

INTERACCION GAMETO-EPITELIO EPIDIDIMARIO DURANTE LA MADURACION POST-TESTICULAR DEL ESPERMATOZOIDE DE MACHO CABRIO

HUGO GONZÁLES - FIGUEROA (*)

(*) Laboratorio de Biología del Desarrollo, Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma, Apdo 138 Lima Perú.

RESUMEN

En el presente trabajo se relaciona la interacción: estereocilios de las células principales del epitelio - espermatozoide, con el grado de funcionalidad integral de la membrana plasmática (RHE) y la evaluación de madurez de la cromatina nuclear (CROMAT) durante la maduración posttesticular del espermatozoide de macho cabrío.

Los estereocilios de las células principales, en el caput epididimario, orientan su extremo distal hacia el lumen donde se encuentran los espermatozoides. En este segmento epididimario el aumento del grado de madurez de la membrana plasmática (29.6%) y la condensación de la cromatina nuclear (26.7%) son relativamente bajos. En el límite entre caput y corpus los extremos de los estereocilios, de forma globular, contactan con la superficie espermática, proceso que coincide con el incremento del grado de madurez de la membrana plasmática (48.9%) y de la condensación de la cromatina nuclear (30.0%).

La inmadurez morfológica del espermatozoide expresada por la presencia de la gota citoplasmática y de vesículas en su extremo posterior del flagelo en caput y corpus, los valores encontrados para la RHE (80.7%) y CROMAT (95.69%), en la cauda del epidídimo, así como la ausencia de vesículas globulares en los estereocilios de este segmento, apoyarían la idea de que la maduración posttesticular del espermatozoide es consecuencia del intercambio de secreciones del epidídimo, las que se dan por la interacción entre la superficie de las células epiteliales principales y de la célula espermática.

SUMMARY

The relationship between sperm epithelial cells stereocilia interaction with asses the functional integrity of the sperm caprine membrane (RHE) and evaluation of nuclear condensation chromatin (CROMAT) have been studied during posttesticular sperm maturation.

Principal cells stereocilia of caput epididymis have form of vesicles in top distal, in the lumen there are many spermatozoa which show low percentage of sperm membrane maturity (29.6%) and nuclear chromatin condensation (26.7%).

Between caput and corpus stereocilia top distal contact with sperm membrane surface. In this zone there are 48.9% of sperm membrane maturity and 30.0% with chromatin condensed.

The sperm morphological immaturity expressed for cytoplasmatic droplet and vesicles in posterior tail, in caput and corpus and percentages (80.7%) for RHE and CROMAT (95.69%) in the epididymal cauda as soon as the absence of vesicles in the stereocilia of cauda principal cells, suggests that sperm maturation posttesticular is consequence of interchanges of epididymal fluids secretions of principal cells with sperm membrane surface.

INTRODUCCION

El espermatozoide de mamífero al dejar la matriz testicular, necesita intercambiar sustancias con las células epiteliales para adquirir las condiciones que lo conducen a ser capaz de fertilizar los ovocitos.

El epidídimo es un órgano crucial, puesto que cuando el espermatozoide atraviesa este conducto logra una serie de condiciones que modulan su condición fértil. Durante el tránsito epididimario, el gameto obtiene motilidad progresiva, modifica su morfología condensa la cromatina nuclear y experimenta notables variaciones en el contenido de las proteínas de la membrana

plasmática (Burgos, 1989). El proceso de maduración espermática (Orgebin - Crist, 1969), requiere de interacciones secuenciales con el fluido de las diferentes regiones del epidídimo.

El epitelio epididimario de los mamíferos, está compuesto, generalmente, de células principales, basales de linfocitos, macrófagos y monocitos dispersos entre las células mencionadas (Robaire & Hermo, 1988). Las células principales tienen como función principal crear y mantener las características regionales del fluido epididimal (Aman, 1987). Estas diferencias se expresan por la manera como disponen las células epiteliales en los diferentes

segmentos del epidídimo. En carnero, la cantidad de células principales que se encuentran en el "caput" es mayor con respecto a las que se visualizan en la cauda, mientras que la proporción de las células basales es similar en todos los segmentos del epidídimo (Marengo & Amann, 1990).

