

L533

e 1

"CARACTERIZACION DEL COMPLEJO DNA-PROTEINAS DEL NUCLEO DE
ESPERMATOZOIDES DE MAMIFEROS EUTERIANOS : ASPECTOS
CITOQUIMICOS Y ULTRAESTRUCTURALES"

TESIS

PRESENTADA A LA

UNIVERSIDAD DE CHILE

EN CUMPLIMIENTO PARCIAL DE LOS REQUISITOS

PARA OPTAR AL GRADO DE

MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS CON MENCIÓN EN

BIOLÓGIA CELULAR

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y FARMACÉUTICAS

SYLVIA LEIVA COFRE

DIRECTOR DE TESIS: PROF. DR. EDUARDO BUSTOS-OBREGON

- 1981 -

Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas

Universidad de Chile

I N F O R M E D E A P R O B A C I O N

T E S I S D E M A G I S T E R

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magister presentada por la candidata

Sylvia Leiva Cofré

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para el grado de Magister en Ciencias Biológicas con Mención en Biología Celular, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 28 de Enero de 1982

Director de Tesis

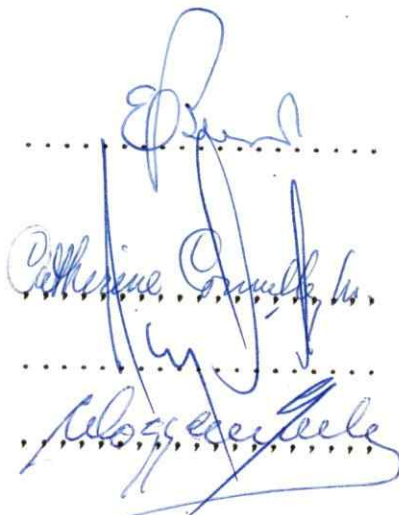
Prof. Dr. Eduardo Bustos=Obregón

Comisión Informante

Prof. Dra. Catherine Connelly

Prof. Dr. Jorge Garrido

Prof. Dr. Carlos Doggenweiler


.....
.....
.....
.....

28-I-82

Esta tesis fué realizada en el
Departamento de Biología Celular
y Genética de la Facultad de Medicina
de la Universidad de Chile, bajo
la dirección del Profesor Dr.
Eduardo Bustos-Obregón, y financiada
por los Proyectos B-407-8133 del
Servicio de Desarrollo Científico
Universidad de Chile y Prog. Mult.
Biol. Repr. Cel. (OEA).

Deseo expresar mi reconocimiento y gratitud:

Al Dr. Eduardo Bustos-Obregón por su especial preocupación y paciencia, constante apoyo y valiosas críticas .

Al Sr. Alejandro Guadarrama, Tecnólogo Médico (Jefe del Laboratorio de Análisis de Semen del Depto. de Biología Celular y Genética) por su valiosa colaboración en la selección de muestras.

Al Sr. Adolfo Acosta por la recopilación de los datos de los pacientes cuyas muestras fueron utilizadas en este trabajo.

Al Sr. Humberto Martínez, por su colaboración en la obtención de cortes finos para el estudio de microscopía electrónica.

Al Sr. Héctor Muñoz por su valioso aporte en la confección de las fotografías.

Al Sr. Victor Monasterio por el apoyo recibido durante las sesiones de microscopía electrónica.

Al Dr. Doggenweiler Jefe de la Unidad de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias por las facilidades dadas para realizar parte del estudio de microscopía electrónica, utilizando el Microscopio Phillips M-200.

Al Dr. J. Pereda y Dr. J. Posada del Depto. de Embriología de la Facultad de Medicina, Area-Sur, por las facilidades para utilizar el microscopio electrónico y así poder realizar la mayor parte del estudio a nivel de ultraestructura.

A la Sra. Natacha Salgado por su dedicación y paciencia en la transcripción de esta Tesis.

A todos mis colegas de trabajo que en alguna forma me estimularon y facilitaron la realización de este trabajo.

A mis seres queridos...



I N D I C E

	Pag.
1.- <u>INTRODUCCION Y REVISION BIBLIOGRAFICA.</u>	1
1.1 Estado actual del problema.	11
2.- <u>MATERIAL Y METODOS.</u>	
2.1. Estudio morfológico en microscopía óptica: caracterización de la esta- bilidad del complejo ADN/Proteínas sulfidriladas del núcleo del esperma- tozoide.	14
2.2. Estudio Citoquímico y citofluorométrico de la reacción de Feulgen con reducción de -S-S-.	17
2.3. Determinación de proteínas totales por citofluorometría.	20
2.4. Determinación de la relación ADN/Proteí- nas totales por citofluorometría.	21
2.5. Determinación de Histonas. Cuantificación por citofluorometría.	22
2.6. Determinación de la relación ADN/Histonas.	23
2.7. Determinación de la relación Proteínas totales/Histonas.	23

	Pág.
2.8. Caracterización del empaquetamiento de la cromatina: Estudio citoquímico ultraestructural.	23
3.- <u>RESULTADOS.</u>	
3.1. Estudio del empaquetamiento de la cromatina: Análisis en microscopía óptica.	27
3.2. Cuantificación del ADN por citofluorometría.	30
3.3. Cuantificación de ADN y proteínas por citofluorometría.	32
3.4. Relación ADN/Proteínas totales.	34
3.5. Determinación de histonas por citofluorometría; extracción del ADN.	36
3.6. Relación ADN/Histonas.	38
3.7. Relación proteínas totales/histonas.	39
3.8. Caracterización ultraestructural del empaquetamiento de la cromatina.	40
3.9. Patrón de distribución de proteínas sulfidriladas en normo y teratospérmicos.	48
3.10. Controles de la reacción.	49
4.- <u>DISCUSION.</u>	
4.1. Decondensación nuclear.	50
4.2. Citoquímica y citofluorometría del núcleo del espermatozoide.	55

4.3. Citoquímica y citofluorometría de proteínas en general e histonas.	Pág. 59
4.4. Grupos sulfidrilos y organización de la cromatina.	64
5.- <u>CONCLUSIONES.</u>	71
6.- <u>RESUMEN.</u>	75
7.- GRAFICOS	76
TABLAS	96
FIGURAS	104
8.- <u>BIBLIOGRAFIA.</u>	123

1.- INTRODUCCION Y REVISION BIBLIOGRAFICA

1.- INTRODUCCION Y REVISION BIBLIOGRAFICA

Al término de la meiosis la espermatida, célula haploide masculina, sufre la transformación y diferenciación de sus estructuras para dar origen a una célula especializada, el espermatozoide. Este proceso llamado espermiogénesis o espermatoteleosis ha sido estudiado en una serie de organismos.

En mamíferos euterianos, se han detectado cambios en la morfología y composición química del núcleo; éste se va condensando progresivamente durante los estados de la espermiogénesis, transformándose en un núcleo extremadamente condensado que está presente en el espermatozoide maduro (Fawcett, 1958, 1970; Kretser, 1969; Fawcett y Phillips, 1970; Holstein, 1976). Modificaciones profundas se han evidenciado en el contenido de las nucleoproteínas de las espermatidas durante los estadios finales de la espermiogénesis de una serie de mamíferos, incluyendo el hombre (Vendrelly y cols., 1957; Monesi, 1965; Gledhill y cols., 1966; Gledhill, 1970; Meistrich y cols., 1976; Grimes y cols., 1977).

El estado final de la condensación de la cromatina es aparentemente debido al reemplazo de histonas de tipo somático por histonas básicas, propias del espermatozoide, las cuales se unen firmemente al ADN de la espermatida. (Davis

y Langford, 1970).

La estructura de la cromatina de células somáticas está determinada, en gran parte, por proteínas básicas llamadas "histonas" responsables de la compactación del ADN en el núcleo. Estas moléculas conforman una estructura denominada "nucleosoma", la sub unidad fundamental de la cromatina; los nucleosomas se empaquetan en niveles estructurales más complejos determinando fibras de grosor diferente (10-20-30 o más nm.) dependiendo del estado de mayor empaquetamiento que alcanza la fibra de cromatina (Felsenfeld, 1978; Kornberg, 1981).

Las histonas somáticas las designamos H_2^A y H_2^B ricas en lisina y las H_3 y H_4 ricas en arginina, las cuales constituyen la estructura central del nucleosoma. La histona H_1 la más básica, muy rica en lisina, no forma parte del nucleosoma, está asociado a él.

El reemplazo de las histonas somáticas por las específicas del espermatozoide, entre otras razones, favorecerían la condensación del material genético llevándolo a un estado metabólico inactivo (Block 1969; 1976).

Las proteínas presentes en el espermatozoide además de tener un alto contenido en arginina y lisina, en mamíferos euterianos poseen proteínas ricas en cisteína (protaminas), (Bellve y cols., 1975; Kistler y cols., 1973; Mayer y Zirkin, 1979; Lam y Bruce, 1971).

La condensación del núcleo produciría la disminución en volumen del espermatozoide. Además de ser una ventaja para el desplazamiento, se cree que en este estado físico-químico el genoma está protegido contra daño físico o mutagénesis química que puede ocurrir durante su transporte al sitio de fertilización.

El núcleo de la espermátida gradualmente toma la forma característica de la especie durante el proceso de condensación, sugiriéndose la posibilidad de que la forma del núcleo esté en relación con la reorganización nucleoplásmica. Existe gran variedad de formas, siendo la forma globular común entre los peces y la ovoide entre los mamíferos, pero pueden haber variaciones de forma del núcleo y del acrosoma que son características de determinado orden, familia o de una especie (Fawcett y cols., 1971).

Los factores que modulan o determinan la forma del núcleo podrían ser externos, esto es, fuerzas morfogenéticas que actuarían sobre él, o ella estaría definida por determinantes intrínsecos al propio núcleo.

Fawcett y cols., (1971) consideran que la forma de la cabeza del espermatozoide en mamíferos y otras especies estaría más bien determinada por factores intrínsecos al núcleo, que genéticamente controla el patrón de agregación del ADN y proteínas durante la condensación de la cromatina.

Variaciones en el patrón específico de ensamblaje del complejo ADN-proteínas o ADN y el contenido de proteínas pueden afectar la forma y el tamaño de la cabeza del espermatozoide.

Holstein (1976) y Bartoov y cols., (1980) consideran que en la adquisición de la forma de la cabeza del espermatozoide estarían comprometidos dos sistemas de estructuras filamentosas; el primer sistema (sistema de filamentos finos) estaría relacionado con la formación del acrosoma y actúa en la célula de Sertoli hasta el momento de la espermiación. El segundo sistema (sistema de microtúbulos) es el descrito como "manchette", que se conecta con los bordes del acrosoma, en el estado 2, de acuerdo a clasificación de Holstein (1976). Estos filamentos jugarían un rol en el sentido de inducir la elongación de la porción más caudal del núcleo, modelando la curvatura final de la cabeza del espermatozoide.

Modificaciones en la acción de estos dos sistemas filamentosos podrían ser en parte causa de malformaciones en el espermatozoide humano.

Bartoov y cols., (1980) también postulan que el contenido de la cromatina nuclear podría afectar la forma de la cabeza. Por ejemplo, cuando la disminución del contenido de la

cromatina es concomitante con una función anormal de los sistemas de filamentos y túbulos, pueden producirse variadas formas llamadas "amorfos".

La espermiogénesis está esencialmente completada al momento de la espermiación pero, sin embargo, otros cambios son detectables en los espermatozoides de algunas especies cuando éstos pasan a través del epidídimo; así por ejemplo, el desplazamiento de la gota citoplasmática, modificaciones morfológicas a nivel del acrosoma y de las membranas ubicadas en la cabeza del espermatozoide (Fawcett y Hollenberg, 1963; Fawcett y Phillips, 1969; Bedford y Nicander, 1971; Bedford y cols., 1973a; Olson y Hamilton (1976); Arrau y cols., 1981).

Además de los cambios morfológicos detectables, en la vía epididimaria los espermatozoides experimentan una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos que les confieren la capacidad de fecundar el huevo (Bedford, 1966; Orgebin-Crist, 1967; 1968 Orgebin-Crist y cols., 1975; Bedford, 1975; Hamilton, 1975; Bedford y Cooper, 1978); el tipo y la naturaleza de los factores que están comprometidos en el proceso que le confiere la capacidad de fertilizar son solo parcialmente conocidos y bastante difíciles de interpretar, especialmente en el hombre. (David y Cols., 1972; Saupart, 1976).

Se conocen algunos hechos que están referidos a la adquisición de la motilidad por parte del espermatozoide, cambios en la resistencia a shock con baja temperatura y a álcalis (Bedford, 1965; Orgebin-Crist, 1967) y modificaciones de la superficie celular del espermatozoide (Bedford y Cooper, 1976).

Entre estas modificaciones se incluyen cambios en el aspecto ultraestructural de la membrana plasmática (Bedford y Nicander, 1971; Olson y Hamilton, 1978); cambios en las cargas de la superficie (Bedford, 1963; Cooper y Bedford, 1971; Flechon, 1975; Holt, 1980); cambios en la distribución y/o abundancia de receptores de lectinas (Gordon y col., 1974; Nicolson y cols., 1977; Fournier-Delpech y cols., 1977; Olson y Hamilton, 1978; Nicolson y cols., 1979; Olson y Danzo, 1981); cambios en la antigenicidad de la membrana, que reflejarían un cambio de antígenos de origen testicular por otros producidos en el epidídimo (Olson y Hamilton,

Kohane y cols., 1979), los que podrían determinar diferencias en las membranas entre espermatozoides maduros e inmaduros.

Con métodos citoquímicos se ha podido detectar cambios importantes en el núcleo celular referido a la reactividad

del ADN frente a la reacción de Feulgen.

Se ha detectado una progresiva reducción de la intensidad de la reacción de Feulgen (Gledhill y cols., 1966; Bouter y cols., 1967 a,b; Gledhill, 1970; Ringertz y cols., 1970; Dalck, 1973; Bustos-Obregón y cols. 1978; Bustos-Obregón, 1980) a medida que el espermatozoide va desplazándose por la vía epididimaria, indicando que la composición bioquímica y el estado físico de la cromatina se ha modificado y está influyendo sobre la capacidad de unión colorante/ADN.

Ha sido demostrado por varios autores tanto en núcleos como en modelos ("films") que el grado de condensación de la cromatina modifica la estequiometría de la reacción de Feulgen (García, 1970; Noeske, 1971; Duijndam y van Duijn, 1975; Kjellsterand y Anderson, 1975a y b; Anderson, 1975 1976).

Las variaciones detectadas en la reactividad del ADN del núcleo del espermatozoide se han relacionado con una modificación en el complejo ADN/proteínas, posiblemente debido a un incremento de enlaces -S-S- formados en o entre las proteínas nucleares (Esnault, 1973).

Este mismo fenómeno ha sido observado en espermatozoides envejecidos "in vivo" o "in vitro" (Bouters y cols., 1967 a y b.

Salisbury y cols., 1961;1964; Hanada y cols., 1965; Todorovic y cols., 1969; Perez-Sampallo, 1980; Bustos- Obregón y Perez-Sampallo, 1980).

Sin embargo, el aspecto del núcleo de espermatozoides normales observados a nivel de ultraestructura permanece constante desde la espermiación hasta el momento de la fecundación (Barros y Franklin, 1968; Piko, 1969; Bedford, 1970).

Pedersen (1969,1970,1974) ha observado con cierta frecuencia una disminución en la densidad electrónica de la cromatina en espermatozoides de hombres infértiles, sugiriendo que ello puede ser evidencia de una cierta "inmadurez morfológica" de estos espermatozoides.

Algunos tipos de malformaciones nucleares observadas en microscopía de transmisión, no serían detectables por microscopía de luz ni microscopía de barrido como son las alteraciones de la cromatina (Internal Chromatin Disorder, "I.C.D.;") estas han sido detectadas en espermatozoides humanos y que se deberían a una "condensación incompleta de la cromatina".(Zamezuk, 1977; Bartoov y cols., 1980)

Se ha observado en el hombre, la presencia de una cierta proporción de espermatozoides que tienen la cromatina de aspecto granular (heterogénea); este fenómeno ha permitido a Pedersen y Fawcett (1976) sugerir que la maduración normal

y la estabilización de la cromatina en el espermatozoide humano es menos completa que en otras especies.

La maduración espermática en mamíferos euterianos dependería, entre otros fenómenos, de la "condensación de la cromatina". Este es un proceso químico que comprende interacciones a nivel de macromoléculas, entre el ADN y proteínas básicas que forman complejos estabilizados por la formación de -S-S-.

Henricks y Mayer en 1967, aislaron y caracterizaron, en espermatozoides de bovino y porcino una proteína básica "semejante a la keratina," designada así porque solo fue posible aislarla si se rompían los enlaces -S-S- presentes en la proteína; la disrupción química de este componente semejante a la keratina permitía también el aislamiento del ADN en forma pura.

Posteriormente otros investigadores han tratado de aislar y caracterizar las proteínas básicas del núcleo de espermatozoides de varias especies de mamíferos (Coelingh y cols., 1969; Davis y Langford, 1970; Coelingh y cols. 1972; Balhorn y cols., 1977), incluyendo a espermatozoides humanos (Kolk y Samuel, 1975; Saowaros y Panyim, 1979).

En general, se han encontrado proteínas de bajo peso

molecular, altamente básicas, ricas en arginina y con contenido relativamente alto de cisteína, característica de proteínas propias de espermatozoides. (Calvin y Blean, 1974)

Durante la maduración espermática en mamíferos en general, se produciría un aumento de enlaces disulfuro, demostrable para un aumento en la resistencia a la decondensación provocada por agentes reductores de enlaces disulfuro, como se ha demostrado al utilizar SDS/DTT u otro tipo de reductor (Calvin & Bedford, 1971; Bedford y cols., 1973 b; Calvin y Bedford, 1974 ; Mahi y Yanagimachi, 1975; Gall y Ohsumi, 1976; Anderson, 1976; Saowaros y Panyim, 1979; Kuist, 1980; Zurkin y cols., 1980).

Este aumento de enlaces sería un factor muy importante en la estabilización de la nucleoproteína y posiblemente el grado de unión estaría regulado por el ambiente dado por el epidídimo (Bedford, 1966; Calvin y Bedford, 1971; Bedford y cols., 1972; Bedford y Calvin, 1974; Misestrich y cols., 1976).

Es evidente que el proceso de empaquetamiento iniciado en la espermiogénesis, estabilización de la nucleoproteína y maduración completa del espermatozoide con capacidad fertilizante, es mucho más complejo que un simple reemplazo de histonas por proteínas "específicas del espermatozoide" y la aparición de enlaces disulfuro responsables (en último término)

de la estabilidad de las nucleoproteínas adquirida durante la maduración.

Se ha sugerido que variaciones en el patrón específico de la asociación ADN/proteínas básicas podrían afectar el tamaño y la forma de la cabeza del espermatozoide (Fawcett y cols., 1971).

Los espermatozoides humanos en particular se caracterizan por mostrar una marcada heterogeneidad morfológica (Bar-toov y cols., 1980) que contrasta con la uniformidad de forma y estructura de los espermatozoides de otras especies estudiadas, incluyendo primates (Zamboni y cols., 1971).

1.1. Estado actual del problema.

No se ha demostrado aún si las anomalías morfológicas de los espermatozoides presentes en el semen humano se corresponden con núcleos cuya condensación y estabilización de la cromatina esté alterada, o están en relación a alteraciones en el contenido de ADN y/o proteínas. En espermatozoides humanos alargados ("tapered") la reactividad al Feulgen, citofotométricamente determinada, es significativamente inferior a las lecturas en núcleos de espermatozoides normotipo (Bustos-Obregón y López, 1976). Además se desconoce si

Los espermatozoides de formas o condensación de la cromatina anómalas son células incapaces de fecundar el huevo.

Por lo anteriormente expuesto, resulta evidente que es necesario comprobar: si las modificaciones que ocurren en los componentes de la cromatina del espermatozoide son detectables citoquímicamente, por la diferente reactividad del ADN y la estabilidad de la cromatina frente a extracción del ADN y reactividad de las proteínas presentes.

Si el estado final de madurez espermática corresponde a un "patrón constante", detectable no solo en la morfología general de la célula sino también en el grado de empaquetamiento y distribución de la cromatina en el núcleo del gameto y más específicamente, en la presencia de SH, no demostrado aún en forma directa, que asegure el empaquetamiento y estabilidad de la nucleoproteína como un posible mecanismo de protección del genoma.

Para el estudio planteado, se utilizaron variados métodos y situaciones experimentales, siendo las más importantes:

- 1.- Reacciones citoquímicas para ADN con y sin reducción de enlaces S-S, proteínas e histonas, y su cuantificación por citofluorometría.
- 2.- Decondensación "in vitro", con posterior estudio de liberación de grupos SH observados a nivel de micros-

copía electrónica (M.E.).

- 3.-Caracterización de la cromatina y regionalización nuclear en relación a presencia de grupos SH, analizados ultraestructuralmente.

2.- MATERIAL Y METODOS

2.- MATERIAL Y METODOS

Las muestras de semen fueron obtenidas en el Laboratorio de Análisis de Semen del Departamento de Biología Celular y Genética, y provienen de pacientes consultantes del Policlínico de Infertilidad Conyugal del Hospital José Joaquín Aguirre.

Muestras de más de 35 pacientes fueron seleccionadas por el espermiograma de acuerdo al estudio a realizar. Del espermiograma se tomó en cuenta fundamentalmente dos aspectos :

1) Recuento de espermatozoides; que se realiza en una cámara hemocitométrica de Neubauer.

2) Morfología; para su estudio se hacen frotis que se desecan al aire, luego se fijan en una solución de metanol-acético (3:1) y posteriormente se tiñen con hematoxilina-eosina (para la morfología espermática consultar la Fig. 1 a y b).

2.1. Estudio morfológico en microscopía óptica :

Caracterización de la estabilidad del complejo ADN/Proteínas sulfidriladas del núcleo del espermatozoide.

2.1.1. Decondensación "in vitro", según método de Calvin y Bedford (1971).

Con el objeto de conocer y analizar la respuesta a reductores corrientemente empleados como es el ditio-

treitol (DTT) asociado al dodecil sulfato de sodio (SDS), se incubaron muestras de semen (con 63-69% de normoespermia) en diferentes concentraciones de SDS y por diferentes tiempos, como se indica a continuación :

<u>SDS % p/v</u>	<u>Tiempo (min)</u>
0.01	8-10 -15'
0.05	8-10'
0.5	6- 8-10

El esquema general utilizado es el siguiente :

1. El semen se lava en suero fisiológico 2-3 veces, para lo cual se centrifuga a 760 g por 10 min. cada vez.
2. Incubación en diferentes tiempos en SDS y DTT a temperatura ambiente; el SDS se disuelve en tampón borato 0.05 M a pH 9, en las concentraciones indicadas, a la cual se le agrega el DTT en concentración de 2 mM.
3. Se observa en microscopio de fases contrastadas y se detiene el proceso de decondensación colocando el tubo con el material de estudio en hielo (0-4°C).
4. Se lava (2-3 veces) con suero fisiológico frío, centrifugando a 760 g por 5' cada vez.

5. Confección de frotis y fijación de éstos en metanol-acético.
6. Tinción morfológica con hemateína.

2.1.2. Decondensación "in vitro" con tioglicolato de sodio:

A espermatozoides humanos (10 muestras) se aplicó como reductor el tioglicolato de sodio de acuerdo al siguiente esquema :

1. El semen se lava en suero fisiológico 2 a 3 veces, para lo cual se centrifuga a 760 g por 10 min. cada vez.
2. Confección de frotis y fijación en metanol-acido acético glacial (3:1) o formol al 10%
3. Incubación de los frotis de espermatozoides en tioglicolato de Na⁺ a pH 9, y temperatura ambiente, durante varios tiempos hasta obtener un óptimo de decondensación (4 5 6 8 y 10 minutos).
4. Detención en frío, lavar y centrifugar.
5. Tinción morfológica.

2.2 Estudio citoquímico y citofluorométrico de la Reactividad del Feulgen en presencia de un agente reductor de grupos ditiolos.

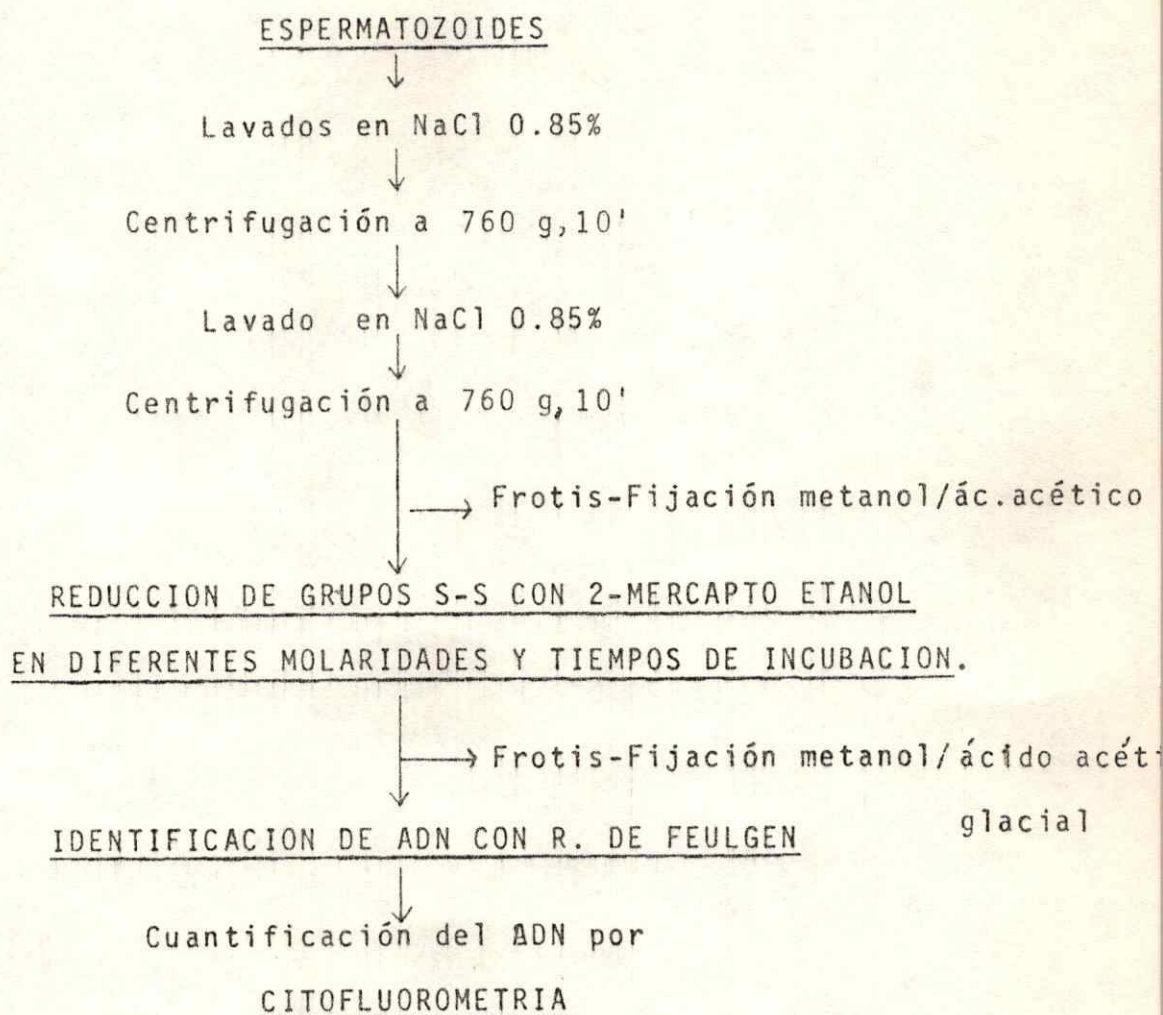
Se ideó un método en el cual se combinó la reacción de Feulgen fluorescente (standard) según Prenna y cols.

(1974) y según Anderson (1976), en el cual se agrega al medio de hidrólisis el 2-mercapto etanol (2-ME) como reductor de enlaces disulfuro. El método standard (control)* consiste en incubar con HCl 4N y sin reductor por 60 minutos a 28°.

