagelo espermático es importante para establecer el tipo de morfoanomalía espermática por su origen (primario o secundario), ya que la fertilidad potencial del semen evaluado depende, entre otros factores, de la proporción de las anomalías primarias o secundarias halladas.

CONCLUSIONES

La diferencia de dimensiones del diámetro de las FD entre las porciones proximal y distal de la pieza intermedia, permitiría establecer la posición de la gota citoplasmática en los cortes transversales y clasificar la morfoanomalía espermática en primaria o secundaria de los espermatozoides del macho cabrío de Camerún (*Capra hircus*) y la especie caprina en general, ya que la descripción de la ultraestructura de responde al patrón general descrito para los espermatozoides de los rumiantes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Eddy EM, Toshimori K, O'Brien DA. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc.* 2003; *Res. Tech.* 61: 103-115.
2. Faisal F, Laplace R, Soto AT, Migliorisi L, Gómez V, Jurado S. Ultraestructura Del Espermatozoide Del Macho Cabrío Enano Africano (*Capra hircus*). *Analecta Vet* 2011; 31 (1): 31-35.
3. Fawcett D. W. A Comparative View of Sperm Ultrastructure1. *Biology Of Reproduction Supplement* 1970: 2, 90-127.
4. Fawcett D.W. The mammalian spermatozoon. 1975; 44, 394-436.
5. Fawcett D. W. *The Cell.* 1981, 14: 604-606.
6. Kasuo Inaba. Katsutoshi Mizuno. Sperm dysfunction and ciliopathy. *Reprod Med Biol* 2016; 15: 77-94
7. Oko R. Clermont Y. Mammalian spermatozoa: structure and assembly of the tail. In *Control of sperm Motility: Biological and Clinical aspects.* Edi-

torial C. Gagnon, 1990; 3-27, CRC Pres, Boca Ratón.

8. Oko R. Occurrence and formation of cytoskeletal proteins in mammalian spermatozoa. *Andrologia* 1998; 30: 193-206.
9. Pesch S, Bergmann M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Review Micron* 2006; 37: 597-612.
10. Toshimori K. Maturation of mammalian spermatozoa: modifications of the acrosome and plasma membrane leading to fertilization. *Cell Tissue Res.* 293: 177-187.
11. Vera JC, Brito M, Burzio L0. Biosynthesis of Rat Sperm Outer Dense Fibers during Spermiogenesis. In *Vivo Incorporation of [3 H] Leucine into the Fibrillar Complex.* *Biology of Reproduction* 1987; 36: 193-202.
12. Wu S. H., Newstead J. D. Electron Microscope Study Of Bovine Epididymal Spermatozoa. *J Anim Sci.* 1966; 25:1186-1196.