El desplazamiento de la gota citoplasmática que se observa a partir del corpus y la formación de asociaciones de los espermatozoides tipo roseta (rata) o "roculaux" (cobayo) que se incrementan hacia la cauda serían indicadores importantes de la maduración espermática (Burgos, 1992).

Es evidente, que la interacción epidídimo - gameto cumple un papel importante en la maduración post-testicular del espermatozoide. En el presente trabajo se relaciona la interacción: estereocilios de las células principales y el espermatozoide, con el análisis de la integridad funcional de la membrana plasmática del espermatozoide y la condensación de la cromatina nuclear.

MATERIALES Y METODOS

Obtención de los epidídimos.

Los epidídimos de macho cabrío se obtuvieron de las colectas hechas en el centro de beneficio de Yerbateros (Ate - Lima). Los ejemplares colectados fueron transportados al laboratorio en la bolsa escrotal en un periodo de 1 a 2 hrs. después de sacrificado el animal. Fueron examinados 10 epidídimos de macho cabrío con un peso promedio de 12.3 gramos; se asumió que los epidídimos con un peso inferior a 10.5 gramos pertenecieron a animales que eyacularon antes de ser sacrificados, por lo que se descartaron.

Preparación del epidídimo para la microscopía de barrido.

Se disectaron caput, corpus y cauda del epidídimo y cada uno de los segmentos fueron fijados por separado en glutaraldehído 4% tamponado en buffer fosfato y posfijados en tetróxido de osmio. Posteriormente las muestras fueron deshidratadas en una serie creciente de alcoholes y procesados convencionalmente para microscopía electrónica de barrido, mediante secado a punto crítico y sombreado con oro; de esta manera se observaron al microscopio electrónico de barrido marca Jeol.

Evaluación de la integridad funcional de la membrana plasmática y evaluación de la madurez nuclear.

Se trozaron pedazos de caput, corpus y cauda y se prepararon de acuerdo a la técnica de Jeyendra et al., (1984). Para analizar la respuesta hiposmótica de la

membrana plasmática, se verifica el hinchamiento de la cola del espermatozoide a través de un microscopio óptico a 400 x de magnificación. Se cuentan 400 células en 4 campos diferentes, considerándose un resultado normal cuando se visualiza el hinchamiento en el 60% de las células espermáticas.

Para evaluar la condensación de la cromatina nuclear se utilizó el método de Terquen & Daudone (1983). Se contaron 400 núcleos por lámina a través de un microscopio óptico a 1000 x de magnificación diferenciándose núcleos condensados, parcialmente condensados y descondensados.

RESULTADOS

Análisis de la ultraestructura de las diferentes regiones del epidídimo.

Las interacciones gameto - epitelio, pueden estudiarse en los diferentes segmentos del epidídimo.

En el borde apical de las células principales del caput epididimario se observan estereocilios de diferentes longitudes (Fig. 1) cuyos extremos distales se proyectan hacia el lumen (Fig. 2), así como la presencia de numerosos espermatozoides en la luz del túbulo.

Los estereocilios presentan en su extremo distal forma de vesícula y se asocian estrechamente a los espermatozoides en el límite de caput y corpus epididimario (Fig. 3 y 4).

Cuando los espermatozoides se encuentran en la cauda epididimaria la interacción de los espermatozoides con los estereocilios es evidente (Fig. 5) y el contacto es a través del extremo distal de estos, careciendo la mayoría de ellos de las vesículas observadas en caput y corpus del epidídimo. Así mismo (Fig. 6), gran parte de los espermatozoides están unidos cabeza-cabeza a través de estructuras tipo fibrillas que emergen de la superficie de cada uno de ellos, semejando un "roculaux".