Las incubaciones en el medio de hidrólisis más el reductor se realizaron "in vitro" o en frotis de espermatozoides previamente fijados. Se varió la concentración del HCl, del 2-ME y el tiempo de hidrólisis en las siguientes combinaciones :

HCl		MERCAPTO ETANOL		
(CONC)	N	CONCENTRACION	TEMPERATURA	TIEMPO INCUBACION
1)*	4 N	—	28°	60'
2)	4 N	0,01 M	28°	40' -60' -80'
3)	4 N	0,1 M	28°	20' -40' -60'
4)	4 N	0,5 M	28°	20' -40' -60'
5)	1 N	1 M	48°	10' -20' -30'

La metodología general utilizada es la siguiente :



Se utilizaron los siguientes controles exigidos en Citoquímica y Citofluorometría :

1. Preparado (sin hidrólisis) incubado en agua destilada más Reactivo de Schiff.
2. Preparado sin hidrólisis y sin Schiff (autofluorescencia).

La cuantificación del ADN se realizó por citofluorometría en un Citofluorómetro Zeiss modelo 0.1 con el "Set de filtros Zeiss" para reacción de Feulgen (BP 546, FT 580 y LP 590), siendo BP 546 el filtro excitador.

Se midieron espermatozoides de forma normal oval y anormales; éstos arbitrariamente se agruparon en dos clases :

Teratospérmicos esféricos (T. esf.) y Teratospérmicos alargados (T. alarg.). En los T. esféricos se han incluido microcefálicos y algunos tipos de amorfos; en los T. alargados se incluyó los puntiagudos y algunos tipos de amorfos y juveniles (ver morfología de espermatozoides en Fig. 1) según la clasificación propuesta para el análisis del semen humano: Joel y Botella-Llusia (1971); Eliasson (1973) y Sans (1976).

Se midieron al menos 50 espermatozoides de las 3 clases descritas en cada muestra y en cada situación experimental.

A los valores obtenidos se les aplicó cálculo estadístico para obtención de la media (\bar{X}), desviación estandard (DS) y error estandard (ES).

2.3. Determinación de Proteínas Totales.

Se preparan los frotis de espermatozoides como en 2.2. y se utiliza el método de Leeman y Ruch (1972) para la identificación de grupos NH_2 de las proteínas en la siguiente forma :

- 1) Espermatozoides fijados se someten a una incubación con ácido tricloroacético (TCA) según Ruch y Leeman (1973) durante 2, 3 y 3,5 hrs. Se considera 0 hora a las muestras sin tratamiento.
- 2) Incubar en Sulfaflavina brillante (Lab. Chroma) al 0.1% en tampón citrato de Mac Ilvain, 0.01M a pH 2.8, por 30 minutos a temperatura ambiente.
- 3) Diferenciar en tampón citrato a pH 2.8 por 10 minutos.
- 4) Deshidratar en etanol 70%, 95% y 2 etanol absoluto); aclarar en Xilol y montar en Fluormount (Gurr).

Base de la reacción con Sulfaflavina :

Este compuesto es un colorante ácido que permite la identificación de cantidades relativas de proteínas totales e histonas dependiendo del pH en que se realiza la reacción. La coloración depende de la unión electrostática del colorante aniónico con las cargas positivas (NH_3^+) de los amino ácidos de las proteínas, esto significa que a pH 2.8 (punto isoeléctrico) están cargados positi-

vamente los grupos NH_2 de la mayoría de los amino-ácidos y a pH 8 solo aquellos de proteínas muy básicas, esto es las histonas del núcleo.

5) Cuantificación de proteínas en núcleos de espermatozoides normo y teratoespérmicos en Citofluorómetro Zeiss con el "Setrde filtros Zeiss" con excitación en el rango azul. Se aplica cálculo estadístico a los valores obtenidos en cada categoría para obtener \bar{X} , DS y ES.

Se determina si los valores obtenidos difieren o no entre los tipos de espermatozoides estudiados.

Control citoquímico : Se realiza la desaminación por método habitual en citoquímica (HCl 0.1 N en metanol absoluto).

Control de fluorescencia : a) Frotis sin tratamiento con TCA y sin sulfaflavina (autofluorescencia), b) Frotis con tratamiento con TCA, pero sin tinción con sulfaflavina.

2.4. Determinación de la relación ADN/Proteínas Totales por Citofluorometría.

Con los valores obtenidos en 2.2. y 2.3. se determina la relación ADN/Proteínas Totales en normo y teratoespérmicos. Se obtiene un Índice Citoquímico (I.Ci.) para cada tipo de espermatozoide.

2.5. Determinación de histonas - Cuantificación por Citofluorometría.

2.5.1. Reacción de sulfaflavina a pH 8 para histonas.

Muestras de espermatozoides se procesan como en 2.2.; los frotis se fijan en formol al 10% y se aplica reacción de sulfaflavina para histonas como en 2.3.;, pero utilizando tampón borato de Na (Clark y Lubs) 0.01M a pH 8. Se cuantifican histonas en núcleos de normo y teratospérmicos utilizando el citofluorómetro con filtro de excitación en el rango azul. Se hacen cálculos estadísticos igual como en 2.3.

Controles : Se utilizan los mismos que en 2.3.

2.5.2. Extracción de ADN.

Muestras procesadas como en 2.2. fijadas en formol al 10% se incuban en TCA, según Ruch and Leeman (1973), simultaneamente con las preparaciones para histonas durante 1, 2, 3 y 3 1/2 horas y luego se continua con:

- Reacción con reactivo de Schiff para citofluorometría
- Cuantificación del ADN remanente en citofluorometro de acuerdo a lo descrito en 2.2.
- Mediciones y cálculo estadístico referidos a normo y teratospérmicos.

2.6. Determinación de la relación ADN/Histonas.

Los valores para ADN se relacionan con los obtenidos para histonas, considerando a cada tipo de espermatozoide; se obtiene un "Índice Citoquímico" (I.Ci.)

"Consideramos I.Ci. a la relación entre valores citofotométricos (en unidades arbitrarias) de reacciones citoquímicas de sustancias presentes en condiciones naturales o experimentales"

2.7. Determinación de la relación Proteínas Totales/Histonas.

Los valores obtenidos para proteínas totales se relacionan con los obtenidos para histonas, considerando cada tipo de espermatozoide. Se obtiene un Índice Citoquímico (I.Ci.) para normoespérmicos, T. esféricos y T. alargados.

2.8. Caracterización del empaquetamiento de la cromatina e identificación de grupos sulfidrilos : Estudio ultraestructural.

2.8.1. Desagregación de la cromatina del espermatozoide: identificación de grupos SH.

Muestras de semen humano se seleccionaron especialmente por las características morfológicas y se agruparon en :

- I % rango normal de normoespermia : 64-69%
- II % alto de normoespermia : 70-73%
- III % muy alto de teratospermia : 43-48%

Se aplicó un método original, en el cual se utilizó para la desagregación de la cromatina un reductor citoquímico (tioglicolato de sodio), basándonos en el método de Lung (1972) y se complementó con la identificación de los grupos SH utilizando un compuesto de Hg.

Este método original posee : a) una alta especificidad ya que el mercurio es un bloqueador de grupos SH y se une a ellos formando mercaptidos (Ganter y Jolles, 1969), b) produce una alta densidad electrónica proporcionada por el metal (Hg) del compuesto que hemos seleccionado para utilizarlo en forma de sal sódica, este es el p-cloromercurio benzoato de Na^+ .

La metodología general utilizada en la desagregación de la cromatina e identificación de grupos SH liberados es la siguiente :

Controles

1. Muestras se incuban en tioglicolato pero sin identificación posterior de grupos SH.
2. Muestras no se incuban en tioglicolato, pero se aplica reacción para grupos SH.
3. Sin tratamiento con tioglicolato ni identificación de grupos SH.
4. Para cada muestra, un corte se observa al microscopio sin tinción y otro con uranilo-plomo según Reynold (1963).
5. Control morfológico a nivel óptico para cada tiempo de incubación en tioglicolato (observación de hinchamiento de las cabezas de los espermatozoides).

2.8.2. Patrón de distribución de grupos SH en el núcleo de espermatozoides normo y teratospérmicos.

1. Se utiliza método de Lung y reconocimiento de grupos SH.
2. Se procede en general como 2.8.1., aplicando 3 tiempos de incubación en tioglicolato (6-8 y 10 minutos).

3.- RESULTADOS

3.- RESULTADOS

3.1. Estudio del empaquetamiento de la cromatina : Análisis en Microscopía Óptica.

3.1.1. Incubaciones con SDS - DTT.

En los diferentes tratamientos "in vitro" con SDS-DTT aplicados a espermatozoides de 5 muestras de semen con 60-69% de normoespermia (y 31 a 40% de teratospermia), se puede observar aumento relativo del tamaño de la cabeza de los espermatozoides que varía de acuerdo a la concentración de SDS y al período de incubación (ver método 2.1. y gráfico 1).

En concentraciones de 0.01% de SDS se observa hinchamiento leve de los espermatozoides conservándose alrededor de un 20% sin decondensación detectable al microscopio óptico. Con SDS al 0.05% la respuesta es más homogénea entre los diferentes espermatozoides pero alcanzan un tamaño mayor que con 0.01%.

En incubaciones con SDS al 0.5% en breve tiempo (5' y 6') se detecta desagregación con hinchamiento muy heterogéneo de la cabeza; algunas células alcanzan el grado extremo con pérdida de la morfología y otras aparecen

sin o con leve aumento del tamaño de la cabeza, como puede observarse en Fig. 2 a, b y c. Pueden detectarse espermatozoides de forma normal y algunos de tipo juvenil que no han sido afectados por el proceso (Fig. 2 a y c).

La decondensación de la cromatina observada es atribuida a la ruptura de los enlaces S-S provocada por reductores con grupos tioles como son el DTT, tioglicolato de sodio, 2-ME y otros compuestos sulfurados o bases, aplicadas por Mahai y Yanagimachi (1975).

El SDS (detergente aniónico), en combinación con el DTT, ha sido extensamente utilizado ya que produce, además de la decondensación de la cromatina, ruptura de membranas e hinchamiento y lisis del flagelo del espermatozoide.

Este método permite detectar la inadecuada estabilización de la cromatina dependiente de enlaces -S-S- indicando que el espermatozoide no ha alcanzado su madurez (Calvin y Bedford, 1971; Bedford y Calvin, 1974; Bedford, Calvin y Cooper, 1975 a; Beil y Graves, 1977), sin embargo es un método complejo de interpretar por lo cual hemos utilizado el tioglicolato de Na como reductor.

3.1.2. Incubaciones con tioglicolato alcalino.

Al hacer las reacciones en 6 muestras de semen

cuya morfología fluctuaba entre 66-70% de normoespermia (y 30-34% de teratospermia) utilizando solo el reductor de enlaces -S-S-, como es el tioglicolato de sodio, ampliamente aplicado en histo y citoquímica, se ha podido producir decondensación "in vitro" con aumento de volumen del núcleo del espermatozoide.

El fenómeno es apreciable en microscopía de luz a partir de los 4' de incubación (Fig. 3 b y 4 b). En tiempos más prolongados (6', 8' y 10') se logra obtener una decondensación mayor con hinchamiento de prácticamente todas las cabezas de los espermatozoides como puede verse en Fig. 3 a y 4 c, con excepción de algunos espermatozoides de forma normal que mantienen aproximadamente su tamaño original (comparar en Fig. 4 a-c).

Este tipo de decondensación de la cromatina parece ser más adecuado que el método de Calvin y Bedford (1971), ya que este fenómeno es dependiente solo de la acción del reductor sobre los enlaces -S-S-, por lo tanto servirá para el estudio citoquímico de decondensación y análisis del grado de estabilización de la cromatina observado a nivel ultraestructural. Los grupos SH son identificables a nivel de microscopio óptico por el método de Barnett y Seligman (1952).

3.2. Cuantificación del ADN por Citofluorometría.

3.2.1. Reactividad del ADN al Feulgen, con reductor de -S-S-.

En la serie de experimentos (página 17) realizados con espermatozoides de semen con 67-72% de normo-espermia (y 28 a 33% de teratospermia), aplicando reductor de -S-S- y reacción de Feulgen fluorescente de acuerdo a Prenna, Leiva y Mazzini (1974) se pudo detectar que:

1) Concentraciones bajas de 2-ME (0.01 M) permiten evidenciar leves diferencias de reactividad del ADN a la reacción de Feulgen, entre los tres tipos de espermatozoides considerados en este estudio.

Los valores obtenidos a los 60' en normo y T. esféricos son superiores a los obtenidos en un Feulgen sin adición de 2-ME. (Gráfico 2).

2) Se pueden apreciar diferencias significativas, tanto en la reactividad del ADN como en el tiempo óptimo de hidrólisis con respecto al control (60 minutos) al utilizar el 2-ME en concentración 0.1 M como se observa en el Gráfico 3. Los teratospérmicos evidencian mayor intensidad de fluorescencia que los espermatozoides de forma normal; ésto ocurre a menor tiempo de hidrólisis

(20 minutos) que el control. A medida que aumenta el tiempo de hidrólisis se produce una mayor reactividad del ADN y por lo tanto mayor intensidad de la coloración.

Sin embargo, los valores obtenidos van disminuyendo desde los 40 minutos (Gráfico 3); a los 80 minutos de tratamiento el efecto es mayor, lo que estaría determinado por el fenómeno de reabsorción y/o interferencia que ocurre en los métodos citofluorométricos cuando la intensidad de la coloración produce una extinción mayor de 0.1. La disminución de la intensidad de fluorescencia es mayor porcentualmente en los T. alargados y esféricos con respecto a los normoespérmicos. (Tabla II).

El efecto sobre la reactividad del ADN por efecto del reductor de -S-S- se puede ver en la mayor coloración detectada en los espermatozoides con tratamiento de 2-ME, comparados con aquellos sin reductor, además de las diferencias individuales respecto a cada tipo de espermatozoides (Fig. 5).

En la Tabla II se resumen los porcentajes de reabsorción obtenidos con HCl 4N y 2-ME 0.1 M notándose los efectos diferenciales de este tratamiento que indican que la reactividad del Feulgen está influen-

ciada por la presencia de proteínas con enlaces disulfuro.

- 3) Hidrólisis (HCl 4N) con concentraciones mayores de 2-ME o hidrólisis con HCl de menor normalidad y aumentada la concentración de 2-ME, no permitieron evidenciar características individuales de los tipos de espermatozoides estudiados (Gráfico 4).

3.3. Determinación de ADN y Proteínas por Citofluorometría.

3.3.1. Determinación del ADN con Feulgen standard (control).

Semen con más del 60% de normoespermia se utilizó para cuantificar el ADN en espermatozoides de forma normal y anómala (T. esféricos y T. alargados), aplicando el método de Prenna, Leiva y Mazzini (1974) "standard" sin reductor de S-S y con HCl 4N, 60 minutos a 28°. Se obtuvo :

- a) Valores muy similares para los 3 tipos de espermatozoides, hecho que concuerda con los resultados obtenidos por citofotometría de absorción (Bustos-Obregón, Leiva y Guadarrama, 1978).
- b) Los valores obtenidos son muy inferiores al compararlos con aquellos en que los espermatozoides han sido

incubados en HCl más el reductor de enlaces disulfuro, especialmente en concentración 0.1 M de 2-ME (ver Gráfico 3)

La reacción de Feulgen fluorescente se observa en Fig. 6 y los valores obtenidos con el método "standard" son los siguientes :

Reacción de Feulgen standard (HCl 4N a 28°C, 60')
Unidades arbitrarias de citofluorometría (U.A.)

<u>Normoespermio</u>	<u>T, esférico</u>	<u>T. alargado</u>
$\bar{X} = 44.3$	$\bar{X} = 43.5$	$\bar{X} = 43.2$
DS \pm 2.8	DS \pm 3.2	DS \pm 2.6
ES \pm 0.3	ES \pm 0.5	ES \pm 0.3

3.3.2. Determinación de proteínas totales.

Con el método de Leeman y Ruch (1972) se determinaron las proteínas totales en base a la reacción que identifica grupos NH_2 libres mediante un fluorocromo aniónico, la Sulfaflavina brillante.

Para detectar las proteínas totales presentes en el núcleo celular se extrae

el ADN con TCA en caliente, pudiendo identificar grupos guanidino (arginina) y amino (lisina) libres de las proteínas que reaccionan con colorantes aniónicos.

La cuantificación citofluorométrica realizada en los 3 tipos de espermatozoides a diferentes tiempos de extracción del ADN dió los siguientes resultados :

- a) Los valores son muy similares a las 3 y 3,5 hrs. de extracción del ADN (Ver Tabla III).
- b) A las 2 hrs. de extracción se observa una mayor intensidad de fluorescencia en los teratoespermicos, esto es, mayor cantidad de grupos catiónicos libres y reactivos presentes en las proteínas.
- c) Valores obtenidos en núcleos de espermatozoides sin tratamiento (sin TCA), resultaron ser similares en los 3 tipos celulares (Gráfico 5).

3.4. Relación ADN/Proteínas totales.

Los valores obtenidos para ADN con el método "standard" fueron significativamente inferiores a los determinados por reacción de Feulgen con reductor de -S-S- (Gráfico 3).

Considerando que el efecto producido por el 2-ME es favorecer la identificación del ADN, utilizaremos los valores obtenidos en estas condiciones para hacer la re-

lación con proteínas totales e histonas, considerando separadamente los tres tipos de espermatozoides en estudio.

Respecto a proteínas totales se considerarán aquellos valores más altos en emisión de fluorescencia obtenidos en reacciones con extracción de ADN durante 3,5 hrs. como puede observarse en el Gráfico 5.

Relación ADN/Proteínas totales.

Normoespérmicos : 1 : 2.1

T. Esféricos : 1 : 2.0

T. Alargados : 1 : 1.7

De acuerdo a las cifras obtenidas, los T. alargados presentan una relación ADN/Pr menor que los otros dos tipos celulares, lo que estaría indicando que la cromatina y/o la trama proteica dan una mayor accesibilidad a la identificación del ADN de acuerdo al tratamiento realizado y que se evidencia en el porcentaje mayor de reabsorción (mayor intensidad de coloración) observado en este tipo de espermatozoide.

3.5. Determinación de Histonas por Citofluorometría y extracción del ADN.

3.5.1. Identificación y cuantificación de histonas.

Se cuantificó las proteínas fuertemente básicas (histonas) liberadas post-tratamiento de extracción del ADN con TCA en varios tiempos de incubación.

Los valores obtenidos en los 3 tipos celulares analizados a las 3 y 3,5 hrs. de extracción del ADN no difieren; se obtiene la máxima intensidad de fluorescencia a las 3,5 hrs. , en que se ha extraído prácticamente todo el ADN. (Tabla IV y Gráfico 6).

A las 2 horas de incubación con TCA los valores de histonas de normoespérmicos difieren de los encontrados especialmente en T. esféricos (Gráfico 7). Este hecho se relaciona con una extracción mayor del ADN en T. esféricos, sugiriendo una conformación estructural o asociación molucular diferente del complejo núcleoproteico.

La curva descrita por la determinación de histonas a diferentes tiempos de extracción del ADN (Gráfico 6) muestra un descenso en la intensidad de fluorescencia a las 3 horas, fenómeno que hemos considerado explicable por las características propias de la organización y

conformación espacial de la nucleoproteína del espermatozoide maduro y por aspectos citoquímicos propiamente tales.

La relación inversa entre extracción de ADN (en este caso demostrada por ADN remanente) y la liberación de histonas, es claramente evidenciable en el Gráfico 8, excepto a las 3 horas, como ya se ha señalado en el párrafo anterior.

3.5.2. Extracción del ADN.

La estabilidad de la cromatina también la hemos analizado en relación al comportamiento diferencial que pudiera presentar el ADN al tratamiento de extracción con TCA.

Hemos observado que con 1, 2 y 3 horas de tratamiento con TCA siempre se libera menos ADN en los normoespérmicos, que a pesar de no ser diferencias significativas es un fenómeno constante digno de considerar (Gráfico 9); esto es más notorio por la menor cantidad de histonas detectadas en normoespermicos a las 2 horas de tratamiento con TCA (Gráfico 7).

Si cuantificamos el ADN remanente observamos que

hasta las 3 horas no ha habido una pérdida real del ácido; tal vez un porcentaje alto de ADN no ha difundido del núcleo, por encontrarse, probablemente, depolimerizado en fragmentos de un tamaño tal que no pueden difundir del núcleo (Anderson, 1976). La extracción o difusión significativa del ácido nucleico, se produce a partir de las 3 horas de tratamiento con TCA (Gráfico 10).

3.6. Relación ADN/Histonas.

Las cifras obtenidas en las cuantificaciones de ambas moléculas dió una relación que se observa en el Cuadro 5.

Relación ADN/Histonas

Normoespermicos	:	1	:	1.5
T. Esféricos	:	1	:	1.4
T. Alargados	:	1	:	1.3

Estos resultados nos indican que a pesar de obtenerse valores similares (en el tiempo máximo de extracción

de ADN) para histonas en los tres tipos celulares, es diferente la relación de los teratoespérmicos con respecto al normoespérmico y en especial el T. alargado, revelando que la organización de la cromatina sería diferentr; el ADN es más accesible a la identificación por reacciones citoquímicas en los T. alargados.

3.7. Relación Proteínas Totales/Histonas.

La relación de proteínas totales a histonas es de 1 : 0.7 y este valor es igual en los tres tipos de espermatozoides indicando que citofluorométricamente no se detectan diferencias en relación a estas moléculas.

3.8. Caracterización ultraestructural del empaquetamiento de la cromatina.

3.8.1. Características del núcleo de espermatozoides humanos.

Las observaciones realizadas en cortes finos de espermatozoides pertenecientes a semen considerado normoespérmico (> del 64% de normoespermia) y sin tratamiento con reductor (tioglicolato) se comprobó una cierta heterogeneidad morfológica de la cabeza ya señalada por otros autores (Pedersen, 1969; Fujita y cols. 1970; Zamboni y cols., 1971; Bartoov y cols., 1980).

El núcleo del espermatozoide humano (y de los vertebrados en general), se ha caracterizado por tener la cromatina densa, firmemente empaquetada, dando un aspecto casi homogéneo, muy electron-denso con la tinción de uranilo/plomo, como puede observarse en la Fig. 7. Estas características de la cromatina corresponden al espermatozoide maduro descrito por varios autores.

Se puede observar en algunos núcleos zonas claras (de baja densidad electrónica) llamadas vacuolas (Fawcett, 1958, 1970; Fujita y cols. 1970), que se encuentran preferentemente en la parte anterior del núcleo; no son verda-

deras vacuolas, ya que no están limitadas por membranas.

Esta estructura es considerada dentro de las características del espermatozoide de forma oval normal y no se le conoce función.

Un porcentaje variable de espermatozoides, en general bajo, presenta el núcleo con cromatina menos condensada, con aspecto granular y que ha sido interpretada como una condensación incompleta de la cromatina (Pedersen, 1969, 1974; Zamboni y cols., 1971; Evenson y cols., 1978, 1980). (Fig. 7c).

Las muestras presentaban formas alteradas principalmente de cabeza y cola.

3.8.2. Efecto del reductor e identificación de grupos SH ; estudio en normoespérmicos (Grupo I).

Para este tipo de estudio se seleccionaron 20 muestras de semen, separándolas en 3 grupos de acuerdo al % de normoespérmicos (ver Material y Métodos) y se aplicó un método combinado con el objeto de detectar :

- el grado de estabilidad de la cromatina al ser tratada con un reductor de -S-S- y las características morfológicas que adquiere la cromatina desagregada,

- identificar y localizar "in situ" (intranuclear) la presencia de grupos SH, con el método diseñado en nuestro laboratorio.

En la serie de experimentos realizados en semen con características de normoespermia (Grupo I) se pudo detectar que el tioglicolato aplicado; a) durante 4' y 5' no decondensa (o lo hace en mínimo grado) la cromatina de espermatozoides de forma oval o normoespérmico (Fig. 8 a). Se detecta una cierta cantidad de grupos SH, evidenciable por la densidad electrónica que adquiere el núcleo, proporcionada por el compuesto mercurial utilizado; este es p-cloro-mercurio benzoato de Na^+ , que además de poseer el mercurio que le dá especificidad de reacción con los grupos SH, permite obtener una mayor densidad electrónica si la comparamos con otros compuestos SH específicos (N-etil-maleimida). Comparar con 8a' .

Esta densidad se intensifica con el tetróxido de osmio, utilizado con esa finalidad y además como fijador.

En la Fig. 8 c y Fig. 9 podemos observar el núcleo de un normoespermio en el cual se ha producido una mínima decondensación, apreciable al M.E. El aspecto de la cromatina es granular o similar a los "cuerpos de cromatina" descritos por Evenson y cols.(1978). Se detecta

en él una reacción positiva para SH, obteniéndose una alta densidad electrónica.

En los teratospérmicos se obtiene una mayor decondensación, observándose así una trama de cromatina con gránulos con reacción de SH muy positiva (Fig. 8 b). Estos gránulos muestran una disposición ordenada en la periferia del núcleo; en su interior se disponen heterogéneamente en la malla trabecular formada por las fibras de cromatina dispersa.

En la Fig. 8 d se observa la decondensación de la cromatina en un núcleo que es prácticamente negativo a la reacción para SH. Los gránulos, aunque es posible apreciarlos en la microfotografía, difieren considerablemente de lo observado en la Fig. 8 b. Este aspecto de la cromatina se evidencia con cierta frecuencia en muestras con normoespermia de 62 - 64% y su morfología correspondería a teratospérmicos esféricos. Situación similar con respecto a decondensación y negatividad para SH se detectó en espermatozoides de forma anómala pero en los cuales es difícil observar el aspecto granular descrito anteriormente (Fig. 10 a).

En espermatozoides decondensados, con reacción para SH y a los cuales se aplicó tinción de contraste

con uranilo-plomo (Fig. 10 b) se pueden ver diferencias en el aspecto y arquitectura de los núcleos; algunos prácticamente no presentan trama de cromatina (7) y otros muestran la malla trabecular y una zona de condensación en la periferia del núcleo, muy teñida por el uranilo-plomo.

b) Incubación de 6', 8' y 10'. A medida que aumenta el tiempo de acción del reductor la cromatina se pone más laxa, conservando la presencia de gránulos y una fina trama fibrilar; la reactividad positiva para grupos SH se localiza en los gránulos y en la periferia de los núcleos. Estas regiones son altamente densas electrónicamente, lo que indica una gran concentración de grupos SH unidos al compuesto con Hg (Fig. 11 a y b). En la fotografía se puede observar que hay núcleos prácticamente lisados (7) y casi negativos para SH.

En estos preparados no se ha aplicado tinción de contraste, por lo cual la densidad observada corresponde a la intensidad de la reacción para SH, más evidenciable en espermatozoides del tipo normoespérmicos.

Si aplicamos tinción de uranilo-plomo, se puede destacar los sectores de mayor compactación de la cromatina, que en los normoespérmicos se sitúa periféricamente

en el núcleo (Fig. 11) y además en zonas intranucleares. Estas zonas compactas aparecen como centros de coalescencia de gránulos o "cuerpos de cromatina" (Evenson et al, 1978); también se pueden observar delgadas fibras de cromatina que tienen un grosor aproximado de 30 \AA (Fig. 12). Estas zonas con mayor grado de estabilidad probablemente indican una organización y funcionalidad diferencial de la cromatina en esta célula especializada.

3.8.3. Efecto del reductor e identificación de SH : estudio en semen con alta normoespermia (Grupo II).

Se observa en corte fino sin tinción de contraste que el tratamiento con el reductor hasta 8' de incubación, afecta muy poco la estabilidad de la cromatina. Se detectó una moderada decondensación y positividad a la reacción para SH; también es posible observar algún espermatozoide casi de aspecto normal en su forma y disposición de la cromatina (Fig. 13).

3.8.4. Efecto del reductor e identificación de SH : estudio en semen con alta teratospermia (Grupo III).

Al analizar muestras de semen con alta teratosper-

mia tratados con tioglicolato se pudo observar lo siguiente :

La mayoría de los espermatozoides sufren decondensación bastante acentuada a los 6' de incubación en el reductor.

Los núcleos muestran una decondensación muy irregular con sectores de cromatina muy laxa; otros muestran zonas condensadas prácticamente solo en la periferia del núcleo (Fig. 14).

En Fig. 15 a se puede detectar decondensación más regular, mostrando la trama fibrilar con gránulos dispersos en el núcleo, sin mayor compactación en la periferia. En Fig. 15 b se puede comparar las características morfológicas de la cromatina de un núcleo de espermatozoide normal, la cual prácticamente no ha sido alterada, y otro en que existe un gran aumento de tamaño con disposición periférica de la cromatina, que conserva cierto grado de empaquetamiento.

Tanto los espermatozoides con decondensación irregular (Fig. 14) como aquellos con distribución más homogénea de la malla de la cromatina y los muy poco decondensados (Fig. 15) muestran positividad a la reacción para grupos SH; no se detecta reacción positiva en la zona

central de algunos núcleos de espermatozoides que corresponderían a teratospérmicos (Fig. 15).

En las muestras con alta teratospermia, se pudo aumentar la proporción de formas anómalas mediante el método de Zegers y col. (1981), que permite separar espermatozoides móviles de los inmóviles.

La fracción de espermatozoides inmóviles, con la cual se trabajó en los experimentos mencionados, resultó enriquecida con formas anómalas en alrededor del 10% comparada con la concentración inicial de la muestra que contenía un 52% de formas alteradas.

Este hecho ha permitido evaluar en mejor forma el comportamiento de espermatozoides anómalos.

Muestras completas de semen con alta teratospermia tratadas durante 8' con tioglicolato y post-reacción de identificación de grupos SH, dió resultados similares a la anterior, obteniéndose núcleos con cromatina totalmente laxa y negativos para grupos SH (Fig. 16); otros muestran aún condensación periférica, con algún elemento en la zona central, que dan reactividad muy positiva para grupos SH, lo que los hace comparables a aquellos observados en semen normal o con una alta normoespermia

(Figs. 11,12, 13).

3.9 Patrón de distribución de proteínas sulfidriladas en normo y teratospérmicos.

La caracterización de un patrón de distribución de enlaces -S-S- detectables citoquímicamente se obtuvo incubando espermatozoides en un medio con tioglicolato de Na alcalino y con posterior detección de los grupos SH liberados (y pre-existentes) en diferentes tiempos de tratamiento.

La imagen más frecuente observada en células incubadas en el reductor de -S-S-, por 4 y 5 minutos es de reacción positiva con gran densidad electrónica que se distribuye homogéneamente en el núcleo de los espermatozoides de forma oval (Fig. 8 a y c; Fig. 9); en tiempos más largos adquiere una distribución perinuclear (Fig. 11 a), constituyendo una zona cortical de gran densidad electrónica, que demuestra una gran concentración de grupos SH en las proteínas de la cromatina cortical.

Son detectables también estructuras granulares SH positivas que se distribuyen en la zona central del núcleo (Fig. 18 a).

Es interesante destacar que cuando comienza la ruptura del núcleo, en períodos largos de reducción (8' y 10'), ésta se produce primero en la parte posterior de la cabeza del espermatozoide, liberándose en ese sector la cromatina disgregada (Fig. 18 e); fenómeno concordante con lo observado en huevo de conejo fecundado (Bedford, 1972).

Este hecho también se corresponde con lo descrito con tratamiento de SDS o SDS-DTT (Kvist, 1980).

En los teratospérmicos, desde los 4' de tratamiento con tioglicolato se obtiene decondensación, observándose leve reacción positiva para SH. La distribución es homogénea en el interior del núcleo (Fig. 8 d; Fig. 10 a y 16 b)

3.10. Controles de la Reacción.

Se realizan los indicados en Material y Métodos. Se muestra en Fig. 19 un control en el cual la densidad electrónica es muy baja comparada con la obtenida en espermatozoides tratados con reductor, sal de mercurio y osmio. El control no tiene sal de mercurio, y por lo tanto la densidad comparativamente ha disminuido en forma considerable (ver también Fig. 8 a').

4.- DISCUSION

5.- CONCLUSIONES

4.- DISCUSION

4.1. Decondensación nuclear.

La condensación y estabilidad de la cromatina es una de las características relevantes del núcleo del espermatozoide maduro en mamíferos; esto significa que el complejo macromolecular ADN/Proteínas alcanza un estado tal de asociación que se requieren tratamientos químicos enérgicos para decondensarlo y/o dejar libre la cromatina. (Borenfreund, 1961; Henricks y Mayer, 1965; Lung, 1972; Bedford y cols., 1973b; Calvin y Bedford., 1974; Mahi y Yamagimachi, 1975; Bell y Graves, 1977; Evenson y cols., 1978; Gusse y Chevalier, 1980; Kvist, 1980; Bustos-Obregón y cols., 1981).

Sin embargo, el fenómeno de hinchamiento del núcleo con decondensación de la cromatina, se produce tan pronto el espermatozoide ha penetrado al huevo (Barros & Franklin, 1968; Piko, 1969; Bedford, 1972; Soupart, 1976).

Una apropiada decondensación nuclear y la formación del pronúcleo masculino que se produce en este estado, es esencial para la fertilización y el desarrollo normal del cigoto. (Bedford y Overstreet, 1972).

En espermatozoides euterianos la condensación de la cromatina nuclear es estabilizado por uniones -S-S- entre las histonas (Coeling y cols., 1972; Bedford y Calvin, 1973^b, 1974; Marushige y Marushige, 1974; Soawaros y Panyim, 1979). El grado de condensación y estabilidad del núcleo del espermatozoide maduro que se encuentra en el semen humano, mostró una estabilidad muy variable frente a agentes químicos como el SDS y DTT (Fig. 2), heterogeneidad ya observada por Bedford y col., (1973b). Este comportamiento contrasta con la forma regular de la decondensación observada en los núcleos de espermatozoides de otras especies (ej.: conejo, mono, toro).

Mahi y Yanagimachi (1975) analizaron el efecto de varios reactivos en relación a la capacidad de producir una efectiva decondensación nuclear en espermatozoides de hamster, rata, conejo, perro, etc., excepto en humano, y encontraron diferencias en la resistencia frente a determinados reactivos. El más resistente resultó ser el espermatozoide de rata y el menos, el de cuy; el espermatozoide de conejo mostró la mayor estabilidad a la decondensación por acción del SDS/DTT.

Tanto el DTT como otros reactivos con grupo tiol, la cistina y el 2-mercaptol etanol requieren de la presen-

cia de SDS para ser efectivos en el proceso de hinchamiento y decondensación. En nuestros experimentos se varió la concentración del SDS manteniendo constante la del DTT y se pudo detectar no solo variaciones en el tiempo de acción sino una mayor homogeneidad en la decondensación de los espermatozoides a bajas concentraciones de SDS.

Conocido es el hecho que el SDS solo es capaz de producir cierto grado de decondensación visible (Bedford y cols 1973b; Kvist, 1980) lo que dificulta la interpretación del fenómeno y hace difícil concluir cuánto de lo observado es efecto directo del reductor sobre los enlaces -S-S-, comprometidos en la estabilidad alcanzada por la cromatina del espermatozoide maduro.

Es importante señalar desde ya que el tioglicolato, comprendido entre los reactivos con grupos tioles, no requiere de la presencia del SDS. También existe otro tipo de reactivo, como son los sulfuros inorgánicos, que actúan ya sea por acción del ion sulfuro o por el alto pH en el cual pueden ser efectivos (pH 9.5 - 11.8).

Por lo observado y los antecedentes reunidos, se podría inferir que la acción del SDS precede a la decondensación de la cromatina, que implica específicamente

el rompimiento de enlaces -S-S-, lo que corresponde a la acción del reductor. El distinto comportamiento observado en la serie de experimentos realizados y los datos aportados por otros autores, harían suponer que el tratamiento con SDS y reductor reflejarían más bien una diferencia en la resistencia de la membrana celular y nuclear (extracción de glicoproteínas u otro componente), como el fenómeno predominante en el proceso de decondensación.

Evenson and col. (1978) comprobaron que el DTT no actúa solo, por lo cual utilizaron incubaciones previas en Sarkosyl para sus experimentos de decondensación parcial de espermatozoides humanos; este detergente remueve la membrana plasmática y las del acrosoma y se produce diferentes grados de decondensación de la cromatina; al microscopio electrónico permite evidenciar fibras y cuerpos esféricos que han sido denominados "cuerpos cromatínicos" (ver más adelante).

Siendo el tioglicolato un compuesto reductor, específico de -S-S- y con formación de dos grupos SH libres, que actúa sin requerir de la acción previa o en combinación con detergentes (SDS - Sarkosyl), se consideró más adecuado para analizar el fenómeno de decon-

densación, independiente de otros factores un tanto ajenos a la característica : cromatina/presencia de -S-S-.

La decondensación "in vitro", con hinchamiento de la cabeza del espermatozoide, aparece como un fenómeno reductor dependiente, con respuesta regulable por medio del tiempo de incubación. Esto nos ha permitido seguir no sólo el fenómeno de decondensación, sino también caracterizar mejor la morfología de la cabeza de los espermatozoides afectados o no por el reductor, al ser observados en microscopía de luz (Fig. 3 y 4) y poder asociar los cambios directamente con los resultados observados a nivel de microscopía electrónica.

Sin embargo, las preguntas planteadas en nuestro estudio van más allá de la sola caracterización respecto a la estabilidad de la cromatina como fenómeno ligado a -S-S- en los espermatozoides en general, sino también a encontrar una explicación al diferente comportamiento frente a estos agentes reductores, considerando toda la arquitectura macromolecular de la cromatina, esto es ADN/ Proteínas de espermatozoides con morfología normal (forma oval) y morfología alterada (teratospérmicos), dado que el grado de compactación y la forma del núcleo son característicos de cada tipo de espermatozoide (Fawcett y cols., 1971; Dalcq, 1973; Holstein, 1978).

4.2. Citoquímica y Citofluorometría del núcleo del espermatozoide.

Los resultados obtenidos por medio de la reactividad al Feulgen, su relación con la morfología de la cabeza y las características de empaquetamiento de la cromatina, tienden a aclarar no sólo conceptos en relación a la interpretación de la reacción citoquímica del Feulgen, sino a una posible correlación entre valores de Feulgen, forma anómala y falta de capacidad fertilizante (Fig. 5 y 6).

Numerosos estudios citofotométricos con reacciones para cuantificar el contenido de ADN en cada núcleo celular sugieren que la eficiencia en identificar el ADN, además de las consideraciones inherentes al método mismo (como son las referidas a las características de la hidrólisis en la reacción de Feulgen), (Sandritter y cols., 1965; De Cosse y Aiello, 1966; Boehm y Sprenger (1970); Sullivan y Garcia, 1970), están en relación con la organización que posee la cromatina en cada núcleo.

El ADN de cromatinas más compactas es menos detectable hecho que ha sido estudiado por Garcia (1970); Duijndam y van Duijn (1975) y otros investigadores

estudiaron el problema desde el punto de vista citofotométrico y su relación con la actividad funcional de la cromatina (Sandritter y cols., 1965; Ringertz y cols., 1969; Gledhill, 1970; Zante y cols., 1977).

La correlación entre métodos bioquímicos y citquímicos revela comportamientos similares en cuanto a que se identifica menor cantidad de ADN en cromatinas compactas (baja tasa de transcripción) comparadas con valores más altos dados por cromatinas menos compactas (mayor actividad transcripcional), según los experimentos realizados por Salisbury y cols., 1961; Noeske, 1971; Dreskin y Mayal, 1974; Duijndam y Van Duijn, 1975 y Anderson, 1976..

La cuantificación del ADN en el núcleo del espermatozoide es de particular interés, por ser ésta una célula cuya cromatina presenta el máximo de compactación y la relación que éstos valores tendrían con algunos tipos de infertilidad en el hombre, y en diversos animales domésticos, como fue postulado por Gledhill (1970).

Nuestros datos previos (Bustos-Obregón and col., 1978 ; 1981) nos muestran valores de citofotometría de Feulgen muy similares para espermatozoides humanos de forma oval (normoespérmicos) y amorfos, lo que se interpretó

en parte como que ciertas posibles alteraciones de la molécula del ADN, no eran detectables por métodos citofotométricos. Sin embargo, la reactividad del Feulgen estaba alterada, por lo cual también se consideró que la asociación del ADN con las proteínas es un factor de gran importancia en la identificación del ADN en estas células especializadas.

Los estudios de ADN con Feulgen fluorescente (citofluorometría) realizados en algunos tipos celulares (Boehm y Sprenger, 1968; Ruch, 1966; 1970; Prenna y cols., 1972, 1974; Fujita, 1973, 1974; Zante y cols., 1977; Fukuda y cols., 1975, 1977) nos han permitido cuantificar el ADN en espermatozoides, considerando el factor tal vez más importante que presenta este tipo celular; este es el grado de compactación o empaquetamiento de la cromatina, atribuido a la presencia de -S-S- (Bustos-Obregón y cols., 1981), que ha sido tomado en cuenta por muy pocos autores (Esnault, 1973; Millette y cols., 1973; Anderson, 1975; Gall y Ohsumi, 1976; Otto y cols., 1979).

El realizar la reacción de Feulgen con un reductor de -S-S-, el 2-mercaptoetanol, nos ha permitido por medio de citofluorometría, determinar diferencias importantes en la reactividad al Feulgen en relación a la cantidad

de -S-S- reducidos y a la morfología de la cabeza del espermatozoide (Graf. 3, Tabla I).

Estas diferencias no fueron posibles de detectar en condiciones normales de reacción de Feulgen por citofotometría (Bustos-Obregón y cols., 1978), ni por citofluorometría de rutina.

El comportamiento diferencial entre normo y teratospérmico queda evidenciado por la mayor reactividad al Feulgen, porque a medida que aumenta el proceso de reducción de -S-S- e hidrólisis, se hace más laxa la cromatina y más detectable el ADN.

Esta mayor reactividad del ADN da un Feulgen más intensamente positivo (Fig. 5), expresándose por una disminución de la emisión de fluorescencia (Tabla II), significativamente menor en teratospérmicos (alargados) comparados con normoespérmicos.

La mayor actividad trae consigo un aumento de la extinción por sobre 0.1 (valor límite) produciéndose reabsorción y/o interferencia, con pérdida consiguiente de la linealidad (Prenna y cols., 1972, 1974).

Desde un ángulo puramente citoquímico podemos concluir que la reactividad al Feulgen está influenciado por la presencia de proteínas con enlaces -S-S-; los teratos-

pérmicos evidencian una trama proteica más laxa que el normoespérmico, lo que permite esa mayor reactividad.

4.3. Análisis de la cuantificación de proteínas totales e histonas.

En relación a la identificación y cuantificación de proteínas totales e histonas se pudo detectar que los espermatozoides anómalos tienen un comportamiento diferente a los normoespérmicos, a pesar de que los valores totales máximos detectados, esto es, aquellos valores obtenidos en el tiempo máximo de extracción del ADN, son similares en ambos grupos de espermatozoides (Tabla 3. y 4).

Es interesante hacer notar que se detectó valores similares de proteínas de leve carácter básico (¿prot. a-cídicas?) en los tres tipos de espermatozoides al realizar la reacción de sulfáflavina a pH 2.8 sin previa extracción del ADN, valores que aumentan a medida que se liberan grupos NH_2 activos, (con el tratamiento de TCA) que reaccionan con el fluorocromo.

Las proteínas totales muestran valores más altos con respecto a las proteínas cuyo grupo NH_2 está libre (activo) en la núcleo proteína del espermatozoide

sin ser sometido a tratamiento, lo que indicaría que las proteínas asociadas al ADN (histonas) son el grupo predominante en el espermatozoide maduro.

Gledhill (1966) y otros autores han utilizado métodos citoquímicos y de citofotometría de absorción, para determinar las proteínas en general, tanto en el espermatozoide del epidídimo como del eyaculado en toro, pero sus resultados pueden ser cuestionados por el tipo de reacción y metodología usada.

La reacción con sulfaflavina brillante, ampliamente estudiada por Leeman y Ruch (1972) y Ruch (1973) es considerada de alta especificidad y cumple con todas las exigencias de la citofluorometría, lo que la hace superior a los métodos publicados en la mayoría de las investigaciones citoquímicas referidas a maduración espermiática (Gledhill y cols., 1966; Gledhill, 1970; Ringertz y cols., 1970).

Con sulfaflavina brillante tanto T. alargados y T. esféricos muestran cifras mayores para proteínas totales e histonas respectivamente, en tiempos cortos de extracción del ADN (2 hrs.) lo que estaría indicando ciertas características de la cromatina, diferente en normo de teratospérmicos; esto es, una posible relación con las

características de malla proteica que favorecería la extracción del ADN en cortos tiempos de tratamiento, no observado por otros autores por citofotometría de absorción ni por citofluorometría.

En el Gráfico 8 podemos ver que la reactividad de grupos NH_2 de histonas detectadas en tiempo máximo de extracción (que establecimos en 3,5 hrs.) es similar en los diferentes tipos de espermatozoides; igual cantidad de ADN remanente es detectada en tiempo similar, lo que indicaría (o permitiría deducir) que a este nivel de suborganización de la cromatina (¿núcleosoma?) no se evidenciarían diferencias citoquímicamente cuantificables en las condiciones metodológicas utilizadas.

El nucleosoma, que correspondería al nivel estructural más íntimo de la cromatina, está constituido por la asociación de ADN e histonas ricas en lisina (H_2A y H_2B) e histonas ricas en arginina (H_3 y H_4) (Kornberg, 1977; Carnerini-Oreto y Felsenfeld, 1977; Felsenfeld, 1978; Evenson, 1978; Van Meel y Pearson, 1979), con características de agregación y tipo de relación, tal vez, propias del espermatozoide.

El cambio de histonas somáticas por aquellas específicas del espermatozoide podría ser explicado en base

a algunas hipótesis respecto a sus funciones (Bloch, 1969, 1976) : a) las histonas espermáticas permiten la condensación de la cromatina; b) inhiben la actividad de transcripción; c) tienen un rol protector, permitiendo al espermatozoide afrontar condiciones adversas del medio ambiente, largos períodos de conservación y pasaje a través del citoplasma del huevo; y d) son o constituyen la forma físico-química de conservar la totipotencialidad de una célula altamente especializada.

Si consideramos los puntos planteados cualquier característica particular evidenciable en relación a las histonas, como las diferencias detectables en normo con respecto a teratospérmicos en corto tiempo de extracción del ADN, podría estar reflejando un diferente empaquetamiento de la cromatina; sea este a nivel de la malla proteica (Anderson, 1976) o de la sub-organización de la cromatina, hecho aún no conocido y que podría estar causando modificaciones importantes en el espermatozoide y en su capacidad fecundante.

Si consideramos en conjunto todos los datos obtenidos en teratospérmicos : a) susceptibilidad a la reacción de Feulgen que indica una cromatina más laxa; b) evidencia de histonas detectables a las 2 horas de extrac-

ción del ADN comparados con normoespérmicos, y si agregamos a éstos, c) el que la morfología nuclear del espermatozoide está en relación con la condensación de la cromatina, esto es, con un patrón de agregación ADN/proteínas y con otros procesos que ocurren durante la espermiogénesis (Holstein, 1978; Fawcett y col., 1971; Gledhill y col.; Bustos-Obregón y col., 1975; Evenson y col., 1980; Bartoov y col., 1980), podemos formarnos un cuadro más completo de la posible relación entre las características morfocitoquímicas y la funcionalidad de esta célula.

Evenson y col., (1980), postulan que los núcleos de espermatozoides de forma alterada tienen alterada la estructura de la cromatina; éstos muestran diferente resistencia a la denaturación "in situ" del ADN analizado en muestras de semen de toro, ratón y humanos, con características de baja o dudosa fertilidad, si se les compara con muestras de semen con alta fertilidad.

Sugieren los autores que la sensibilidad diferencial dependería de la conformación de la cromatina (Gusse y Chevalier, 1980; Felsenfeld, 1978; Bartoov y col., 1980; Evenson y col., 1980). Por lo tanto es posible suponer que los cambios que afectan la cromatina pueden relacionarse con la disminución de la fertilidad (Mac Lead, 1970; (Pedersen y Fawcett, 1976).

En consecuencia, los hechos detectados en teratospérmicos en relación a la cromatina, junto a la alteración de la forma de la cabeza, serían factores importantes en la infertilidad masculina.

Respecto a la relación del ADN/proteínas totales, ADN/histonas, éstas difieren, entre normo y teratospérmicos, siendo éste el reflejo de una probable organización físico-química diferente de la cromatina del núcleo del espermatozoide anómalo.

Sin embargo, es importante señalar que el semen humano presente una heterogeneidad morfológica y la presencia de cierta cantidad de formas anómalas se observa en semen de hombres fértiles (40% es considerado normal por la OMS). Aún así, MacLeod (1970) y David cols. (1972) detectaron que el semen de pacientes infértiles contiene un mayor porcentaje de formas anómalas que el semen de hombres fértiles.

4.4. Grupos SH y organización de la cromatina.

La observación del fenómeno de decondensación utilizando un reactivo de acción directa sobre los enlaces -S-S- (sólo empleado por Lung (1972) en ME) y detección

de grupos SH en espermatozoides provenientes de semen con normoespermia y alta teratospermia (Fig. 8, 9, 10), nos muestra que los espermatozoides de forma oval, con núcleo altamente condensado, mantienen la característica de la cromatina con pequeñas modificaciones en el grado de condensación y dando reacción positiva para SH.

Tiempos más largos de incubación en el tioglicolato permitieron detectar una marcada regionalización de la cromatina en la periferia del núcleo y en la parte anterior de la cabeza, en que hay una gran reactividad para grupos SH, indicando zonas de gran estabilidad en base a enlaces -S-S-.

La alta densidad electrónica alcanzada en estas zonas se explica citoquímicamente porque los SH liberados reaccionan con la sal de mercurio (responsable de la densidad electrónica), lo que junto al osmio aumenta esta densidad (comparar con el control citoquímico : Fig. 8a' y 19).

En la zona central del núcleo (Fig. 11 y 18) se pueden observar elementos granulares distribuidos en forma heterogénea y SH positivos; también elementos fibrilares, que en preparados con reacción citoquímica y teñidos con uranilo/plomo (Fig. 12), muestran cierta similitud

morfológica con lo descrito por Evenson y cols., (1978) en espermatozoides provenientes de semen de individuos fértiles y a los cuales aplicó Sarkosyl y DTT.

Gusse y Chevalier (1980) han descrito en cromatina de espermatozoides estructuras similares a los nucleosomas somáticos. El "nucleosoma" aparece como una estructura esférica de 7-11 nm de diámetro y contiene ADN con alrededor de 200 pares de bases que se asocian con las histonas que se disponen en el centro de la partícula, constituyendo un octamero con las cuatro especies (2 de H_2A , H_2B , H_2 y H_4).

Los terato-spérmicos muestran desagregada la cromatina (malla trabecular) a partir de cortos tiempos de incubación, mostrando muy leve reacción positiva para SH.

La malla más laxa detectada en microscopía electrónica, previo tratamiento "in vitro" con el reductor (tioglicolato), confirmaría lo que indirectamente se demostró con Feulgen y el reductor 2-ME, agregado a la reacción (ver Gráfico 3).

Los semenes con alta teratoespermia muestran espermatozoides con poca estabilidad de la cromatina, produciéndose notoria decondensación a los 6' de tratamiento,

lo que indicaría falla en el proceso de adquisición de la forma de la cabeza y del empaquetamiento de la cromatina, observación coincidente con lo propuesto por Fawcett y col. (1971) y Bartoov y col. (1980).

Si el proceso de condensación primaria, esto es, el reordenamiento del ADN/Histonas y otras proteínas, que debe producirse durante la transformación de espermatida a espermatozoide no ha funcionado en condiciones normales, la estabilización final durante el pasaje por la vía epididimaria no se producirá. Sin embargo, el aspecto que presenta la cromatina en preparaciones corrientes de microscopía electrónica es de una adecuada condensación, al menos desde un punto de vista morfológico, como lo muestran Bartoov y col. (1980) en teratospérmicos humanos.

El proceso de diferenciación del núcleo del espermatozoide durante la espermatoteleosis es de fundamental importancia, ya que implicaría una disposición ordenada de los cromosomas dentro del núcleo. Se establecen uniones con la membrana nuclear, previo a la condensación de la cromatina, y este orden facilita la condensación (Doohar y Bennet, 1973).

El ordenamiento de los cromosomas sería importante en el momento de la fertilización, formación de los pronúcleos e iniciación de los primeros estadios de desarrollo del embrión.

Aquellas zonas dispuestas en la periferia del núcleo y fundamentalmente aquellas de la zona anterior del núcleo, (que presentan la mayor resistencia a la decondensación en el tioglicolato) las asociamos a las zonas de anclaje o de adosamiento específico de los cromosomas en la membrana del núcleo.

Las observaciones y deducciones planteadas se basan en la especificidad del reductor y de la técnica para SH utilizada en los experimentos. De acuerdo a la base histoquímica de esta técnica original, ideada en nuestro laboratorio para identificar SH a nivel ultraestructural, ella es de adecuada especificidad y densidad electrónica que permite una buena localización de las zonas que contienen proteínas sulfidriladas.

La especificidad de la reacción está dada por el compuesto mercurial utilizado (p-cloro-mercurio-acido benzoico) que actúa como un bloqueador de grupos SH formando mercaptidos (Ganter y Jolles, 1969); la densidad electrónica está proporcionada por el metal (Hg) y el tetróxido

de osmio utilizado como fijador.

A pesar de que los compuestos mercuriales como el ácido p-cloro mercurio benzoico puede estar incluido entre los reactivos más específicos y sensibles para reaccionar con los grupos SH (Nelson, 1960), por lo cual es utilizado en métodos bioquímicos, se ha tenido en cuenta la posibilidad de que la tirosina pueda interferir, dandonos algo de reacción (reacción inespecífica).

Considerando a) las condiciones en que se identifica a los grupos SH; b) la menor cantidad relativa de tirosina con respecto a cisteina presente en proteínas del núcleo de espermatozoides de algunos mamíferos estudiados, incluyendo el hombre (Coelingh y cols., 1969, 1972; Kolk, 1975; Balhorn y cols., 1977) c) y además de los controles indirectos utilizados (bloqueadores de SH como el NEM, producen densidad electrónica), este método citoquímico se consideraría el más adecuado para el estudio de SH a nivel ultraestructural.

Es indudable que los datos obtenidos de los experimentos de decondensación "in vitro", análisis citoquímico, citofluorométricos, junto a la localización "in situ" de

proteínas sulfidriladas (grupos SH) a nivel de ultraestructura, nos han permitido asociar forma normal y/o anómala de la cabeza del espermatozoide, con la organización de la cromatina, uno de los eventos relevantes de la espermatoteliosis.

Creemos que la información morfo-fisiológica obtenida, ayudan a esclarecer aspectos del proceso de maduración espermática y en el futuro poder relacionar en forma más precisa, las características del espermatozoide y su capacidad fecundante.

5.- CONCLUSIONES GENERALES

- 1.- La reactividad del ADN al Feulgen está influenciada por la presencia de proteínas con enlaces disulfuro.
- 2.- Los espermatozoides con forma de cabeza anómala evidencian una trama proteica de la cromatina más laxa que el normoespérmico lo que es evidenciado por una mayor reactividad al Feulgen (> % de reabsorción de fluorescencia).
- 3.- La relación ADN/Proteínas totales obtenidas en base a la reactividad al Feulgen y a la sulfaflavina a pH 2.3 es diferente entre normo y teratospérmicos.
- 4.- Los normoespérmicos presentan una regionalización y textura de la malla proteica visualizada a nivel de microscopía electrónica, más compacta en la región cortical y en la zona apical del núcleo, zonas que serían más ricas en S-S.
- 5.- Los teratospérmicos además de presentar una morfología alterada, tendrían alterada la organización físico-química de la cromatina, siendo ésta menos estabilizada. Ello podría ser causa de infertilidad, aspecto que debe ser estudiado en mayor detalle a futuro.

6.- Obtención de un método ultracitoquímico para determinar la presencia de SH en condiciones muy adecuadas para el estudio de su localización citológica, considerando que en la literatura no se encuentra ningún método que sea adecuado para la localización de estos a nivel de microscopía electrónica

6.- R. E S U M E N

R E S U M E N

Como un tipo de espermatozoide, euteriano se analizaron espermatozoides humanos de eyaculado; se aplicaron diversos métodos con el objeto de caracterizar : a) el complejo ADN/Proteínas; b) la organización y estabilización de la cromatina del núcleo y c) el patrón de distribución de proteínas sulfidriladas.

Se pudo en general observar con incubaciones "in vitro" con reductor de -S-S- (tioglicolato de Na), que los normoespérmicos muestran una estabilidad mayor a la decondensación de la cromatina al ser comparados con los teratospérmicos. También los normoespérmicos presentan menor actividad al Feulgen que los anómalos (Terat. esféricos y alargados), cuando la reacción de Feulgen se acompaña de reductores de -S-S-.