En el lumen del corpus epididimario se puede observar espermatozoides inmaduros que presentan gota citoplasmática (Fig. 7), en cambio, la ausencia de la gota citoplasmática en la cauda se expresa el estado de madurez morfológica (Fig. 8).

Análisis de la integridad funcional de la membrana plasmática y la condensación de la cromatina nuclear del espermatozoide.

El análisis de la integridad funcional de la membrana plasmática indica el grado de madurez del espermatozoide en los diferentes segmentos del

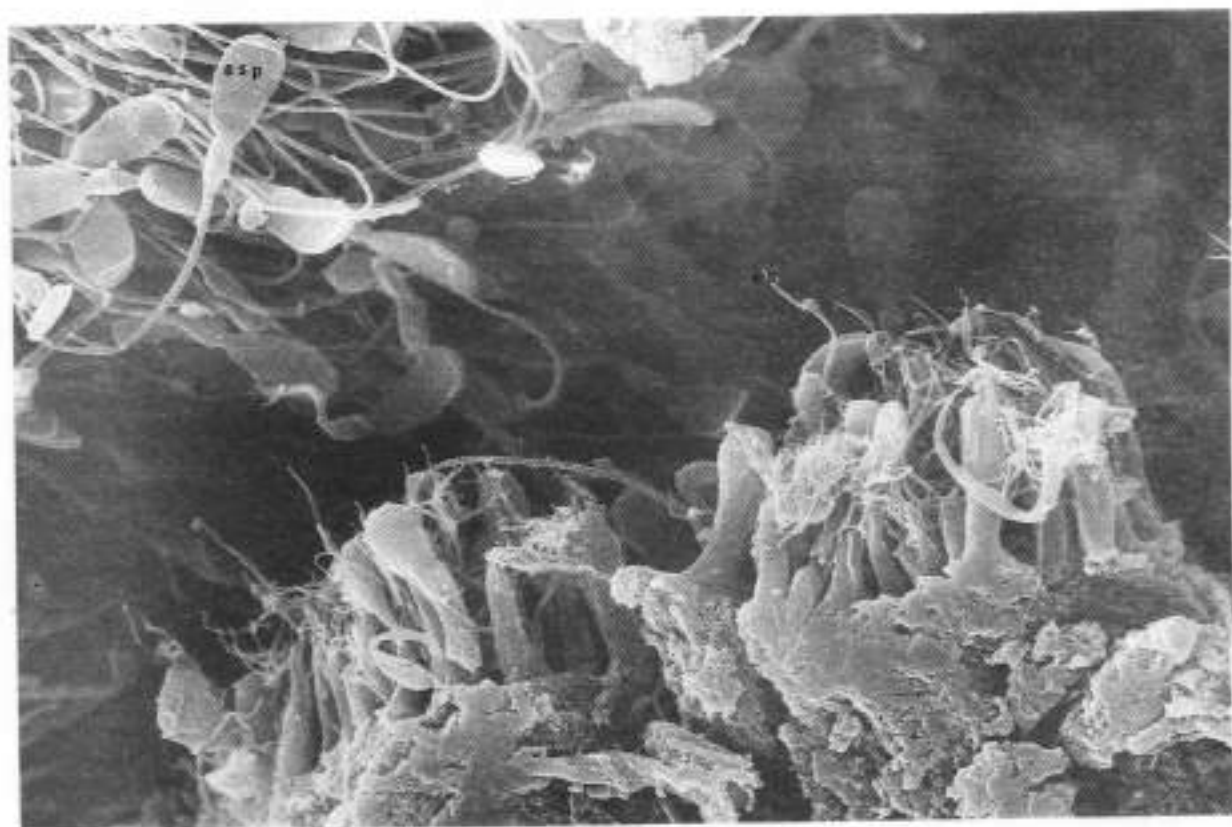


Figura 1. Caput del epidídimo de macho cabrío. Se observa los estereocilios (ec) de diferentes longitudes que emergen de la superficie del borde apical de las células principales. Espermatozoides (esp) en el lumen. (1500 x).