Estos resultados indicarían que los espermatozoides teratospérmicos, poseen una trama proteica más laxa que el normoespérmico, lo cual permite una mayor reactividad al Feulgen.

También se pudo determinar una relación citoquímica de ADN/proteínas totales, ADN/Histonas y Proteínas/Histonas

Adendum a página 74.

La organización de la cromatina a nivel ultraestructural y la asociación entre estabilidad frente a reductores de -S-S- e identificación de grupos SH liberados guarda una relación que permite obtener una caracterización morfo-citoquímica de normo y teratoespérmicos.

no se detectó diferencias entre normo y teratospérmicos en la relación Proteínas/Histonas, pero si con respecto a los otros dos tipos de evaluación siendo los teratospérmicos alargados los que presentan valores menores tanto para ADN/proteínas y ADN/Histonas. Estas diferencias también reflejarían una diferente arquitectura físico-química entre normo y teratospérmicos.

La organización de la cromatina a nivel ultraestructural y la asociación entre estabilidad frente a reductores de -S-S- e identificación de grupos SH liberados.

Aplicando un método original se pudo establecer que los espermatozoides con baja estabilidad de la cromatina frente al reductor, muestran desagregación de la cromatina a partir de los 4' de incubación en el reductor; con frecuencia dan una positividad muy leve para SH (densidad electrónica), distribuida heterogeneamente en el núcleo.

Por el contrario en los espermatozoides de cromatinas más estables (normoespérmicos) sólo en tiempos largos de incubación (6' - 8' y 10') es posible decondensar la cromatina, la cual presenta un aspecto granulo-fibrilar, con mayor reactividad de grupos SH.

En tiempos largos de incubación (8' - 10') es posible detectar claramente una distribución típica, esto es una

alta concentración de proteínas sulfidriladas, con disposición cortical en el núcleo del espermatozoide; esta condensación cortical del núcleo evidenciaría una sub-organización particular de la cromatina que diferenciaría a un normo de un teratospérmico.

La reacción citoquímica creada y aplicada en este estudio posee la fase citoquímica (especificidad-densidad electrónica, etc.) adecuada para ser utilizada con eficacia en ultracitoquímica.

7.- GRAFICOS Y TABLAS

G R A F I C O 1

Efecto de la incubación con distintas concentraciones de SDS y de DTT utilizado en concentración de 2mM. :

El histograma muestra los cambios de volúmen que experimentan las cabezas de los espermatozoides de acuerdo a la concentración del SDS y el tiempo de incubación. Se ha utilizado el método de sobreposición de imágenes para demostrar el cambio de volúmen experimentado en cada caso. Las líneas cortadas indican que las cabezas de los espermatozoides han alcanzado un aumento de volúmen tal que las cabezas se lisan.

Observaciones realizadas con objetivo 100 X e iguales aumentos fotográficos. .

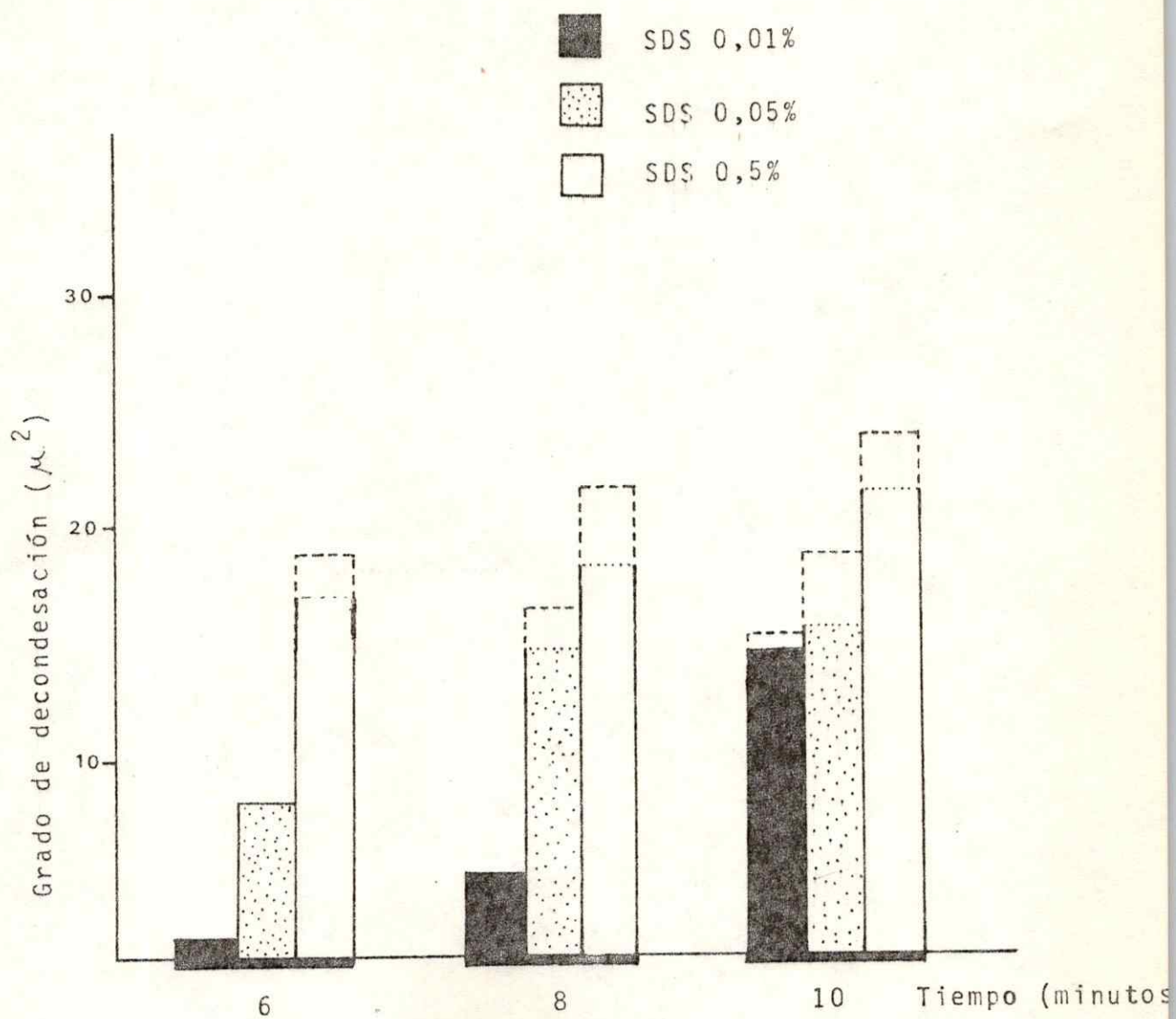
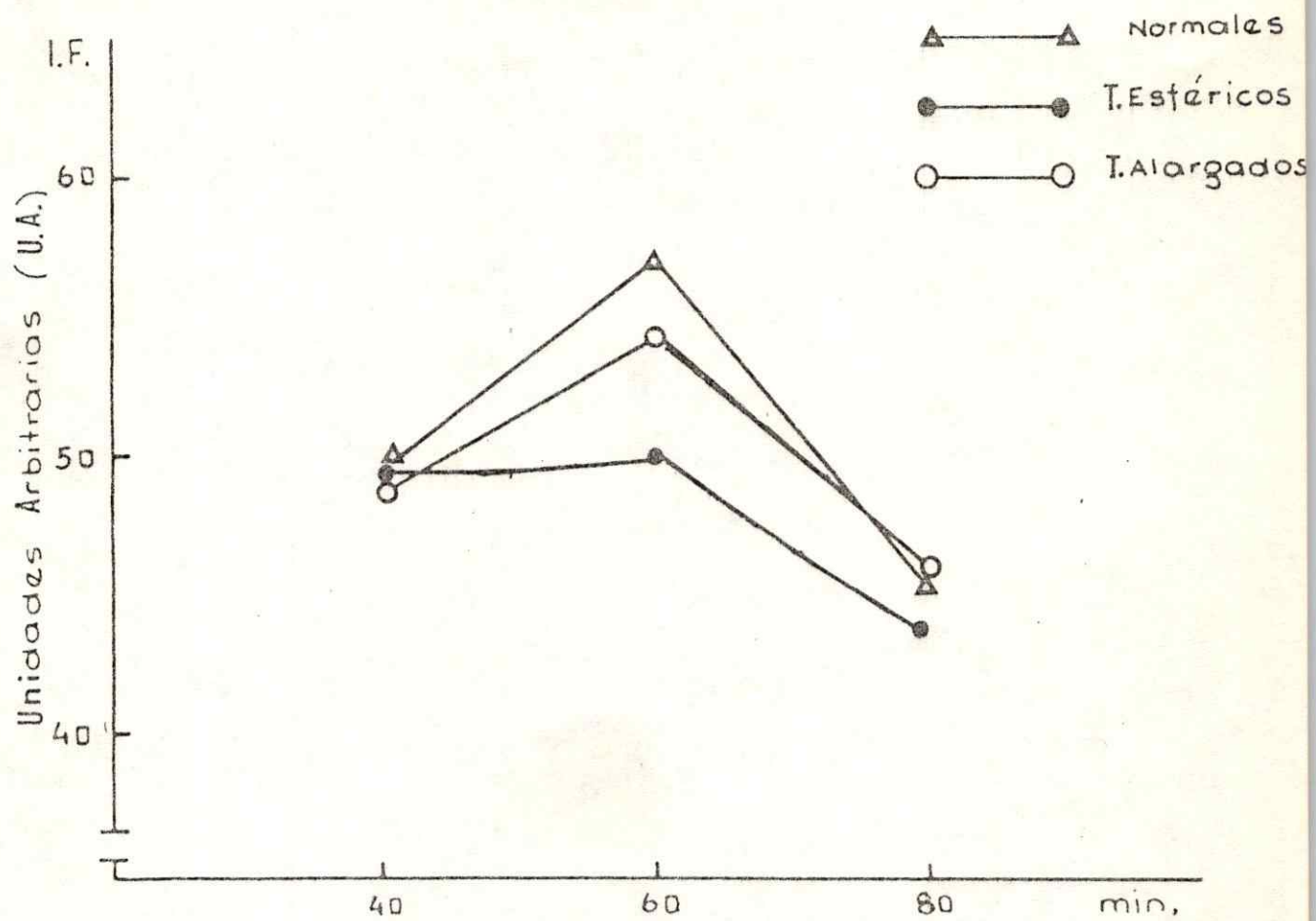


GRAFICO 2

Efecto del 2-mercapto etanol en concentración 0.01 M en la
reacción de Feulgen.

La curva descrita por los normo y teratoespérmicos
presentan el máximo de emisión de fluorescencia a los
60'. Valores más altos están dados por los normoespér-
micos respecto a los otros tipos celulares.



G R A F I C O 3

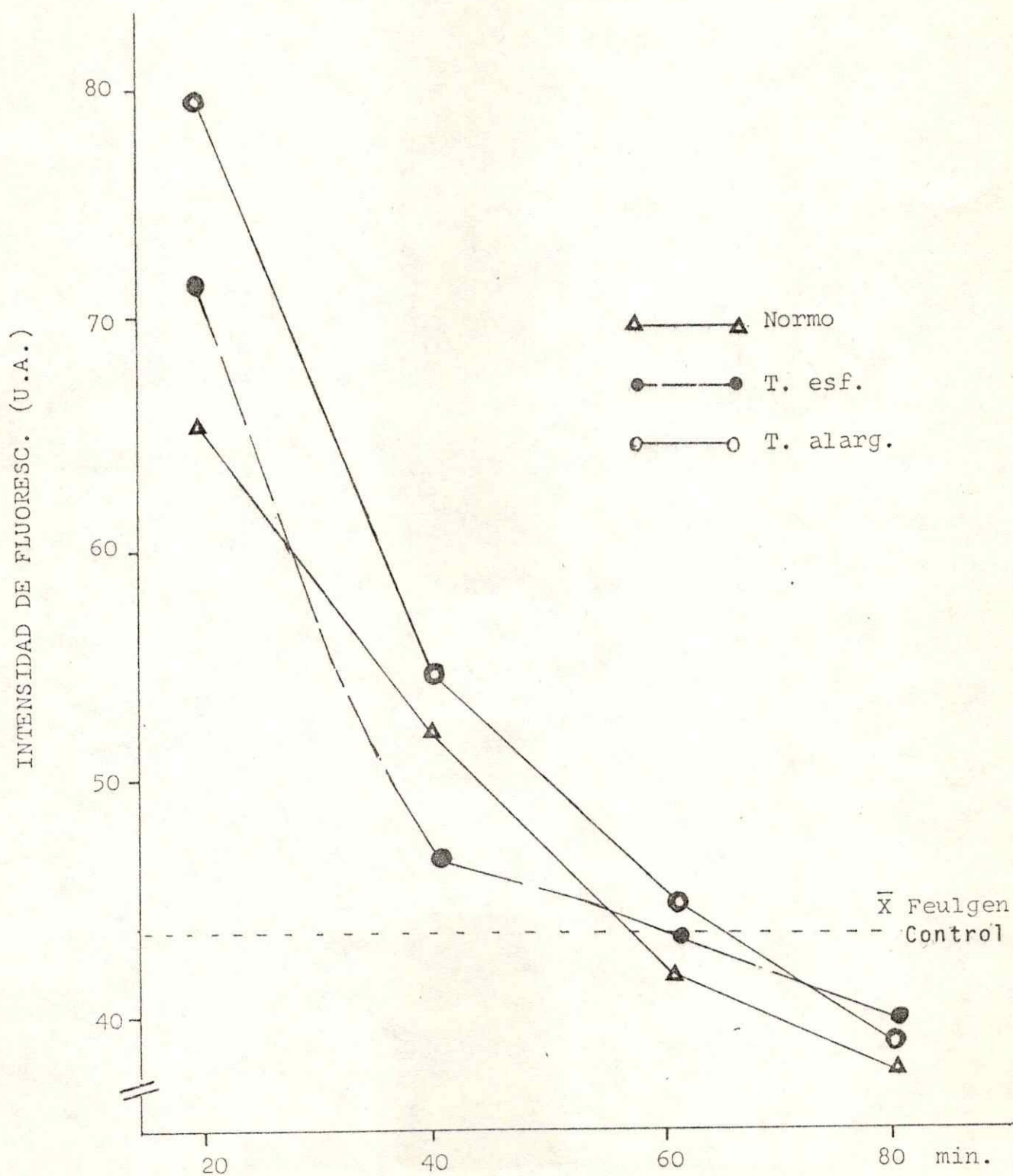
Efecto del 2-mercapto etanol en concentración de 0.1 M en la
Reacción de Feulgen.

Se observan los valores (UA) de intensidad de Fluorescencia obtenidas con el tratamiento con 2-ME 0.1 M.

La mayor intensidad se detecta a los 20' de hidrólisis y es mayor en teratoespérmicos con respecto a los normoespérmicos.

Desde los 40' se produce reabsorción de fluorescencia siendo mayor en T. alargados y T. esféricos con respecto a los de forma normal.

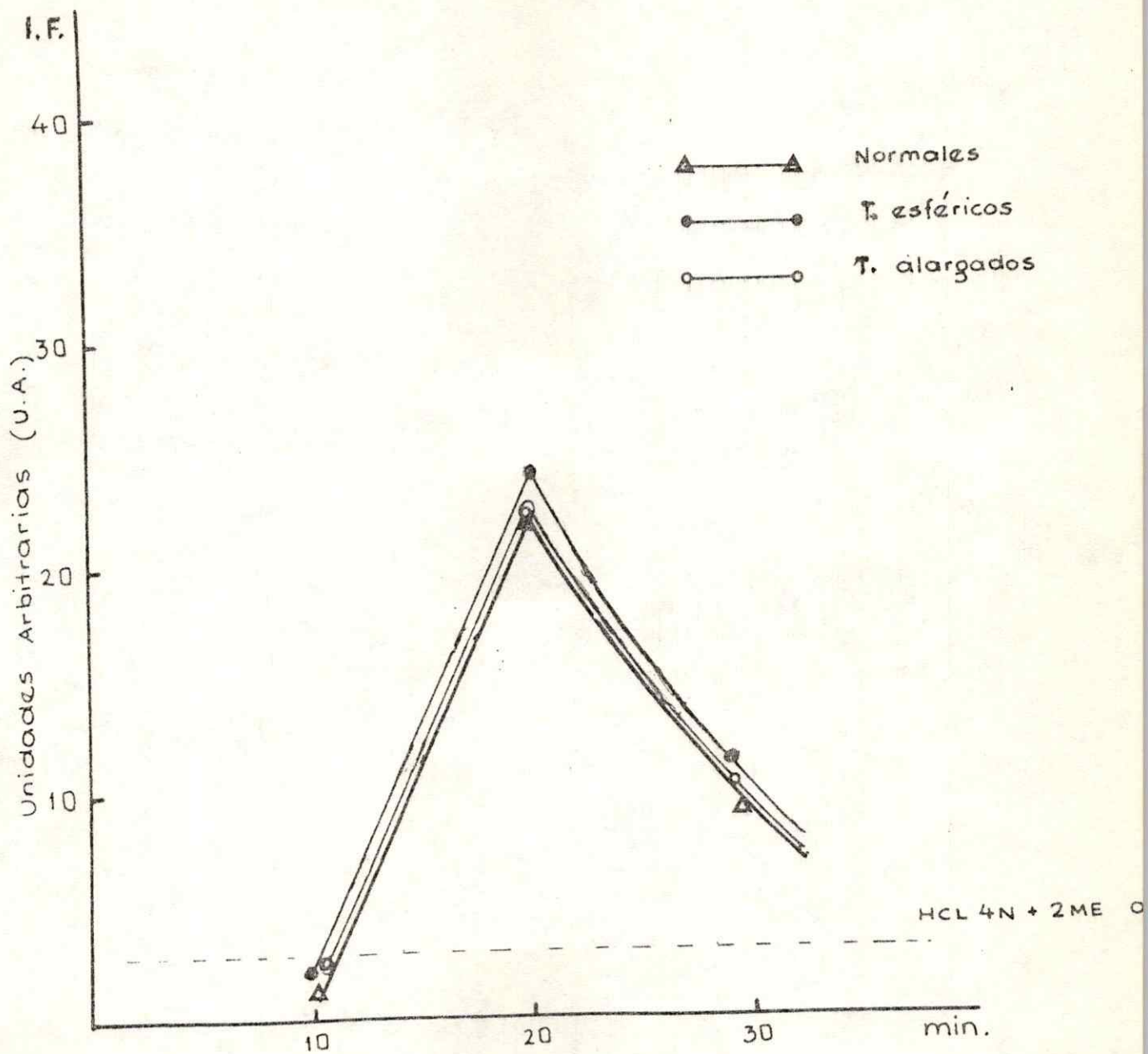
Se observa además que con la reacción de Feulgen control, esto es incubación en HCl 4N a 28°C por 60 minutos pero sin 2-ME se obtiene una menor intensidad de fluorescencia con respecto al Feulgen con 2-ME.



G R A F I C O 4

Efecto del 2-mercapto etanol 0.5 M en HCl 4 N y 1 M en HCl 1 N, en la reacción de Feulgen.

- 1) Reacción con HCl 4 N + 2-ME 0.5 M no es posible detectar fluorescencia en condiciones adecuadas; es un tratamiento muy drástico para la célula.
- 2) Con HCl 1 N + 2-ME se puede observar que se obtiene muy poca intensidad de fluorescencia y que es similar en los 3 tipos de espermatozoides.

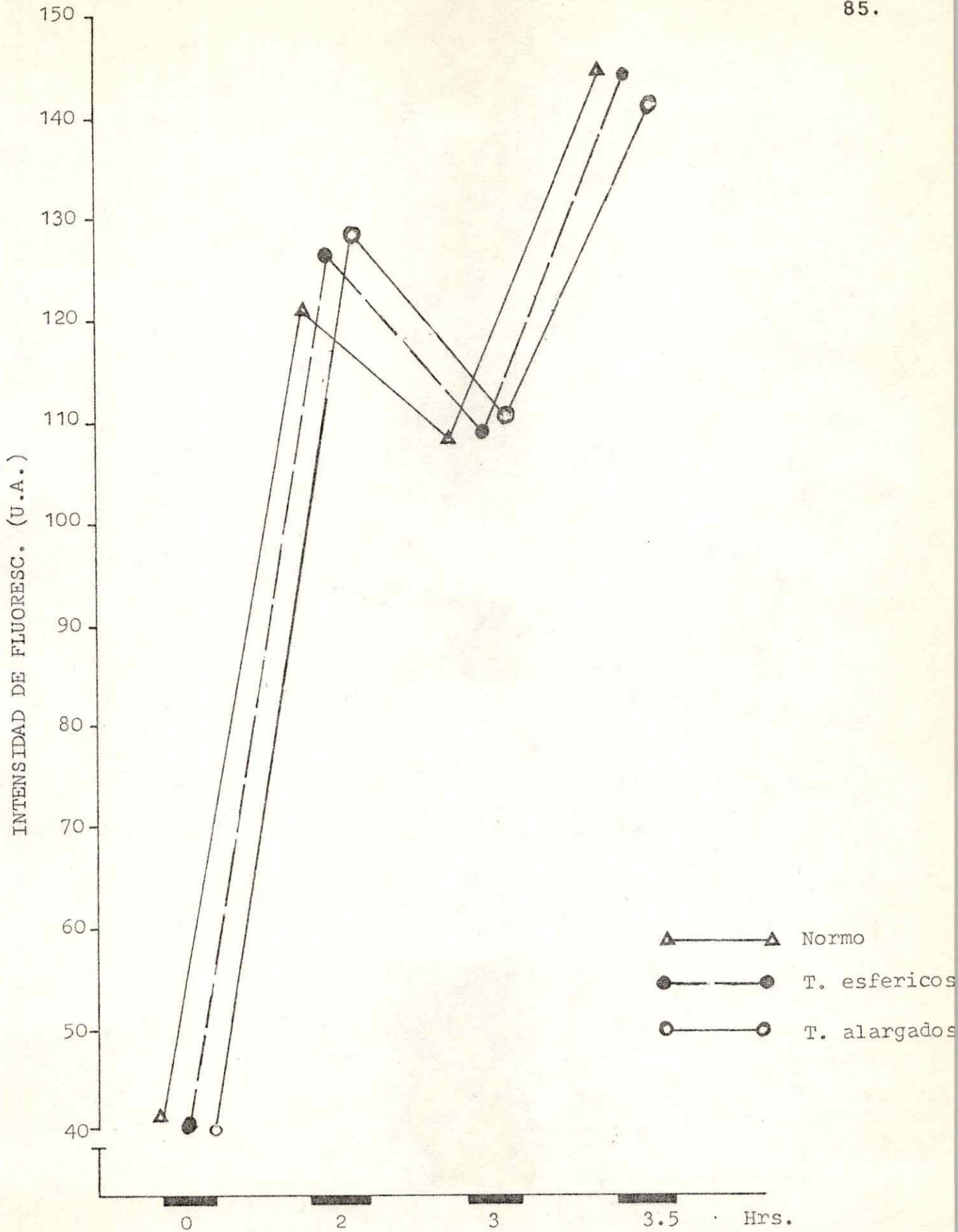


G R A F I C O 5

Determinación de Proteínas Totales con
Sulfaflavina brillante a pH 2.8:

Se observan curvas en que puede detectarse diferencias entre normo y teratospérmicos alargados con 2 horas de pre-extracción del ADN y cuantificación de Proteínas Totales.

A 0 tiempo (sin TCA) los tres tipos celulares tienen igual cantidad de proteínas "no histónicas" detectadas histoquímicamente.



G R A F I C O 6

Determinación de Histonas con
Sulfaflavina brillante a pH 8:

Los resultados obtenidos en los tres tipos de espermatozoides muestran valores similares a la hora de extracción del ADN.

A las dos horas de extracción, la detección de histonas es significativamente mayor en los T. esféricos con respecto a los normoespérmicos e incluso con respecto a T. alargados.

A las 3,5 horas se obtiene el máximo de intensidad de emisión de fluorescencia correspondiendo con el máximo de extracción de ADN.

INTENSIDAD FLUORESCENCIA (U. A.)

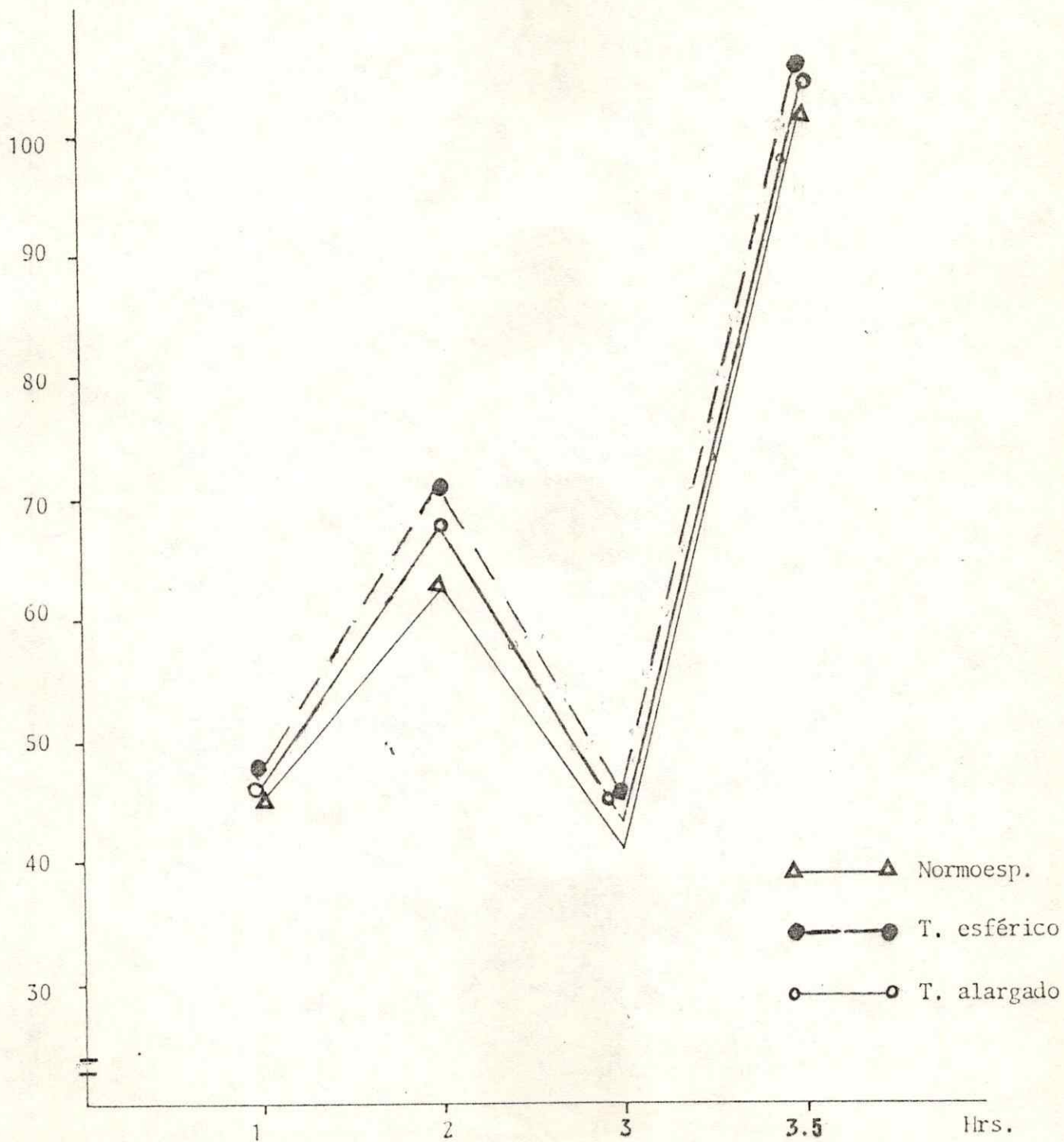
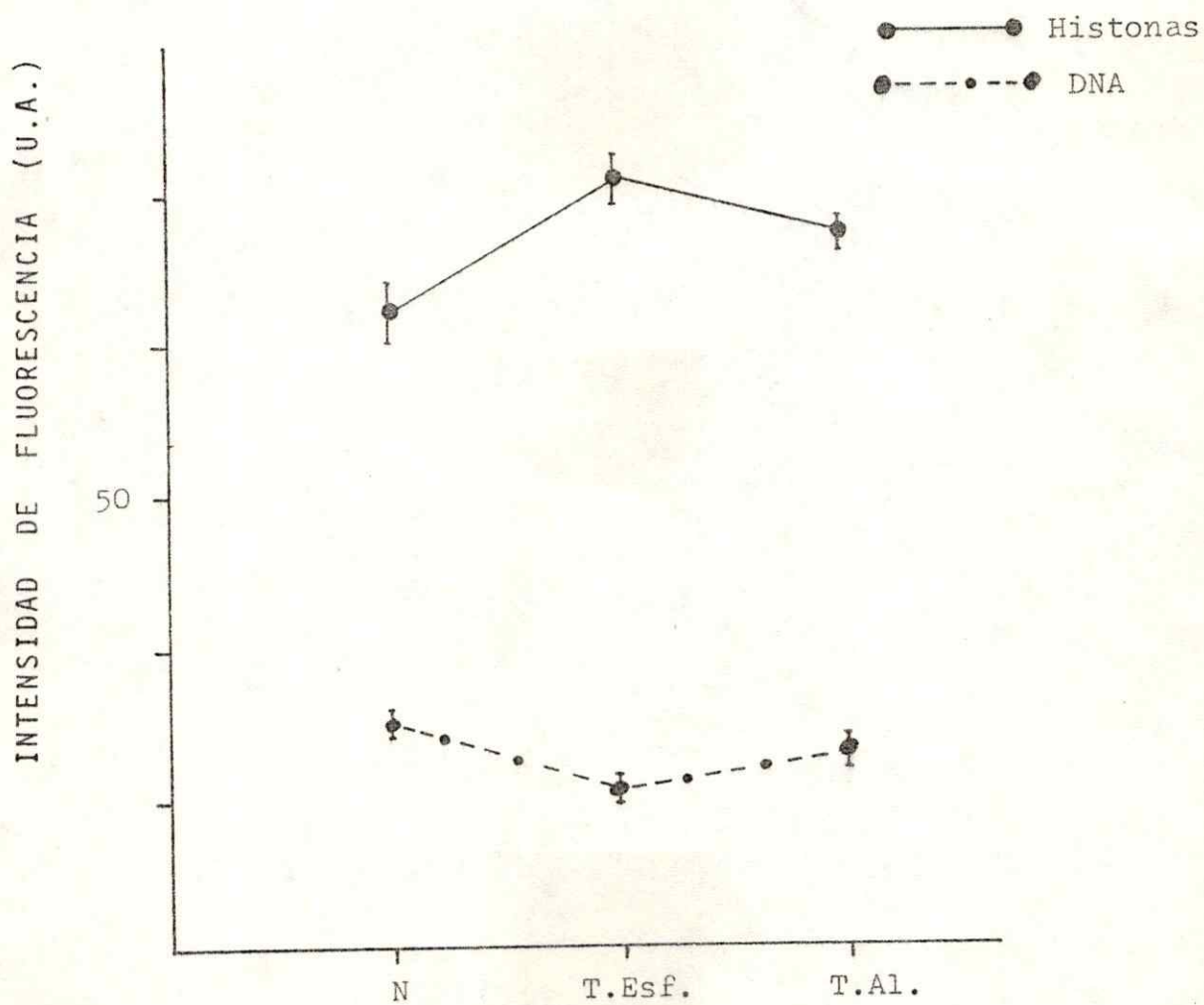


GRAFICO 7

Determinación de Histonas con Sulfaflavina brillante a pH 2.8 y ADN, post extracción con ácido tricloroacético al 5% a 60° por 2 horas:

Podemos observar que a las 2 horas hay una mayor detección de Histonas y menos ADN en los T. esféricos al compararlos con normoespérmicos.

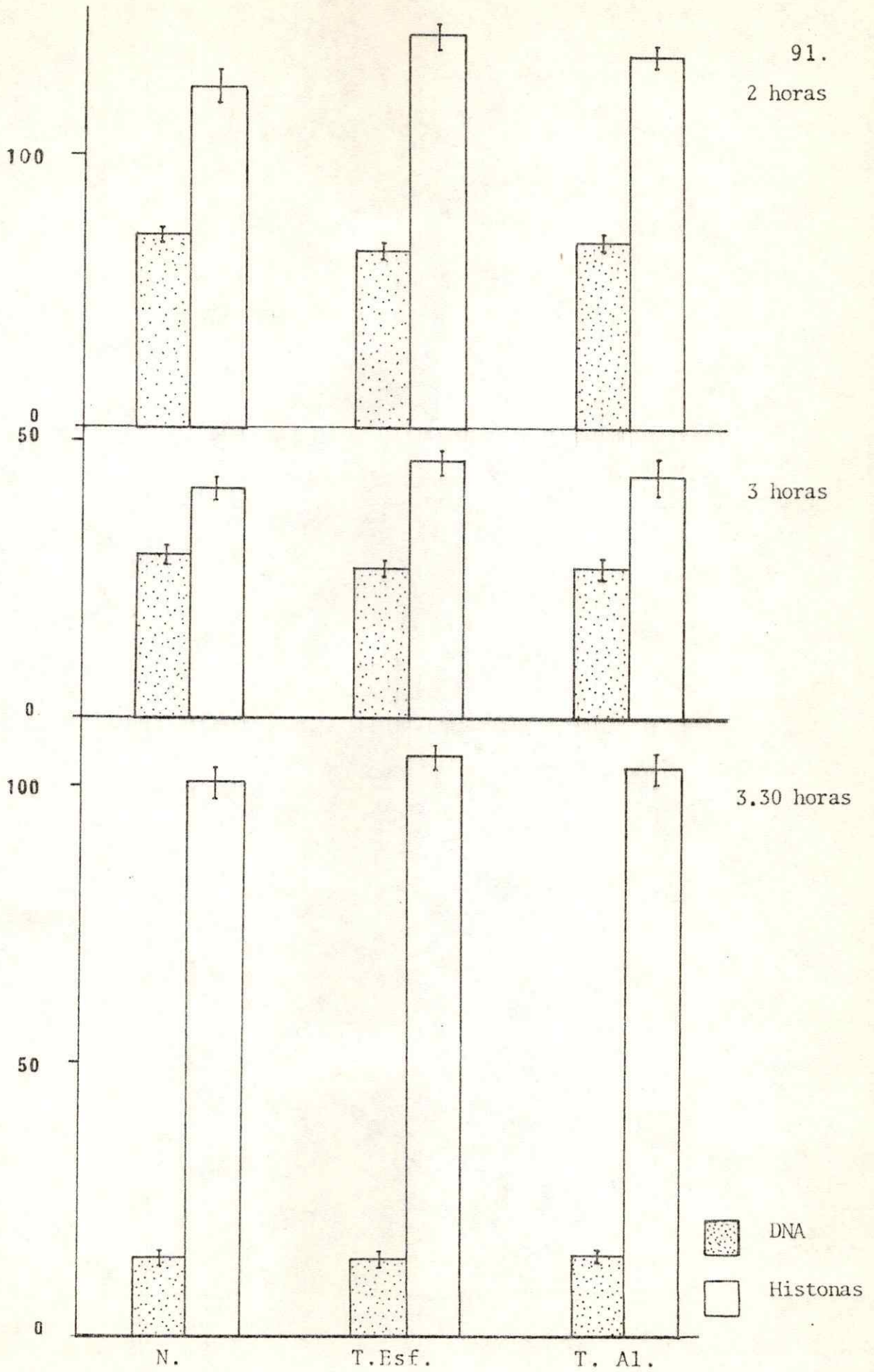


G R A F I C O 8

Identificación de Histonas con Sulfaflavina brillante a pH 2.8 y ADN con reacción de Feulgen standard.

- 1) A las 2 horas se puede observar que los T. esféricos presentan > cantidad de histonas y < cantidad de ADN.
- 2) A las 3 horas el histograma muestra una disminución en ADN remanente pero también un descenso en los valores de Histonas (¿reabsorción?) con respecto a las 2 horas.
- 3) A las 3.5 horas se detecta muy escasa cantidad de ADN; es similar en los tres tipos de espermatozoides pudiendose detectar una \geq cantidad de histonas.

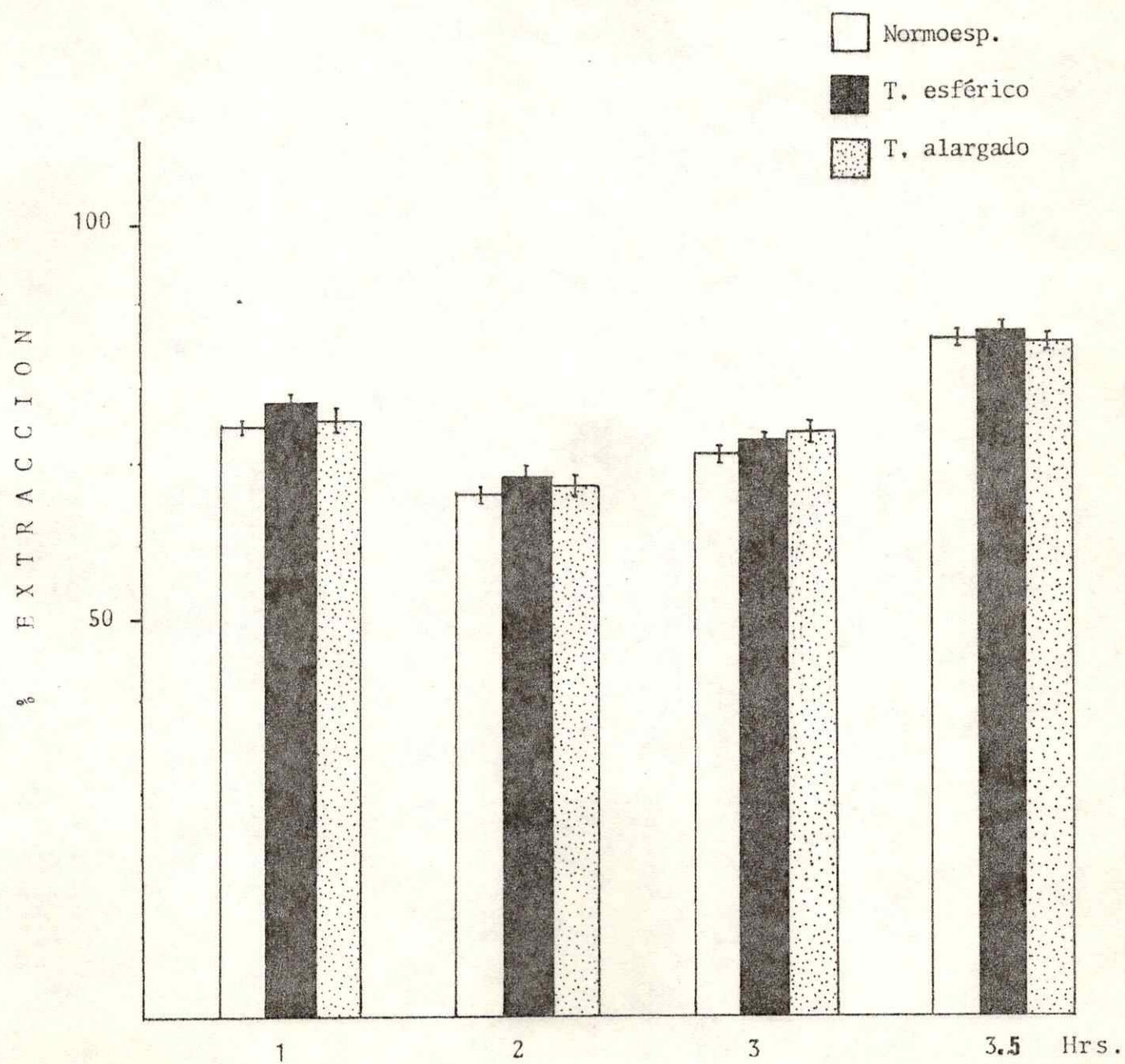
INTENSIDAD FLUORESCENCIA (U. A.)



G R A F I C O 9

Extracción del ADN con ácido tricloroacético
a 60° :

En el histograma se puede observar que a 1, 2 y 3 horas
hay menor % de extracción del ADN en los normospérmicos.

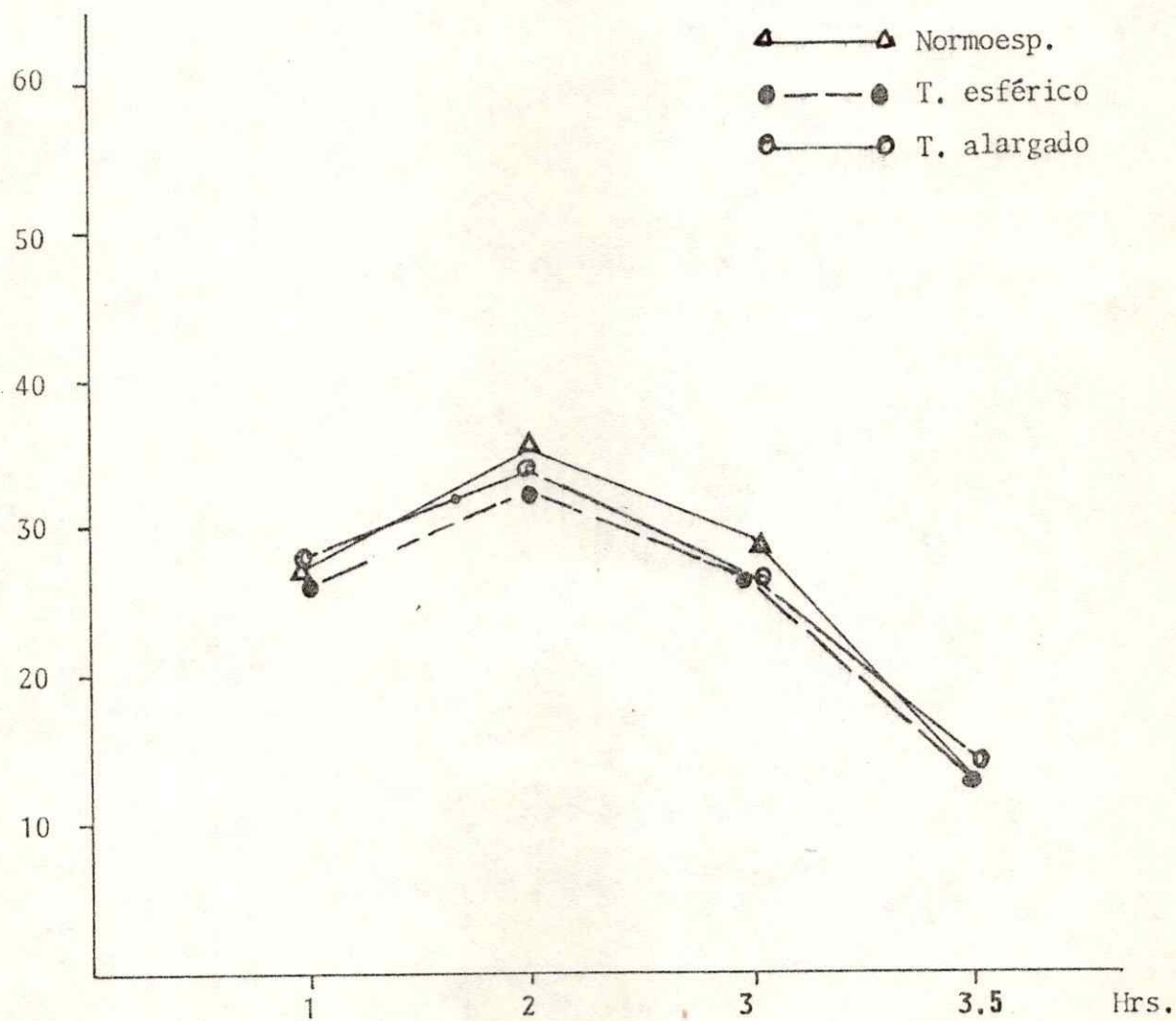


GRA F I C O 1 0

Determinación de ADN post-extracción con ácido tricloacético al 5% a 60° en diferentes tiempos:

El gráfico muestra al ADN remanente post-extracción con TCA al 5%. Hasta las 3 horas se observa que siempre se conserva mayor cantidad de ADN en el núcleo de normo-espermicos. A las 3.5 horas queda en el núcleo de cada espermatozoide una escasa cantidad de ADN detectable citofluorometricamente.

I N T E N S I D A D F L U O R E S C . (U . A .)



T A B L A I

Citofluorometría de reacción de Feulgen utilizando 2 concentraciones de 2-mercapto etanol y varios tiempos de incubación:

Nótese los mayores valores en el grupo de reacciones con 0.1 M. A los 20' es especialmente notoria la intensidad detectada en los espermatozoides T, alargados, comparada con la reacción realizada con 0.01 M de 2-mercapto etanol.

	T	NORMALES	T. ESFERICOS	T. ALARGADOS
	40'	49.8 ^y (3.7)	49.3 (7.6)	48.8 (8.3)
2ME - 0.01M	60'	57.7 (5.9)	49.8 (8.3)	54.5 (5.2)
	80'	45.8 (1.8)	44.1 (5.1)	46.0 (3.3)
	20'	66.3 (5.3)	71.5 (12.7)	79.3 (9.2)
	40'	52.6 (3.1)	46.4 (3.0)	54.6 (3.1)
2ME - 0.1M	60'	44.3 (2.8)	43.5 (3.2)	43.2 (2.6)
	80'	37.6 (3.2)	39.8 (4.5)	38.4 (3.7)

() - Desviación Standard

T A B L A I I

Porcentajes de la disminución relativa de la reacción de Feulgen, utilizando 2-mercapto etanol al 0.1 M ;

- Se indican los valores de fluorescencia en porcentajes de disminución por reabsorción o interferencia producida en los 3 tipos de espermatozoides. Notese que el > % de reabsorción afecta a los T. alargados; el < % a los normoespérmicos.

Tiempo (minutos)	Normales	T. esféricos	T. alargados
40	13.7	25.1	28.7
60	23.5	27.5	33.9
80	28.7	34.5	40.8

T A B L A III

(*)
Cuantificación de Proteínas Totales por citofluorometría
en los tres tipos de espermatozoides estudiados.

- 1) Se indican los valores obtenidos a 0 tiempo sin tratamiento indicando la presencia de proteínas "no histónicas".

- 2) Se indican los valores de proteínas (con DS y ES) obtenidos en 3 tiempos diferentes de extracción; se obtienen valores diferentes a las 2 horas de extracción dando (un poco) mayor reactividad los núcleos de cabezas de espermatozoides alargados.

(*) Los valores se expresan en unidades arbitrarias de citofluorometría.

Tiempo Ext.	Normoespermios	T. Esféricos	T. Alargados
0 Tiempo Sin TCA	<u>41.8</u> DS - 3.4 ES - 0.4	<u>40.0</u> DS - 3.2 ES - 0.4	<u>40.0</u> DS - 3.4 ES - 0.5
TCA 2.00 Hrs.	<u>121.0</u> DS - 3.9 ES - 0.6	<u>127.2</u> DS - 7.2 ES - 0.7	<u>128.0</u> DS - 4.6 ES - 0.4
TCA 3,00 Hrs.	<u>108.0</u> DS - 3.8 ES - 0.6	<u>109.2</u> DS - 3.5 ES - 0.5	<u>110.8</u> DS - 3.5 ES - 0.6
TCA 3,5 Hrs.	<u>144.6</u> DS - 2.5 ES - 0.4	<u>144.0</u> DS - 3.6 ES - 0.6	<u>141.6</u> DS - 4.0 ES - 0.7

(*) - Unidades Arbitrarias (UA)

T A B L A IV

Determinación de Histonas por citofluorometría en los tres tipos de espermatozoides estudiados:

- 1) Se indican los valores de citofluorometría obtenidos a diferentes tiempos de tratamiento.
- 2) A las 2 horas previa extracción del ADN se detecta mayor cantidad de emisión de fluorescencia, tanto en T. alargados como en T. esféricos.
- 3) A las 3.5 horas se obtiene la > intensidad de reacción de identificación y similar en los 3 tipos de morfología de espermatozoides.










Tiempo	Normoespermios	T. Esféricos	T. Alargados
TCA 2.00 Hrs.	<u>62.2</u> DS - 5.4 ES - 0.9	<u>70.5</u> DS - 4.3 ES - 0.7	<u>67.4</u> DS - 3.5 ES - 0.6
TCA 3.00 Hrs.	<u>40.9</u> DS - 2.4 ES - 0.4	<u>45.5</u> DS - 4.7 ES - 0.7	<u>43.3</u> DS - 6.0 ES - 0.9
TCA 3,5 Hrs.	<u>101.2</u> DS - 5.5 ES - 0.9	<u>105.3</u> DS - 4.2 ES - 0.7	<u>103.6</u> DS - 5.3 ES - 0.9

(*) - Unidades Arbitrarias (UA)

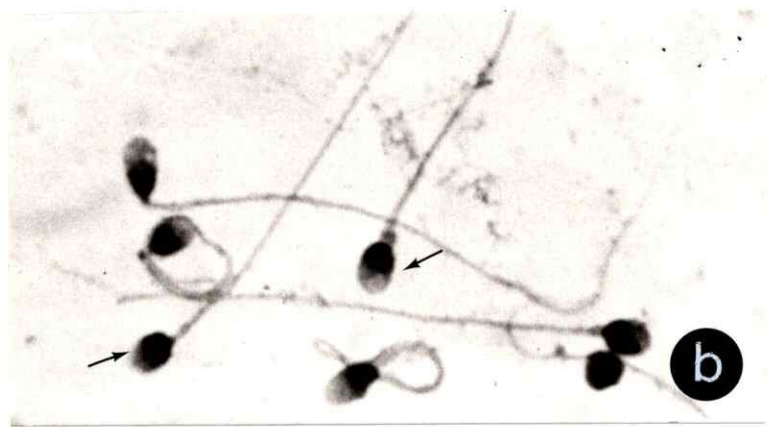
FIGURAS

F I G U R A 1Morfología de los Espermatozoides Humanos.

- a.- En dibujo esquemático se muestran diferentes características morfológicas. Esta nomenclatura es utilizada (por varios autores) en el "Espermiograma humano".
- b.- Frotis de semen humano teñidos con hemateina donde aparecen espermatozoides de forma oval y microcefálico (↑).
Observación en microscopio de luz con objetivo 100 X;
aumento final : 400.

MORFOLOGIAS DE ESPERMIOS										
										
Normal oval	Microcefalic	Macrocefalic	Puntiagudos	Bicéfalic	Bicaudados	Juveniles	Amorfos	Inmaduros	% Nor.	% Anor.

a



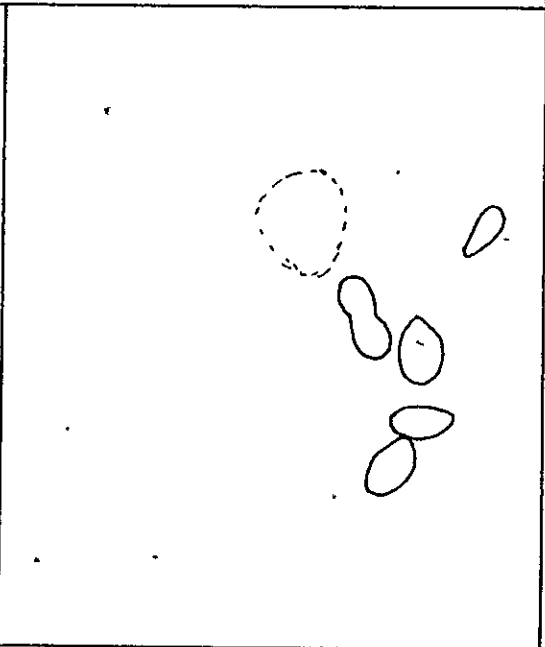
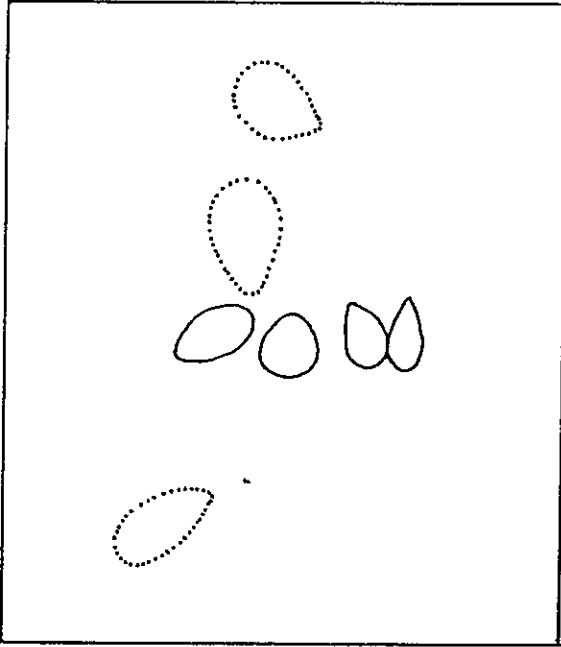
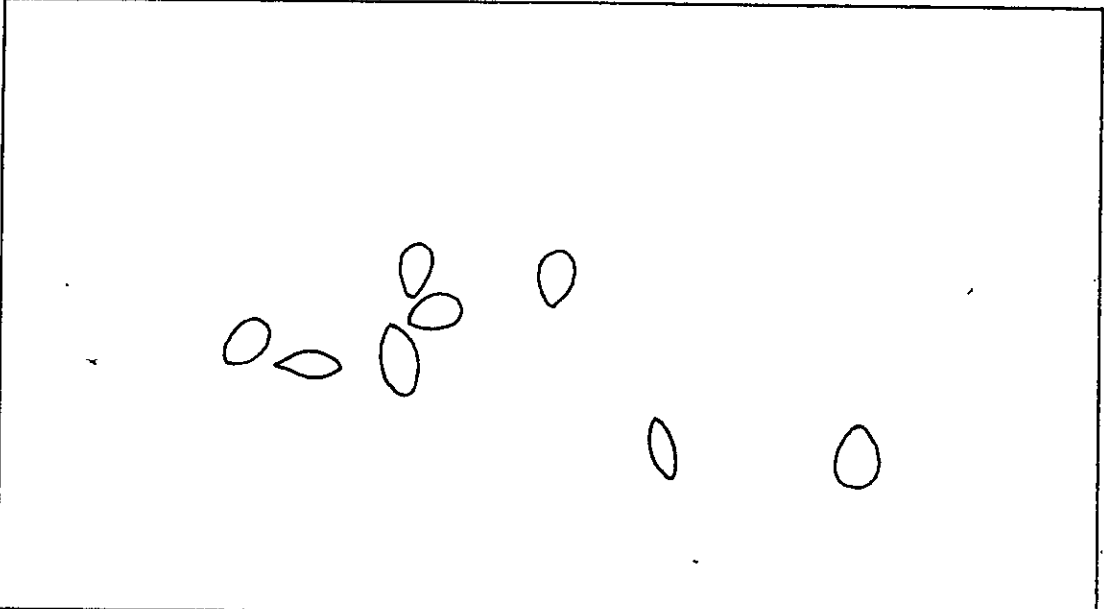
b

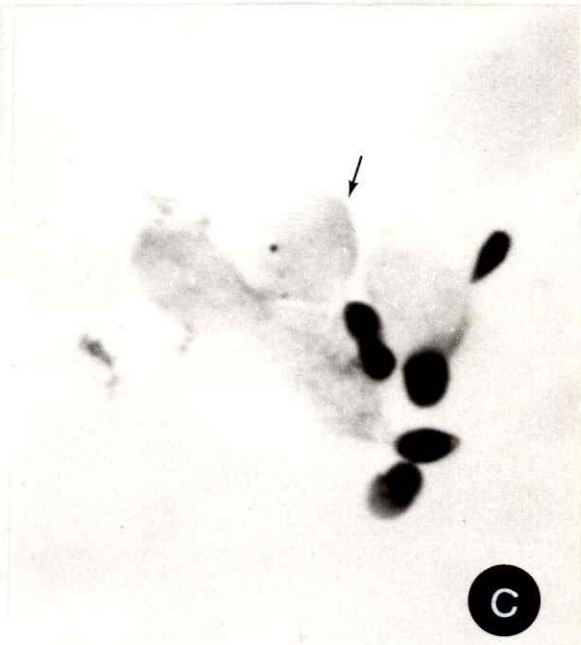
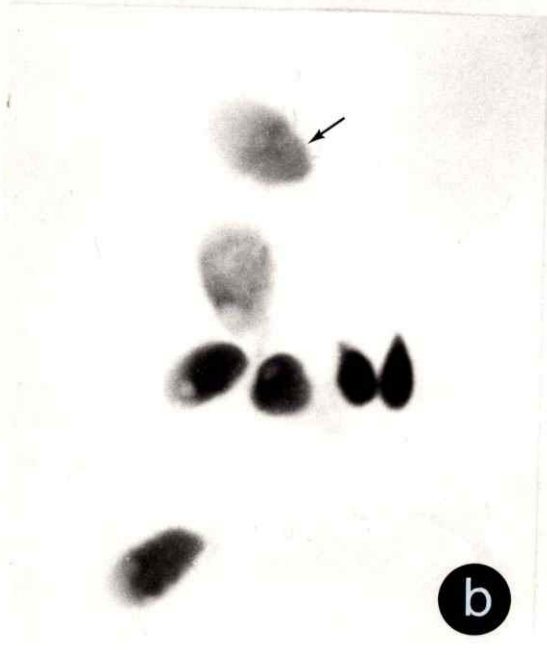
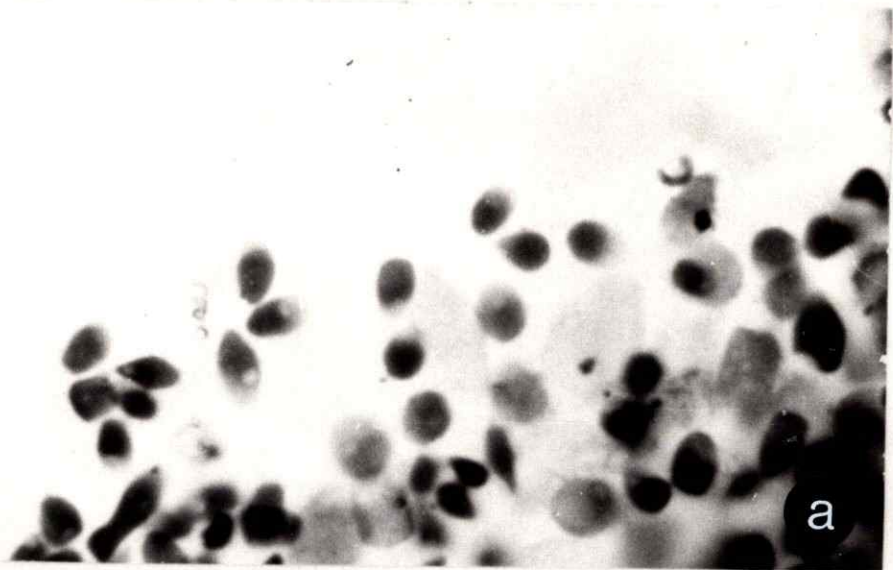
F I G U R A 2Espermatozoides humanos tratados con dodecil sulfato de Na⁺ (SDS) "in vitro" (x).

- a.- Espermatozoides incubados "in vitro" en SDS al 0.5% con DTT al 0.002 M por 4' a temperatura ambiente. Se observan algunas cabezas de espermatozoides ligeramente aumentadas de tamaño y menos coloreadas; otras de tamaño normal e intensamente coloreadas.
- b.- Igual tipo de incubación, (igual a 2a.). Se observan cabezas muy dilatadas (♂) y otras de tamaño practicamente normal.
- c.- Incubación igual a 2b. Algunas cabezas de espermatozoides muy dilatadas y levemente teñidas (♂); otras de tamaño normal con intensa coloración.

(x) - Tinción : Hemateina

- Fotografías : Aumento total 400 X



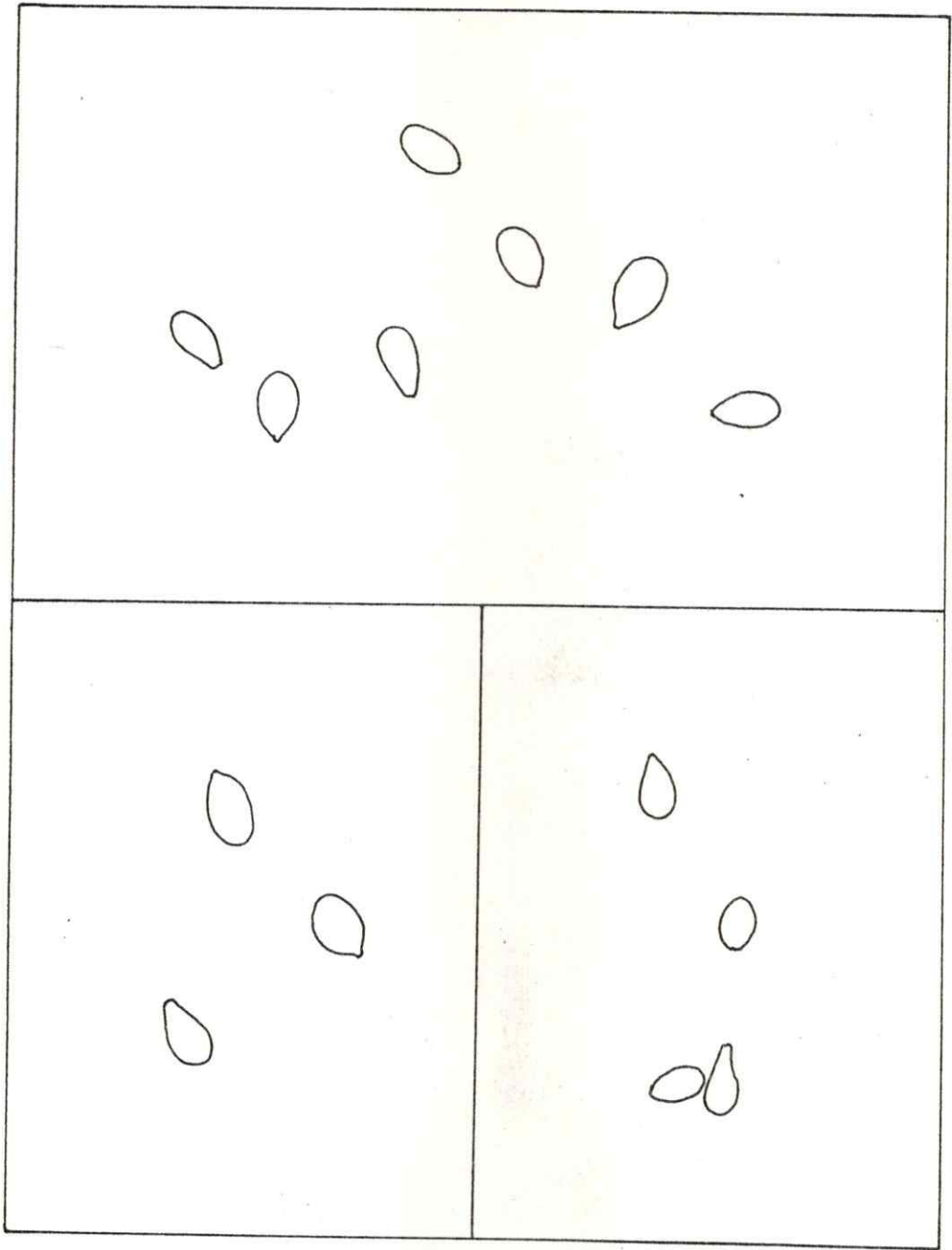


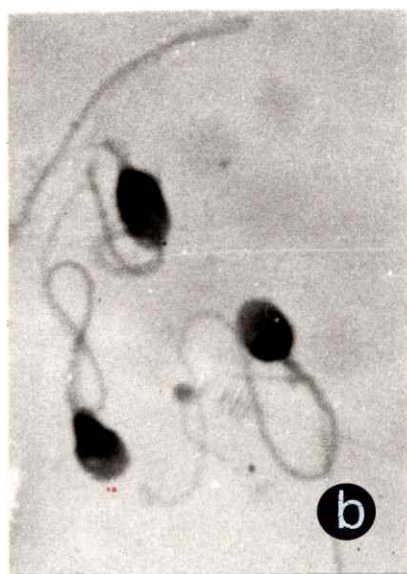
F I G U R A 3Espermatozoides incubados en tioglicolato de Na⁺ "in vitro"(x)

- a.- Espermatozoides incubados en tioglicolato de Na⁺ (pH 9) por 8' a temperatura ambiente. Se observa que todos los espermatozoides están hinchados en diversos grados. El aumento de volumen es manifiesto comparado con el control.
- b.- Espermatozoides incubados por 4' muestran aumento de volumen si se compara con el control sin tratamiento (C).
Tanto formas normales como anómalas se han modificado ligeramente.
- c.- Espermatozoides sin tratamiento con tioglicolato (control)
Se observa el tamaño normal y algunos normospérmicos (♂).

(x) - Tinción : Hemateina

- Fotografías : Aumento total 400 X



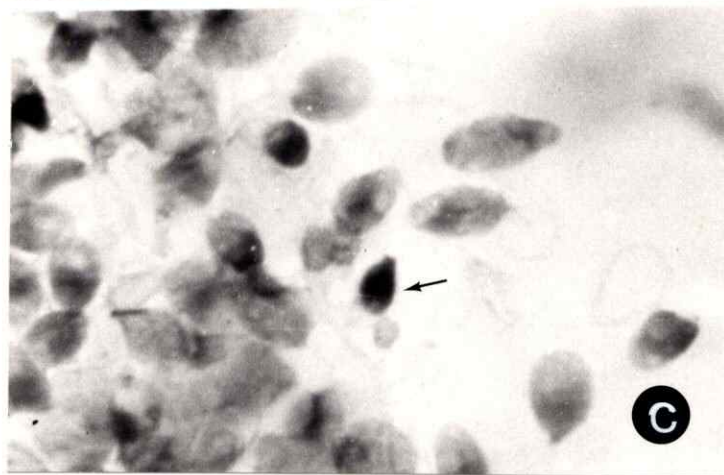
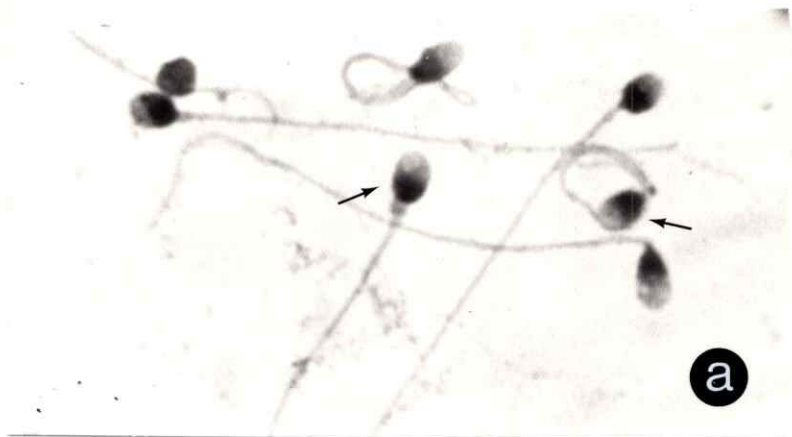


F I G U R A 4Espermatozoides incubados en tioglicolato de Na⁺ "in vitro". (x)

- a.- Control; espermatozoides sin tratamiento. Se observan formas normales (♂) y alteradas.
- b.- Células incubadas en tioglicolato durante 4'. Cabezas de espermatozoides se observan levemente hinchadas.
- c.- Células tratadas durante 10' con tioglicolato. Las cabezas se observan muy aumentadas de volumen al compararlas con el control.

(x) - Tinción : Hemateina

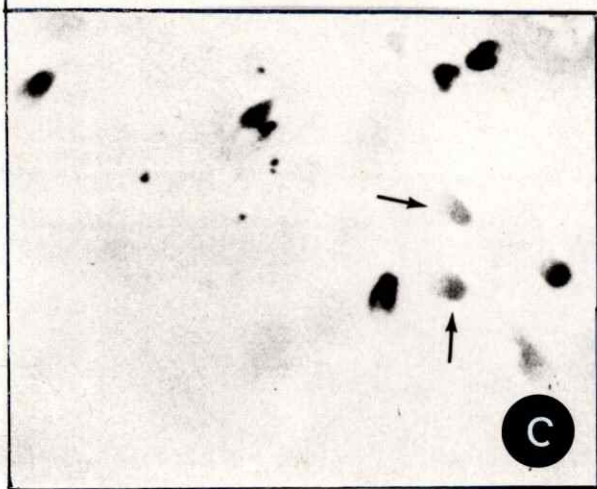
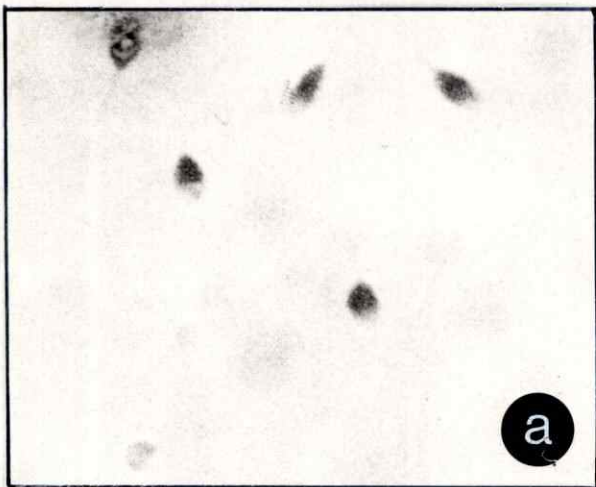
- Fotografías Aumento total : 400 X



F I G U R A 5Reacción diferencial de Feulgen fluorescente.(x)

- a.- Espermatozoides tratados con reacción de Feulgen fluorescente standard (HCl 4N a 28°C por 60') presentan una muy tenue coloración al ser observado en microscopio de luz.
- b.- Reacción de Feulgen en la cual se ha agregado al medio de hidrólisis el reductor 2-ME 0.1 M durante 40'. Se observan algunas cabezas de espermatozoides anómalos con una mayor intensidad de reacción, produciéndose en ellos reabsorción esto es menor emisión de fluorescencia.
- c.- Tratamiento de hidrólisis similar a Fig.5-b pero con incubación de 60' muestra cabezas de espermatozoides teratospérmicos con una gran intensidad de coloración (producirá reabsorción de fluorescencia); se conserva con baja intensidad de coloración cabezas de normospérmicos (↑).

(x) Fotografías tomadas con objetivo 100 X; Aumento total, 200.



F I G U R A 6Reacción de Feulgen Fluorescente.

Espermatozoides con Feulgen fluorescente standard. Se observan las cabezas que emiten fluorescencia roja, que en la fotografía aparecen en blanco sobre fondo negro. Objetivo 100 X. (Total 120).

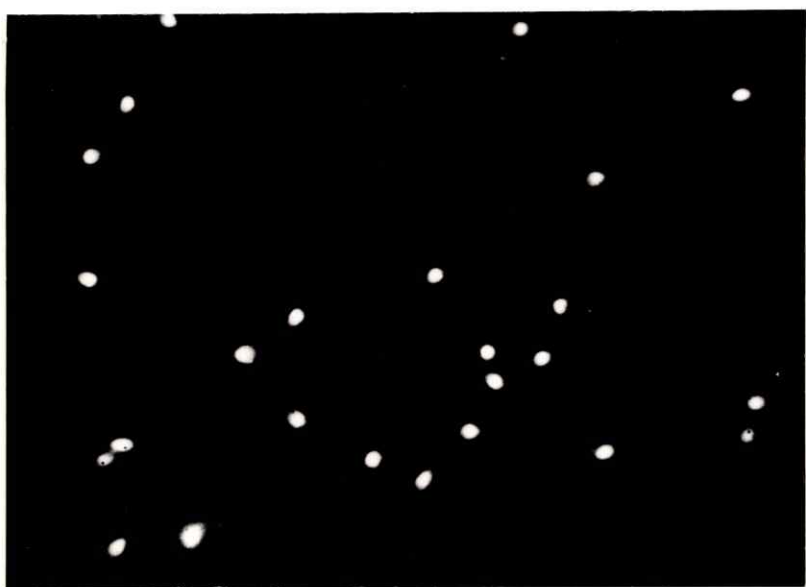


FIGURA 7

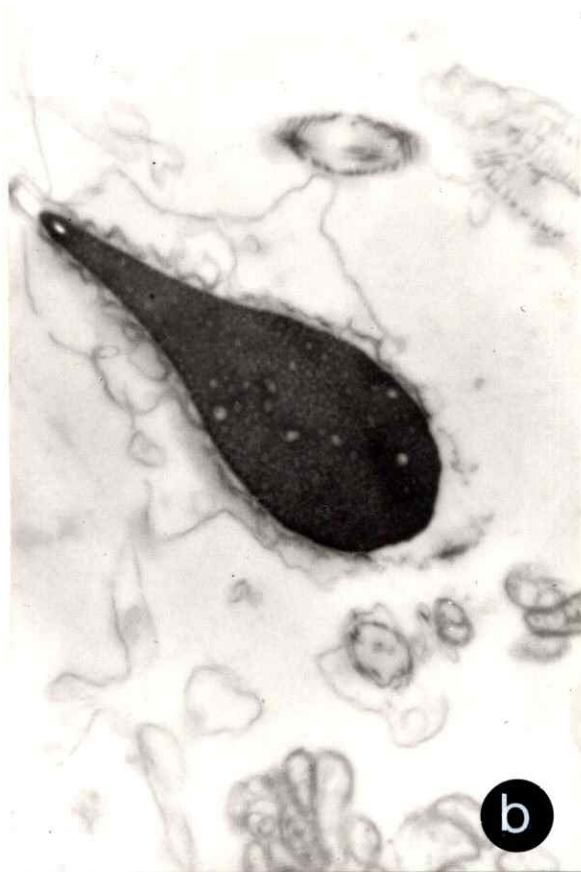
Aspecto morfológico de la cabeza de espermatozoides humanos .

a y b.- Se observan cabezas de forma oval normal que muestran la cromatina muy condensada y algunas vacuolas. Con tinción uranilo/plomo. 15.000 X.

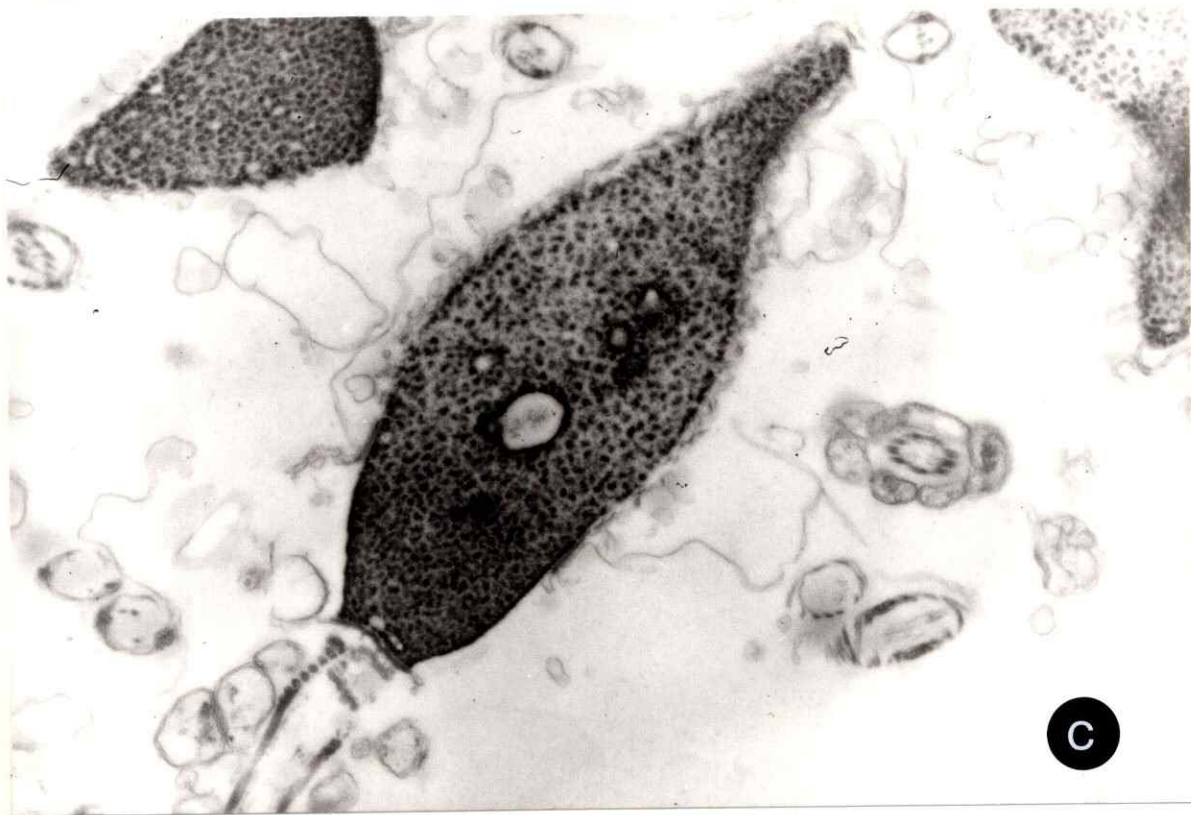
c.- Espermatozoide de forma oval; núcleo con cromatina menos condensada y de aspecto granular. Este aspecto de la cromatina se puede observar en semen de individuos normoespérmicos. Con tinción de contraste. 24.200 X.



a



b



c

F I G U R A 8

Figuras 8, 9, 10,11 corresponden al estudio de SH en muestras de Semen normoespérmico (grupo I). Todas las fotografías corresponden a preparaciones sin tinción de contraste:

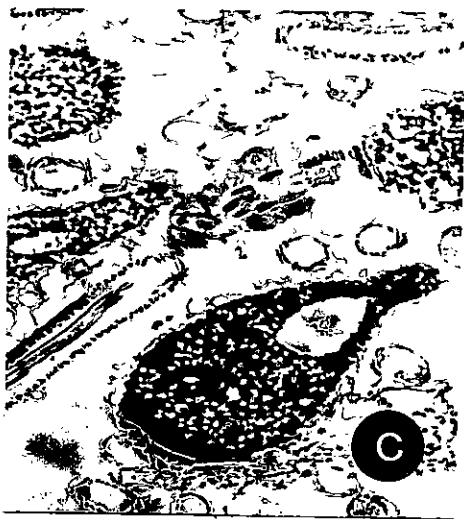
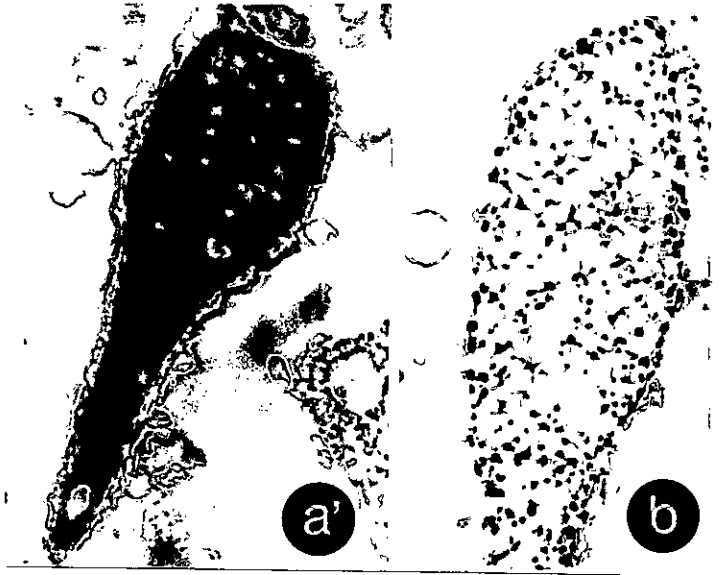
a. Control de la reacción.

a' - Espermatozoides de normoespérmicos muestran el núcleo con la cromatina condensada después de 4' y 5' de tratamiento con tioglicolato de sodio. Se detecta densidad electrónica en el núcleo indicando reacción positiva para SH. 15.000 X; ; comparar con a, en la cual se ha omitido el compuesto de Hg. (control). 14.600 X.

b.- Espermatozoides con ligera decondensación de la cromatina; se observa una organización granulo-fibrilar SH positiva. Los granulos se disponen ordenadamente en la periferia del núcleo, no así en la parte central. 15.000 X

c.- Se observan núcleos con leve y otros con notoria decondensación de la cromatina con positividad para SH. 13.600 X.

d.- Espermatozoides con núcleo muy decondensado mostrando una trama granulo-fibrilar poco evidente y prácticamente negativa para SH (baja densidad electrónica). 21.750 X.



F I G U R A 9

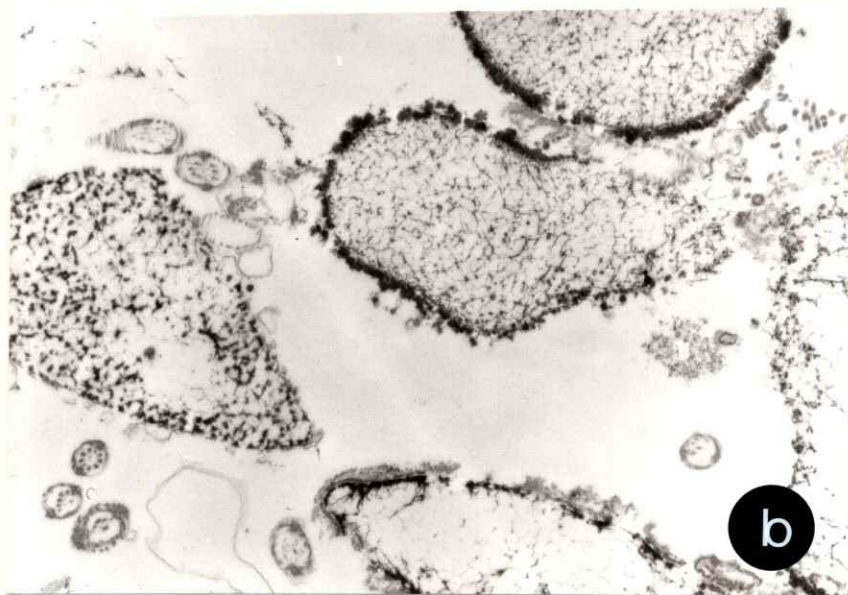
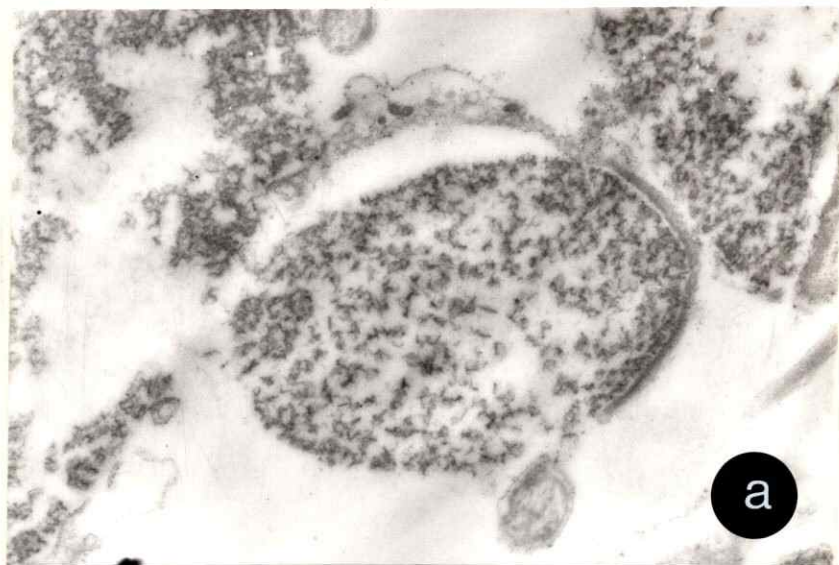
A mayor aumento la Fig. 8c; espermatozoides con núcleo que muestra zonas de gran densidad electrónica SH positivas.

También se observan flagelos seccionados en diferente ángulo mostrando zonas SH positivas. Sin tinción de contraste. 38.000 X.



F I G U R A 10

- a.- Núcleo de aspecto esférico con cromatina desagregada; no se detecta con claridad la organización de la trama gránulo - fibrilar que se muestra en 8b. Aparece practicamente negativo. 26.000 X.
- b.- Tratamiento similar a 10a, pero se ha aplicado además tinción de contraste con uranilo/plomo. Se observan núcleos de espermatozoides con notoria desagregación de la cromatina que muestra el aspecto gránulo-fibrilar; algunos poseen una zona cortical que se realza con la tinción uranilo/plomo. 11.100 X.



F I G U R A 11

Espermatozoides de forma normal con reacción para SH. En reductor se incubaron 8'; no se aplicó tinción de contraste.

- a.- Se observa la trama granulo-fibrilar con una zona de alta densidad electrónica, que está rodeando al núcleo; granulos y zona cortical SH positivas. 11.000 X.
- b.- Igual que en a.- : se destaca muy bien la positividad para SH en la zona cortical y parte anterior de la cabeza; se observa lisado en la parte opuesta (p. posterior) 24.000 X.



a

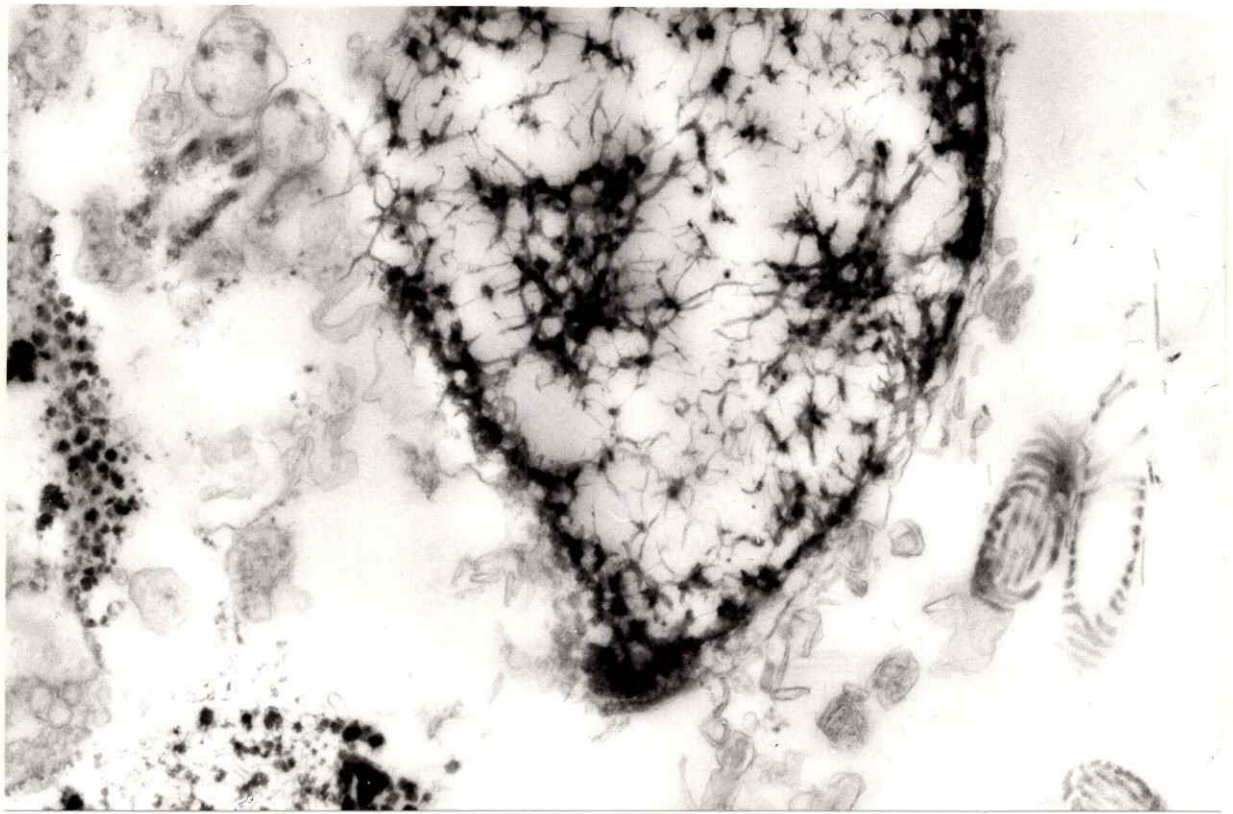


b

FIGURA 12

Se observa el núcleo de un espermatozoide de forma normal; reacción para SH (tioglicolato 8') además de tinción de contraste uranilo/plomo.

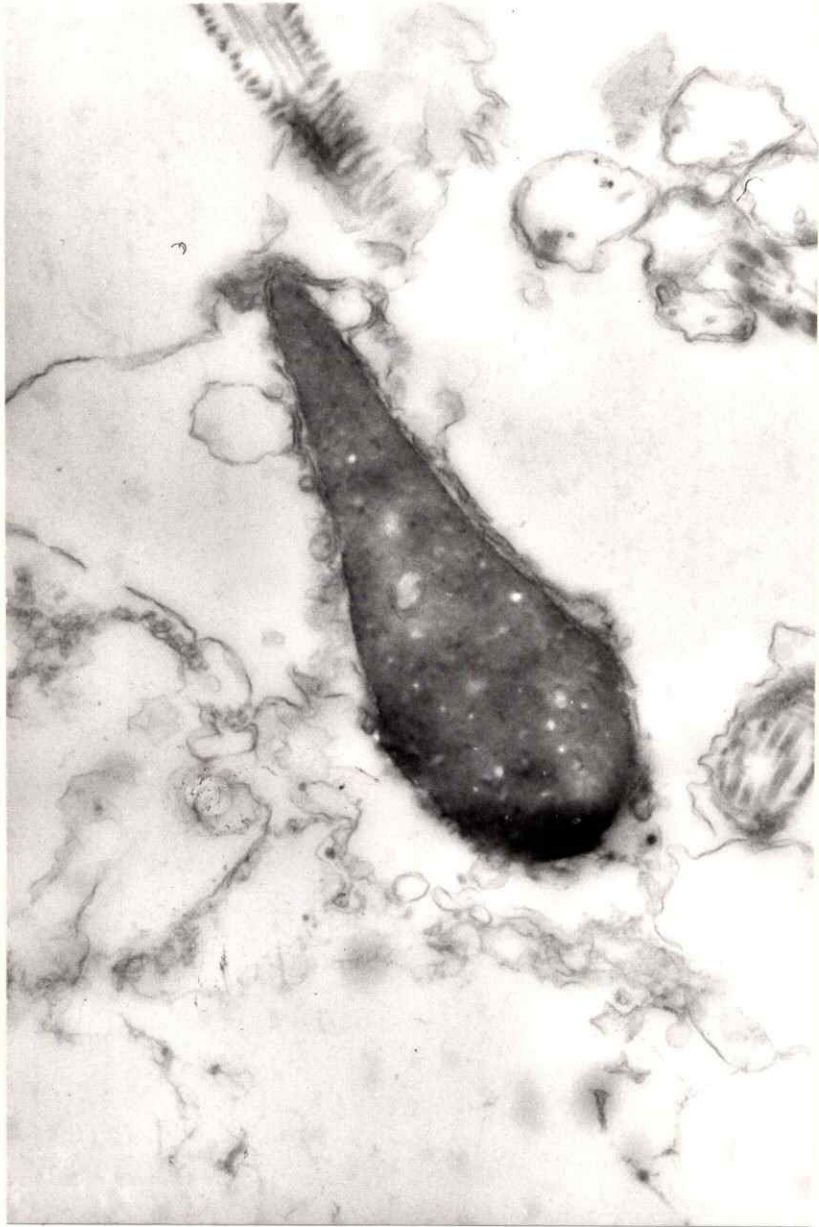
Nótese la estructura gránulo-fibrilar de la cromatina semidencondensada que se conserva en la zona central y periférica del núcleo. 30.000 X.



F I G U R A 13

Espermatozoides de semen con alta normoespermia
(Grupo II) tratada como en 11.

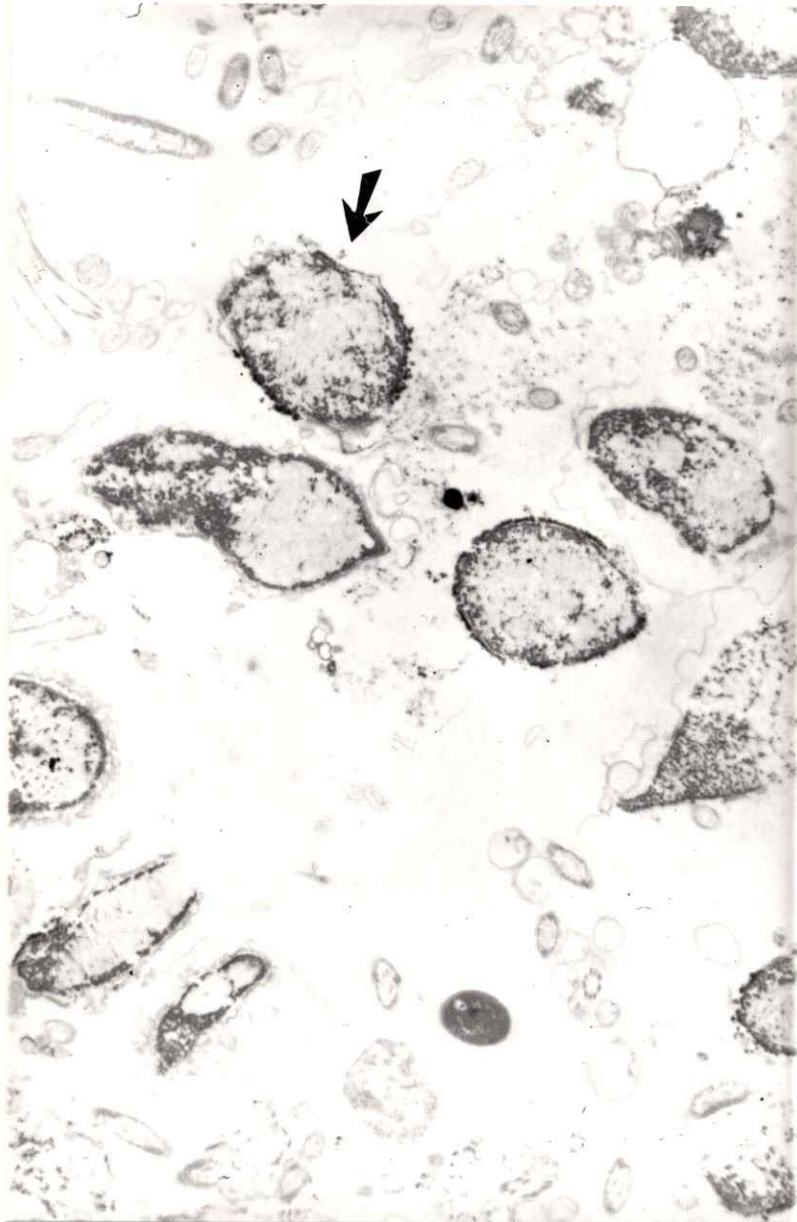
El núcleo muestra la cromatina condensada con po-
sitividad para reacción de SH. Sin tinción de contraste.
29.000 X.



F I G U R A 14

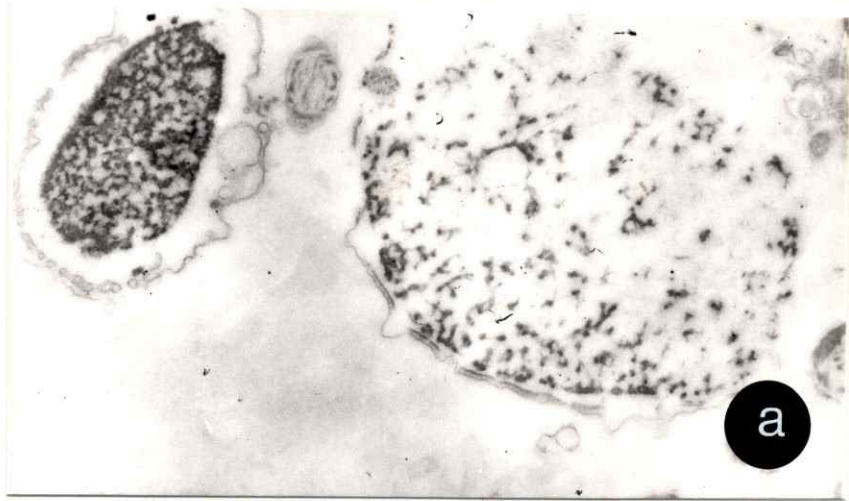
Las figuras 14 y 15 corresponden a la fracción de espermatozoides inmóviles de semen con alta teratospermia. (Grupo III). Método para SH, con 6' en tioglicolato de sodio.

Los espermatozoides muestran decondensación con 6' de tratamiento con reductor, especialmente en la zona cortical del núcleo. Zonas de cromatina muestran decondensación dando SH positiva. 10.200 x



F I G U R A 15

- a.- Núcleo de aspecto esférico, muy decondensado; gránulos SH positivos, otros con reactividad menor. 18.700 X.
- b.- Igual que en a.-; nótese la decondensación con aumento de tamaño, que contrasta con el aspecto poco decondensado de otros núcleos que corresponderán a cabezas de espermatozoides de forma oval. Reacción positiva para SH. 19.000 X.



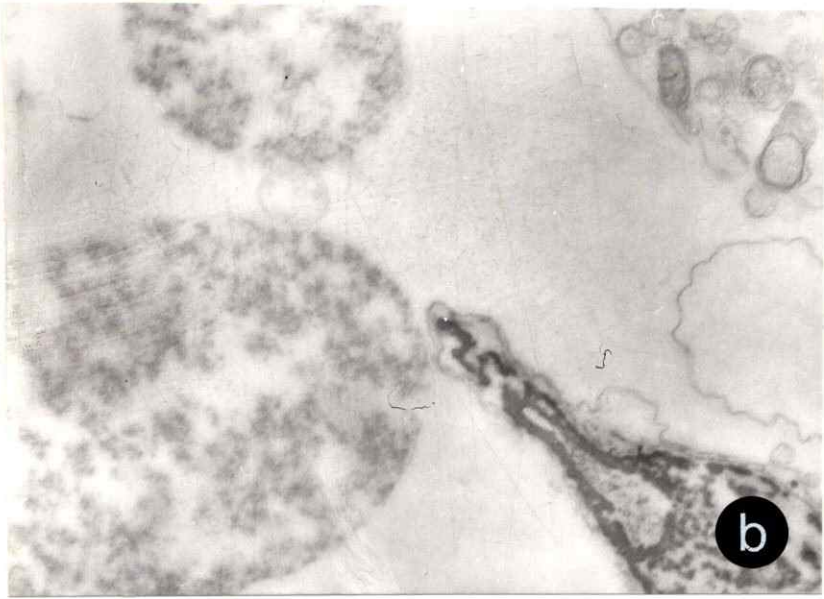
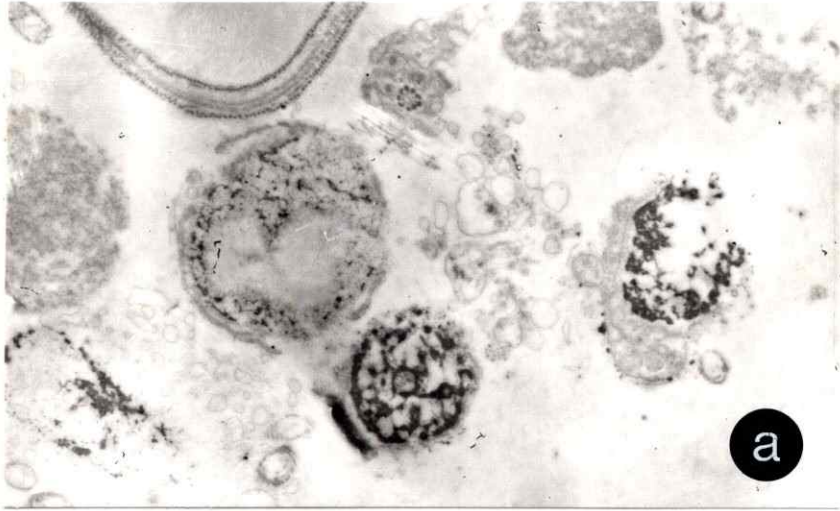
F I G U R A 16

Espermatozoides de semen con alta teratospermia (Grupo III). Se aplicó método para SH; tratamiento de 8' en tioglicolato de sodio.

a.- Muestran núcleos con cierto grado de decondensación; en a.- se observan dos núcleos con reacción positiva para SH, los otros prácticamente negativas. 12.000 X.

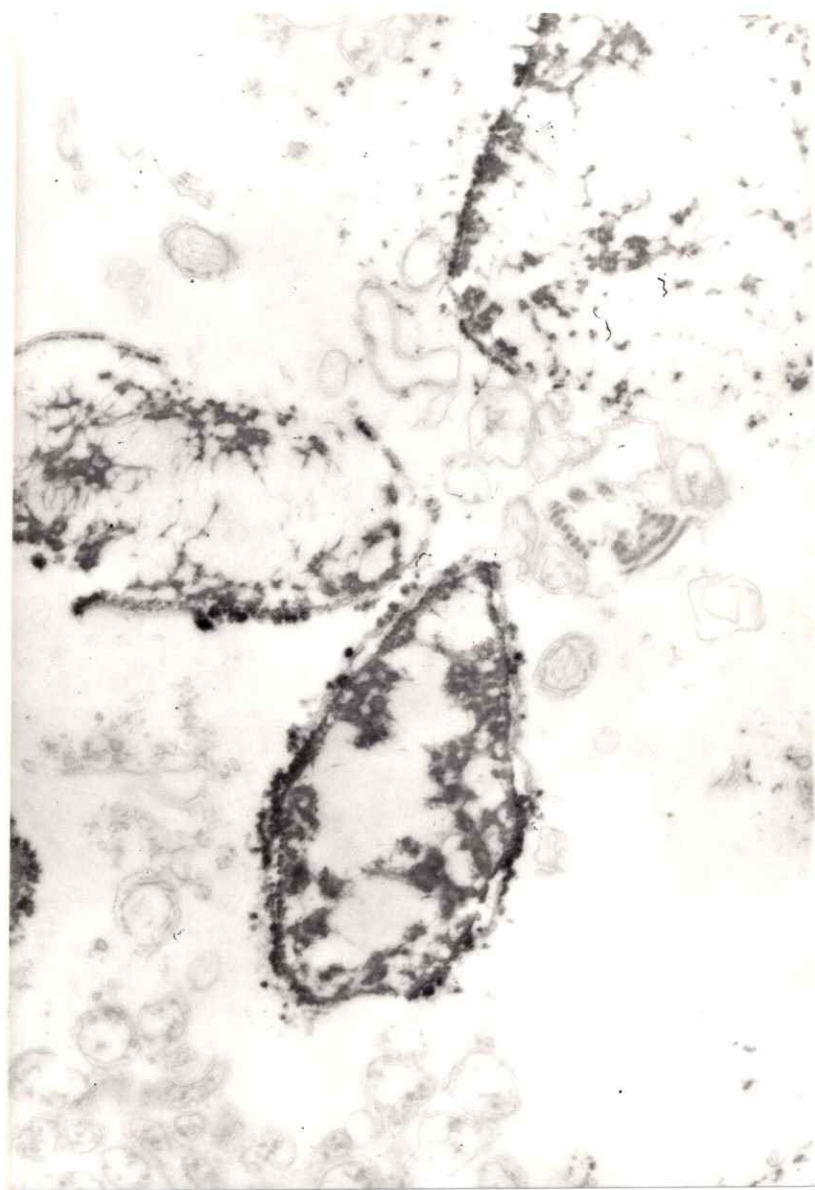
b.- Se observan cabezas de espermatozoides de forma esférica decondensados; cromatina de aspecto pulverulento y negativo para la reacción para SH.

También se detecta un núcleo de espermatozoides con cromatina SH positiva. 19.800 X.



F I G U R A 17

Igual que en 16; se observan núcleos decondensados con zonas de la cromatina SH positiva; dispuesta preferentemente en la periferia. 18.200 X.

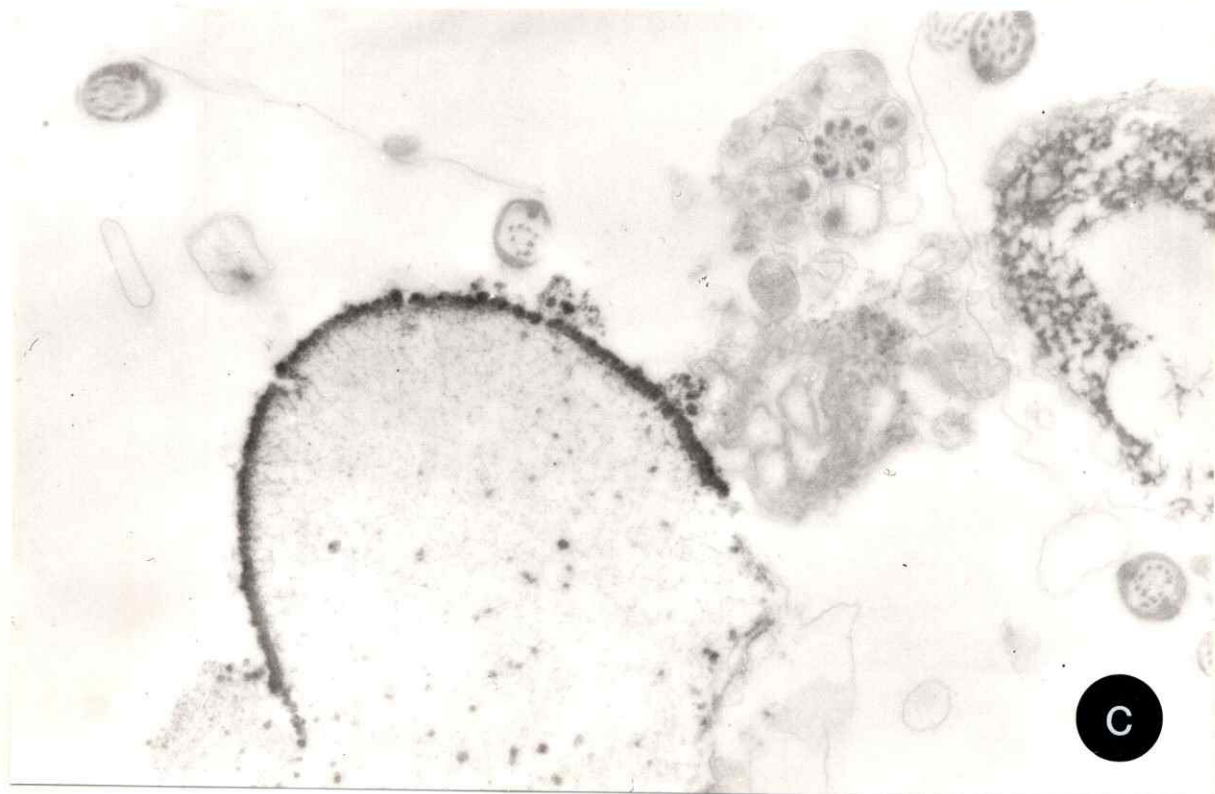
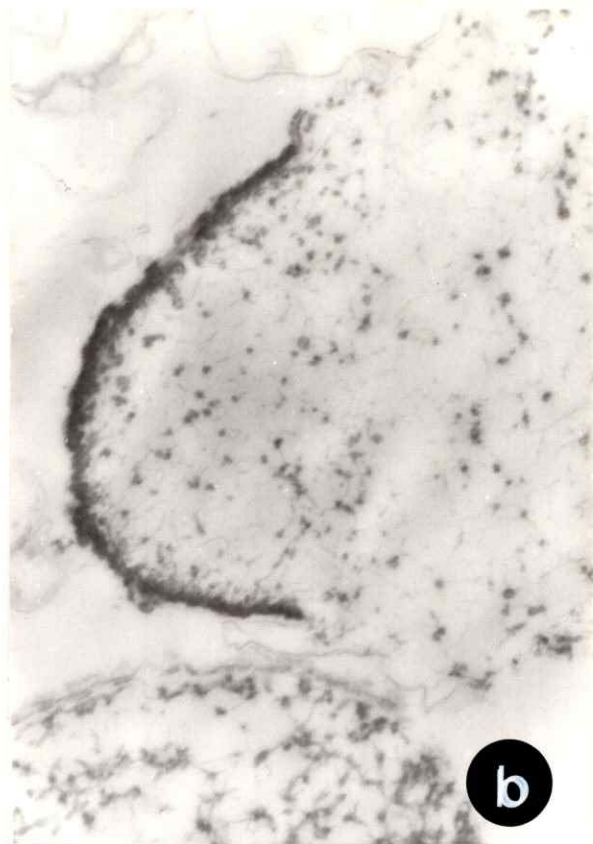


F I G U R A 18

Espermatozoides normoespérmicos tratados con método para SH; tioglicolato de Na por 8' y 10'.

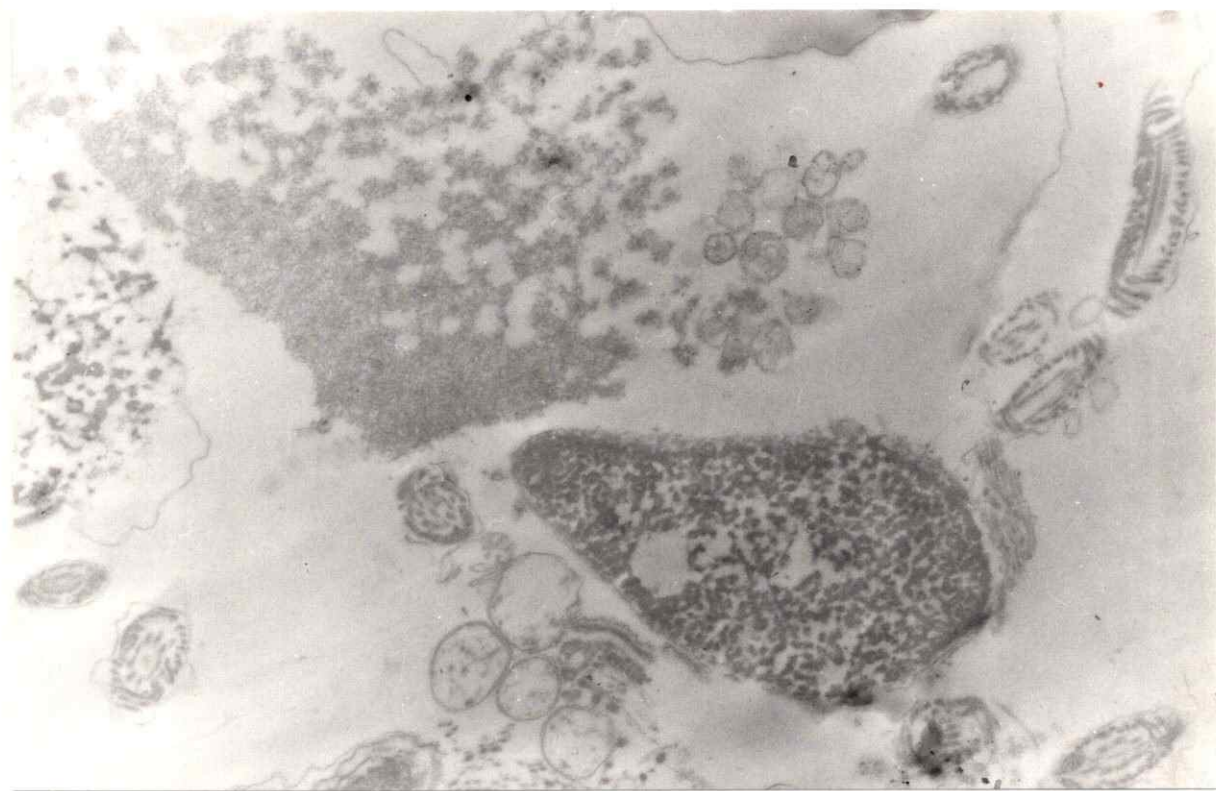
- a.- Espermatozoides decondensados, con una trama muy fina, con gránulos pequeños que muestran positividad a la reacción de SH; nótese la gran densidad electrónica observada en la periferia del núcleo, constituyendo una zona cortical muy definida (Sin tinción). 14.000 X.
- b y c.- Núcleos en etapa de mayor decondensación con ruptura en la parte posterior de la cabeza del espermatozoide, donde se observa liberación de una fina malla de cromatina.

Se conservan gránulos SH positivos y la zona cortical muy positiva para SHA. b.- 20.750 X; c.- 16.500 X.



F I G U R A 19Control Citoquimico.

Espermatozoides tratados con tioglicolato que produce decondensación, y ruptura de núcleos : se omitió el compuesto mercurial (el p-cloro mercurio acido benzoi-co) no detectandose grupo SH, por lo cual la densidad electrónica es muy baja.



8.- BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Anderson, G.K.A. and Kjellstrand, P.T.T. (1975). "A study of DNA depolymerisation during Feulgen acid hydrolysis. *Histochemie* 43 : 123-130.
2. Anderson, G.K.A. (1976). "Histochemical properties of spermatozoa and somatic cells. III Depolymerisation and extraction of DNA during Feulgen acid hydrolysis". *Histochemistry* 48 : 315-324.
3. Arrau, J.; Bustos-Obregón, E.; Hoecker, G y Ramos, A. (1981). "Biología de la reproducción animal". (Cap. IV) Edit. Andres Bello, Santiago, Chile pp. 65-73.
4. Balhorn, R.B.L.; Gledhill, B.L. and Wyrobec, A.J. (1977) "Mouse sperm chromatin proteins quantitative isolation and partial characterization" *Biochemistry* 16 : 4074-4080.
5. Balhorn, R.B.L.; Lake, S. and Gledhill, B.L. (1979). "Electrophoretic analysis of nuclear proteins isolated from sperm of the black abalone Haliotis crackeroidii" *Exp. Cell Res.* 123 : 414-417.
6. Barnett, R. and Seligman, (1952). "Histochemical demonstration of protein-bound sulphhydryl group" *Science* 116 : 323-327.

7. Barros, C. and Franklin, L.E. (1968). "Behavior of the gamete membranes during sperm entry into mammalian egg". *J. Cell Biol.* 37 : C13 - C18.
8. Bartoov, B.; Eltes, F.; Weissenberg, R. and Lunenfeld, B. (1980). "Morphological characterization of abnormal human spermatozoa using transmission electron microscopy" *Arch. Androl.* 5 : 305-322.
9. Bedford, J.M. (1963). "Morphological changes in rabbit spermatozoa during passage through the epididymis" *J. Reprod. Fert.* 5 : 169-177.
10. Bedford, J.M. (1966). "Development of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the rabbit". *Exptl. Zool.* 163 : 319-329.
11. Bedford, J.M. (1970). "Sperm capacitation and fertilization in mammals". *Biol. Reprod. Suppl.* 2 : 128-158.
12. Bedford, J.M. and Nicander, L. (1971). "Ultrastructural changes in the acrosome and sperm membrane during maturation of spermatozoa in the testis and epididymis of the rabbit and monkey". *J. Anat.* 108 : 527-543.

13. Bedford, J.M. & Overstreet, J.W. (1972) "A method for objective evaluation of the fertilizing ability of spermatozoa irrespective of genetic character" J. Reprod. Fert. 31 : 407-414.
14. Bedford, J.M. (1972). "An electron microscopic study of penetration into the rabbit egg after natural mating". Am. J. Anat. 133 : 213-254.
15. Bedford, J.M.; Calvin, H.I. and Cooper, G.W. (1973a). "The maturation of spermatozoa in the human epididymis". J. Reprod. Fert. Suppl. 18 : 199-213.
16. Bedford, J.M.; Bent, J.M. and Calvin, H. (1973b). "Variation in the structural character and stability of the nuclear chromatin in morphologically normal human spermatozoa" J. Reprod. Fert. 33: 19-29.
17. Bedford, J.M. and Calvin, H. (1974). "The occurrence and possible functional significance of S-S crosslink in sperm head with particular reference to eutherian mammals" J. Exp. Zool. 88 : 137-156.
18. Bedford, J.M. (1975) "Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis" In : Handbook of Physiology. Sect 7, Endocrinology. Vol. 5, Male Reproductive System. D.W. Hamilton and R.O. Greep (Eds.) American Physiological Society, Washington D.C. pp. 303-317.

19. Bedford, J.M. and Cooper, G.W. (1978) "Membrane fusion events in the fertilization of vertebrate egg"
In : Cell Surface Reviews. G. Poste and G.G. Nicolson (Eds.) Elsevier North-Holland, Amsterdam pp. 65-125.
20. Beil, R.E. and Graves, Ch.N. (1977). "Nuclear decondensation of mammalian spermatozoa : changes during maturation and in vitro storage". J. Exp. Zool. 202 : 235-240.
21. Bellve, A.R.; Anderson, E. and Hanley-Bowdoin, L. (1975). "Synthesis and amino acid composition of basic protein in mammalian sperm nuclei". Rev. Biol. 47 : 349-365.
22. Bloch, D.P. (1969). "A catalog of sperm Histones". Genetics Supplement 61 (1) : 93-111.
23. Bloch, D.P. (1976). "Histones of sperm" In: Handbook of Genetics. R.C. King (Ed.) Plenum Press. New York 5 : 139-167.
24. Boehm, N. and Sprenger, E. (1968). "Fluorescence cytophotometry : A valuable method for the quantitative determination of nuclear Feulgen-DNA". Histochemie 16 : 100-118.

25. Boehm, N. and Sprenger, E. (1970). "Die Feulgen-Reaktion mit Akriflavin-SO₂. Ein Vergleich zwischen absorptions, und Fluoreszenzcytometric anhand von Hydrolysekrven". Acta Histochem (Jena) 35 : 324-329.
26. Borenfreund, E.; Fitt, E. and Bendich, A. (1961). "Isolation and properties of deoxyribonucleic acid from mammalian sperm" Nature (Lond) 191 : 1375-1377.
27. Bouters, R.; Esnault, C.; Salisbury, G.W. and Ortavant, R.O. (1967a). "Discrepancies in the analysis of deoxyribonucleic acid in rabbit spermatozoa involving, Feulgen staining (Feulgen DNA) and ultraviolet light absorption (U.V.-DNA) measurement". J. Reprod. Fertility 14 : 335-363.
28. Bouters, R.; Esnault, C.; Urtavant, R. and Salisbury, G. W. (1967b). "Comparison of DNA revealed by Feulgen and by ultraviolet light in rabbit spermatozoa after storage in the male efferent ducts". Nature 213 : 181-182.
29. Bustos-Obregón, E.; Courot, M.; Flechón, J.E.; Hochereau de Revier, M.T. and Holstein, A.F. (1975). "Morphological appraisal of gameto genesis : spermatogenic process in mammals with particular reference to man" Andrología 7 : 141-163.

30. Bustos-Obregón, E. y López, M.L. (1976). "Determinación citofotométrica del ADN en normo y teratozoospermia". I Congreso Internacional de Andrología, Barcelona, España.
31. Bustos-Obregón, E.; Leiva, S. y Guadarrama, R. (1978). "Estudio citofotométrico de teratospermia en semen humano". Rev. de Micr. Elect. 5 : 146-147.
32. Bustos-Obregón, E. y Perez-Sampallo, J.A. (1980). "Citoquímica cuantitativa del núcleo de espermatozoide de potro" IX Congr. Intern. Repr. Anim. e Insem. Artif., Madrid, 1980.
33. Bustos-Obregón, E. (1980). "Cytochemical characterization of sperm nuclei during epididimal maturation in mammals" Arch. Biol. Med. Exp. 13 : 335-341.
34. Bustos-Obregón, E.; Leiva, S. y Guadarrama, A. (1981). "Citoquímica cuantitativa y ultraestructura del núcleo de espermatozoides" 33a. Reunión Anual Soc. Brasileira para o Progreso da Ciencia. Salvador (Bahia) Brasil.
35. Calvin, H.I.; Bedford, J.M. (1971). "Formation of disulfide bonds in the nuclei and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis" J. Reprod. Fertil. 13 (Suppl) : 65-75.

36. Calvin, H.I. and Bedford, J.M. (1974). "Stimulation of actinomycin D-binding to euterian sperm chromatin by reduction of disulphide bonds". J. Reprod. Fert. 36 : 225-229.
37. Calvin, H.I. and Bleau, G. (1974). "Zinc-thiol complexes in keratin-like structures of rat spermatozoa". Exptl. Cell Res. 86 : 280-284.
38. Calvin, H.I. (1976). "Comparative analysis of the nuclear basic proteins in rat, human, guinea pig, mouse and rabbit spermatozoa". Biochim. Biophys. Acta 434 : 344-377.
39. Carmerini-Otero, R.D. and Felsenfeld, G. (1977). "Supercoiling energy and nucleosome formation : the role of the arginine-rich histone kernel" Nucleic Acid Res. 4 : 1159-1181.
40. Coelingh, J.P.; Rozijn, T.H. and Monfoort, C.H. (1969). "Isolation and partial characterization of a basic protein from bovine sperm heads". Biochem. Biophys. Acta 188 : 353-356.
41. Coelingh, J.P.; Monfoort, C.H.; Rozijn, T.H.; Gevers Leuven, J.A.; Schiphof, R.; Steynparve, E.P.; Braunitzer, G.;

- Schrauk, B. and Ruhfus, A. (1972). "The complete amino acid sequence of the basic nuclear protein of bull spermatozoa". *Biochem. Biophys. Acta* 285 : 1-14.
42. Cooper, G.W. and Bedford, J.M. (1971). "Acquisition of surface charge by the plasma membrane of mammalian spermatozoa during epididymal maturation" *Anat. Rec.* 169 : 300.
43. Cooper, G.W. and Bedford, J.M. (1976) "Asymmetry of spermatid and sperm surface charge patterns over the flagellum in the musk shrew Sunauus Murinus" *J. Cell Biol.* 69 : 415-428.
44. Dalcq, A.M. (1973). "Morphologie normale du testicule et spermatogenese chez les mamiferes". *Royale de Medicine de Belgique. Vol. 46. Palais des Academies Bruxelles pp.* : 592-593.
45. Davis, J.R. and Langford, G.A. (1970). "Testicular proteins". In : *The testis*. Johnson, A.D., Gomes, W.R. and Vandermark, B.L. (Eds.) Vol. 2 Academic Press. New York, pp 259-306,
46. David, G.; Bisson, J.P.; Juannet, P.; Czyglik, F.; Gernigon; Alexandre, C.; Gilbert-Dreyfus, A. (1972). "Les Teratospermicos " In : *La sterilité du male. Acquisitions recents*, Thibault C. (Ed.) Paris.

47. De Cosse, J.J. and Aiello, N. (1966). "Feulgen hydrolysis : Effect of acid and temperature". J. Histochem Cytochem. 14 : 601-604.
48. Doohar, G.B. and Bennet, D. (1973). "Fine structural observation on development of the sperm head in the mouse" Am. J. Anat. 136 : 339-362.
49. Dreskin, S.C. and Mayal, B.H. (1974) "Deoxyribonucleic acid cytophotometry of stained human leukocytes. III Termal denaturation of chromatin." J. Histochem. Cytochem. 22 : 120-126.
50. Duijndam, W.A. and van Duijn, P. (1975). "The influence of chromatin compactness on the stoichiometry of the Feulgen-Schiff procedure studied in model films" J. Histochem. Cytochem. 23 : 891-900.
51. Eliasson, R. (1973). In : "Human reproduction. Conception and contraception" Hafez, E.S.E. and Evans, T.N. (Eds.) Harper and Row, New York. pp. 39.
52. Esnault, C. (1973). "Reactivation of the Feulgen reaction of ram spermatozoa by dithiothreitol". J. Reprod. Fert. 33 : 153-157.
53. Evenson, D.P.; Witkin, S.S.; Harven, E. de and Bendich, A. (1978). "Ultrastructure of partially decondensed human spermatozoal chromatin". J. Ultrastr. Res. 63 : 178-187.

54. Evenson, D.P.; Darzynkiewicz, Z. and Melamed, M.R. (1980)
"Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility". *Science* 210 : 1131-1133.
55. Fawcett, D.W. (1958). "Structure of the mammalian spermatozoon" *Int. Rev. Cytol.* 7 : 195-234.
56. Fawcett, D.W. and Hollenberg, R.Y. (1963). "Changes in the acrosome of guinea pig spermatozoa during passage through the epididymis" *Z. Zellforsch.* 60 : 276-292.
57. Fawcett, D.W. and Phillips, D.M. (1969). "The fine structure and development on the neck region of the mammalian spermatozoon" *Anat. Rec.* 165 : 153-184.
58. Fawcett, D.W. (1970). "A comparative view of sperm ultrastructure". *Biol. Reprod. Suppl.* 2 : 90-127.
59. Fawcett, D.W. and Phillips, D.M. (1970). "Observation on the release of spermatozoa and on changes in the head during passage through the epididymis". *J. Reprod. Fert. Suppl.* b, 405.
60. Fawcett, D.W.; Anderson, W.A. and Phillips, D.M. (1971). "Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head" *Devel. Biol.* 26 : 220-251.

61. Felsenfeld, G. (1978). "Chromatin" Nature (Lond) 271 : 115-122.
62. Fléchon, J.E. (1975) "Ultrastructural and cytochemical modifications of rabbit spermatozoa during epididymal transport. In : The Biology of spermatozoa. Transport Survival and Fertilizing Ability. (E. S.E. Hafez and C.G. Thibault (Eds.) Karger Basel pp. 36-45.
63. Fournier-Delpech, S.; Danzo, B.J. and Orgebin-Crist, M.C. (1977) "Extraction of concavalin A affinity material from rat testicular and epididymal spermatozoa" Am. Biol. Anim. Biochem. Biophys. 17 : 207-213.
64. Fujita, T.; Miyoshi, M. and Tokunaga, J. (1970). "Scanning and transmission electron Microscopy of human ejaculated spermatozoa with special reference to their abnormal forms". Z. Zellforsch 105 : 483-497.
65. Fujita, S. (1973). " DNA cytofluorometry on large and small nuclei stained with pararosaniline Feulgen" Histochemie 36 : 193-199.

66. Fujita, S. and Frikuda, M. (1974). "Irradiation of specimen by excitation light before and after staining with pararosaniline Feulgen : A new method to reduce non-specific Fluorescence in Cytofluorometry". *Histochemistry* 40 : 59-57.
67. Fukuda, M. Isemura, T.; Maruo, N.; Nakanishi, K. and Fujita, S. (1975). "Citofluorometric measurement of content of nuclear DNA and intracellular porphyrin converted from heme or hemoglobin on a single erythroid cell." *Acta Histochem. Cytochem.* 8 : 331-341.
68. Fukuda, M.; Nakanishi, K.; Sawamura, T. and Fujita, S. (1977). "Citofluorometric analysis of cell proliferation and differentiation of human erithroblast". *Histochemistry* 52 : 317-327.
69. Gall, W.E. and Ohsumi, Y. (1976). "Decondensation of sperm nuclei in vitro". *Exp. Cell Res.* 102 : 349-358.
70. Ganter, P. and Jolles, G. (1969). "Histochemie normale et pathologique" Tome II Gautier-Villars, Paris pp. 285-286.
71. Garcia, A.M. (1970). "Stoichiometry of the dye binding versus degree of chromatin coiling. Introduction to Quantitative Cytochemistry. Wied, G.L. and Bahr, G.F. (Eds. Vol.2 Academic Pres, New York. pp. 153.

72. Gledhill, B.L.; Gledhill, M.D.; Rigler, J.R. and Rigertz, N.R. (1966). "Changes in deoxyribonucleoprotein during spermiogenesis in the bull". *Exp. Cell Res.* 41 : 652-665.
73. Gledhill, B.L. (1970). "Changes in nuclear stainability associates with spermateliosis, spermatozoal maturation, and male infertility" In : *Introduction to Quantitative Cytochemistry II*. Wied, G.L. and Bahr, G.F. (Eds.) Acad. Press, N. York pp. 125-151.
74. Gordon, M.; Dandekar, P.V. and Bartoszewicz, W. (1974) "Ultrastructural localization of surface receptors for concanavalin A on rabbit spermatozoa". *J. Reprod. Fertil.* 36 : 211-214.
75. Grimes, S.R.; Jr. Meistrich, M.L.; Platz, R.D. and Hnilica, L.S. (1977). "Nuclear protein transition in rat testis spermatids" *Exp. Cell Res.* 110 : 31-39.
76. Gusse, M. and Chevallier, Ph. (1980). "Electron microscope evidence for the presence of globular structure in different sperm chromatins". *J. Cell Biol.* 87 : 280-284.
77. Hamilton, D.W. (1975). "Structure and function of the epithelium lining the ductile efferentes, ductus epididymidis and ductus deferents in the rat". In : *Handbook of Physiology. Sect. 7 Endocrinology.*

Vol. 5. Male Reproductive System. Hamilton, D.W. and Greep (Eds.) pp. 259-301.

78. Hanada, A.; Hirock, K. and Tomijuka, T. (1965). "DNA content in bull spermatozoa during storage in yolk citrate diluent at 4°C". Jap. J. An. Reprod. 10 : 103-106.
79. Henricks, D.M. and Mayer, D.T. (1967). "Isolation and characterization of a basic keratin-like protein from mammalian spermatozoa". Exp. Cell Research 40 : 402-412.
80. Hosltein, A.F. (1976). "Ultrastructural observations on the differentiation of spermatids in man". Andrología 8(2) : 157-165.
81. Holstein, A.F. (1978). "Cytomorphologie der keimzellen in den tubuli seminiferi des Menschen". In : Physiologie und Pathophysiologie der Hodenfunktion, Senge, T.G.; Neumann, S.; Schenk, B. (Eds.) Stuttgart : George Thieme Publishers, pp. 1-17.
82. Holt, W.V. (1980). "Surface-bound sialic acid on ram and bull spermatozoa : Deposition during epididymal transit and stability during washing" Biol. Reprod. 23 : 847-857.

83. Horan, A.H. and Bedford, J.M. (1972). "Development of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of Syrian hamster". *J. Reprod. Fert.* 30 : 417-423.
84. Joel, C.A. and Botella-Llusia, J. (1971). "In: Fertility disturbances in men and women". Joel Karger (Ed) Basel pp. 56-86.
85. Kistler, W.S.; Geroch, M.E.; Williams, . and Ashman, H. G. (1973). "Specific basic proteins from mammalian testes". *J. Biol. Chem.* 248(13) : 4532-4573.
86. Kjellstrand, P.T.T. and Anderson, G.K.A. (1975a) "Histochemical properties of spermatozoa and somatic cell. I Relations between the Feulgen hydrolysis pattern and the composition of the nucleo-proteins" *Histochem. J.* 7 : 563-573.
87. Kjellstrand, P.T.T. and Anderson, G.K.A. (1975b) "Histochemical properties of spermatozoa and somatic cell Differences in the Feulgen hydrolysis pattern induced through alterations of the nucleo-proteins" *Histochem. J.* 7 : 575-583.
88. Kohane, A.C.; Garberi, J.C.; Cameo, M.S. and Blaquier, J.A. (1979). "Quantitative determination of specific proteins in the rat epididymis" *J. Steroid. Biochem.* 11 : 671-674.

89. Kolk, A.H. and Samuel, T. (1975). "Isolation, chemical and immunological characterization of two strongly basic nuclear proteins from human spermatozoa". *Biochim. Biophys. Acta* 393 : 307-319.
90. Kornberg, R.D. (1977). "Structure of chromatin". *Annu. Rev. Biochem.* 46 : 931-954.
91. Kornberg, R.D. and Klug, A. (1981). "The nucleosome". *Scientific American* 244(2) : 48-69.
92. Kretser, de, D.M. (1969). "Ultrastructural features of human spermiogenesis". *Z. Zellforsch* 98 : 477-505.
93. Kvist, U. (1980). "Sperm nuclear chromatin decondensation ability" *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 486 : 1-24.
94. Lam, D.M.K. and Bruce, W.R. (1971). "The biosynthesis of protamine during spermatogenesis of the mouse. Extraction, partial characterization and site of synthesis". *J. Cell Physiol.* 78 : 13-24.
95. Leeman, V. and Ruch, F. (1972). "Cytofluorometric determination of basic and total proteins with sulfaflavine". *J. Histochem. and Cytochem.* 20 : 659-671.
96. Loir, M. and Lanneau, M. (1978). "Transformation of ram spermatid chromatin". *Exp. Cell Research* 115: 231-243.

97. Lung, B. (1972). "Ultrastructures and chromatin disaggregation of human sperm head with thioglycolate treatment" *J. Cell Biol.* 52 : 179-186.
98. MacLeod, J. (1970). "The significance of deviations in human sperm morphology in the human testis". *Adv. Exp. Med. Biol.* 10 : 481-494.
99. Mahi, C.A. and Yanagimachi, R. (1975). "Induction of nuclear decondensation of mammalian spermatozoa in vitro". *J. Reprod. Fert.* 44 : 293-296.
100. Marushige, Y. and Marushige, K. (1974). "Properties of chromatin isolated from bull spermatozoa" *Biochim. Biophys. Acta* 340 : 498-508.
101. Marushige, Y. and Marushige, K. (1975) "Transformation of sperm histone during formation and maturation of rat spermatozoa". *J. Biol. Chem.* 250 : 39-45.
102. Mayer, J.F. and Zirkin, B.R. (1979). "Spermatogenesis in the mouse. I Autoradiographic studies of nuclear incorporation and loss of ^3H -Amino acids". *J. Cell Biol.* 81 : 403-410.
103. Meistrich, M.L.; Reid, B.O. and Barcelona, W.J. (1976). "Changes in sperm nuclei during spermiogenesis and epididymal maturation". *Exp. Cell Res.* 99 : 72-78.

104. Millette, C.F.; Spear, O.G.; Gall, W.E. and Edelman, G.M. (1973). "Chemical dissection of mammalian spermatozoa". *J. Cell Biol.* 58 : 662-675.
105. Monesi, V. (1965). "Synthetic activities during spermatogenesis in the mouse RNA and protein". *Exp. Cell Res.* 39 : 197-224.
106. Nelson, L. (1960). "Cytochemical studies with the electron microscope. III Sulphydryl groups of rat spermatozoa". *J. Ultrastruc. Res.* 4 : 182-190.
107. Nicolson, G.L.; Usui, N.; Yanagimachi, R.; Yanagimachi, H. and Smith, J.R. (1977). "Lectin binding sites on the plasma membranes of rabbit spermatozoa. Changes in surface receptors during epididymal maturation and after ejaculation". *J. Cell Biol.* 74 : 950-962.
108. Nicolson, G.L.; Brodginiski, A.B.; Beattie, G. and Yanagimachi, R. (1979). "Cell surface changes in the proteins of rabbit spermatozoa during epididymal passage". *Gamete Res.* 2 : 153-162.

109. Noeske, K. (1971). "Discrepancies between cytophotometric Feulgen values and deoxyribonucleic acid content". *Histochem and Cytochem.* 19 : 169-174.
110. Olson, G.E. and Hamilton, D.W. (1976). "Morphological changes in the mid piece of woolly opossum spermatozoa during epididymal transit". *Anat. Rec.* 186 : 387-404.
111. Olson, G.F. and Hamilton, D.W. (1978). "Characterization of the surface glycoproteins of rat spermatozoa" *Biol. Reprod.* 19 : 26-35.
112. Olson, G.E. and Danzo, B.J. (1981). "Surface changes in rat spermatozoa during epididymal transit". *Biol. Reprod.* 24 : 431-443.
113. Orgebin-Crist, M.C. (1967). "Maturation of spermatozoa in the rabbit epididymis. Fertilizing ability and embryonic mortality in does inseminated with epididymal spermatozoa " *Ann. Biol. Animale Biochim. Biophys.* 7 : 373-389.
114. Orgebin-Crist, M.C. (1968). "Maturation of spermatozoa in the rabbit epididymis : delayed fertilization in does in inseminated with epididymal spermatozoa". *J. Reprod. Fert.* 16 : 29-33.

115. Orgebin-Crist, M.C.; Danzo, B.J. and Davies, J. (1975).
"Endocrine control of the development and maintenance of sperm fertilizing ability in the epididymis"
In: Handbook of Physiology. Sect. 7. Endocrinology
Vol. 5 Male Reproductive System D.W. Hamilton and
R.O. Greep (Eds.) American Physiological Society,
Washington, D.C. pp 319-33.
116. Otto, F.J.; Haclcer, U.; Zante, J.; Schumann, W. and
Meistrich, M.L. (1979). "Flow Cytometry of human
spermatozoa" *Histochemistry* 62 : 249-254.
117. Pedersen, H. (1969). "Ultrastructure of the ejaculated
human sperm". *Z. Zellforsch.* 94 : 542-554.
118. Pedersen, H. (1970). "Ultrastructure of the ejaculated
human sperm". In : *Comparative Spermatology*, Bacce-
tti B. (ed.) New York, Academic Press pp. 133-142.
119. Pedersen, H. (1974). "The human spermatozoa" *Danish. Med.*
Bull 21, Suppl. I : 1-36.
120. Pedersen, H. and Fawcett, D.W. (1976). "Functional ana-
tomy of the human spermatozoon". In : *Human Semen
and Fertility Regulation in Men*, Hafez ESE (Ed.)
St. Louis : Mosby Co., pp 65-75.
121. Pérez-Sampallo, J.A. (1980) "Nuevas técnicas en el estu-
dio del semen de potro : Citoquímica cuantitativa
de proteínas y microscopía electrónica de barrido"

Tesis de Magister en Ciencias Veterinarias, Universidad de Chile.

122. Piko, L. (1969). "Gamete structure and sperm entry in mammals" In: Fertilization. Vol. 2 Chap. 8. Metz, C. B. and Monray, A. (Eds) Ac. Press, New York pp. 325-404.
123. Prenna, G., Leiva, S. and Mazzini, G. (1972). "Quantitative DNA-fluorometry by the conventional Feulgen reaction" In : Histochemistry and Cytochemistry, Takeuchi, T.; Ogawa, K. and Fujita, S. (Eds.) Wakanishi Publ. Co. Kyoto pp. 201-202.
124. Prenna, G.; Leiva, S. and Mazzini, G. (1974). "Quantitation of DNA by cytofluorometry of the conventional Feulgen reaction" Histochem. J. 6 : 467-489.
125. Reynold, E.S. (1963). "The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in Electron Microscopy. J. Cell Biol. 17 : 208.
126. Ringertz, N.R.; Gledhill, B.L. and Darzynkiewicz, Z. (1970). "Changes in deoxiribonucleoprotein during spermiogenesis in the bull". Exp. Cell Res. 62 : 204
127. Ruch, F. (1966). "Determination of DNA content by microfluorometry. In : Introduction to quantitative Cytochemistry" (Wied, G.L. (Ed.) Ac. Press, New York pp. 281-294.

134. Saowaros, W. and Panyim, S. (1979). "The formation of disulfide bonds in human protamines during sperm maturation" *Experientia* 35(2) : 191-192.
135. Soupart, P. (1976). "Biology of human fertilization" In: Sperm action. Prog. Reprod. Biol. Hafez E.S.E. and Thibault, C.G. (Eds.) Vol. 1 Karger, Basel pp. 241-251.
136. Sullivan, P.A. and Garcia, A.M. (1970). "Correlation between nuclear size and Feulgen DNA values in lymphocytes". *Acta Cytol.* 14 : 104
137. Todorovic, R.A.; Graves, C.N. and Salisbury, G.W. (1969). "Aging phenomena in spermatozoa. IV. Immunologic characterization of the deoxyribonucleic-acid protein extracted from fresh and aged, bovine spermatozoa". *J. Dairy. Sci.* 52 : 1415-1421.
138. Vendrely, R.; Knobloch, A. and Vendrely (1957). "An attempt of using biochemical methods for Cytochemical problems". *Exp. Cell Res. Suppl.* 4 : 279-283.
139. Zamboni, L.; Zemjanis, R. and Stefanini, M. (1971). "The fine structure of monkey and human spermatozoa" *Anal. Rec.* 169 : 129-153.

140. Zamezuk, M. (1977). "Electron microscope studies of human spermatozoa". *Z. Mikrosk. Anat. Forsch* 9 : (1S) 31-40.
141. Zante, J.; Schumann, J.; Gohde, W. and Hacker, V. (1977) "DNA-fluorometry of mammalian sperm" *Histochemistry* 54 : 1-7.
142. Zegers, F.; Guadarrama, A. y Bustos-Obregón, E. (1980). "Método de selección de espermios con motilidad progresiva. Estudio morfológico". *Arch. Biol. Med. Exp.* 13(N°3): 369.
143. Zurkin, B.R.; Chang, T.S.K. and Heaps, J. (1980). "Involvement of an acrosinlike proteinase in the sulphhydryl-induced degradation of rabbit sperm nuclear protamine". *J. Cell Biol.* 85 : 116-121.