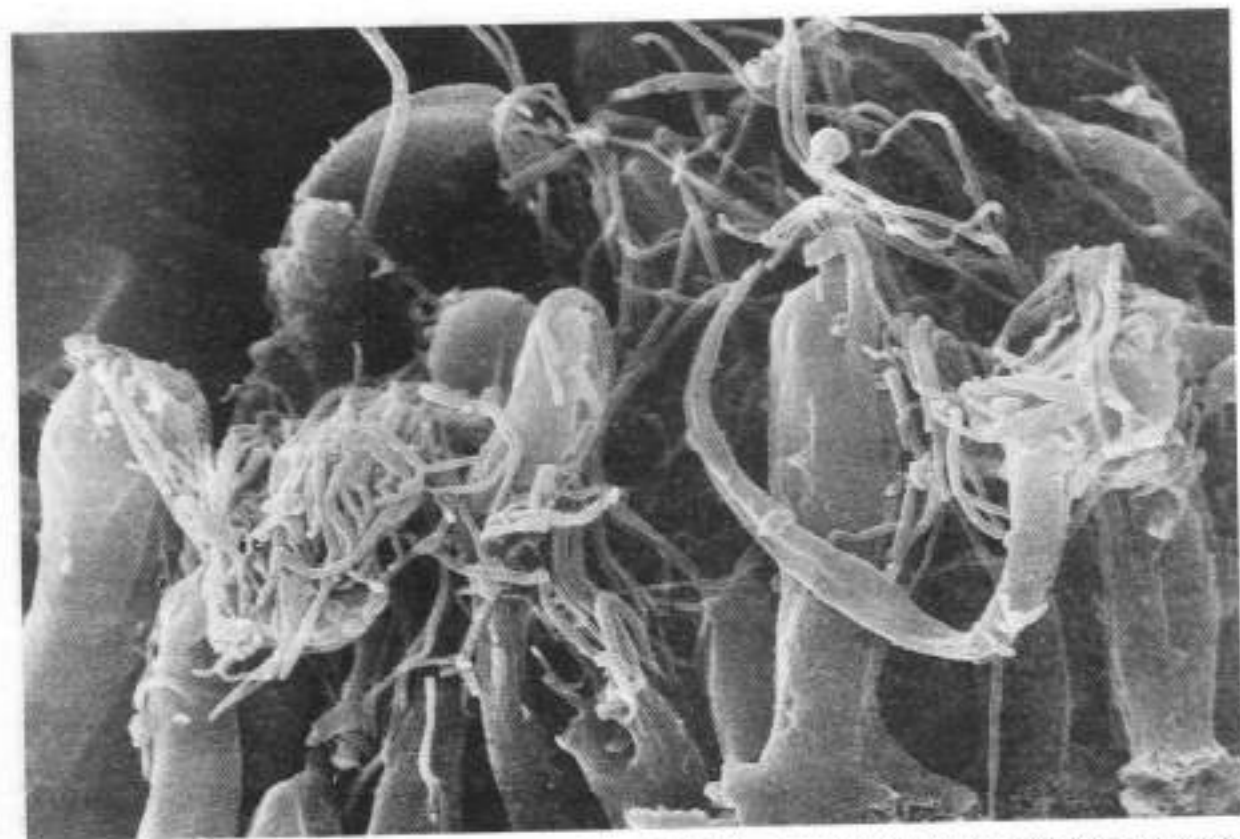


Figura 2. Caput del epididimario. Se observan estereocilios (ec) de diferentes longitudes en el borde apical de las células principales (4500 x).

Figura 4. Corpus del epididimo. Nótese la interacción de los espermatozoides con la superficie de las células principales. Los esterocilios (ec) enmarcan a las células espermáticas (1000 x).

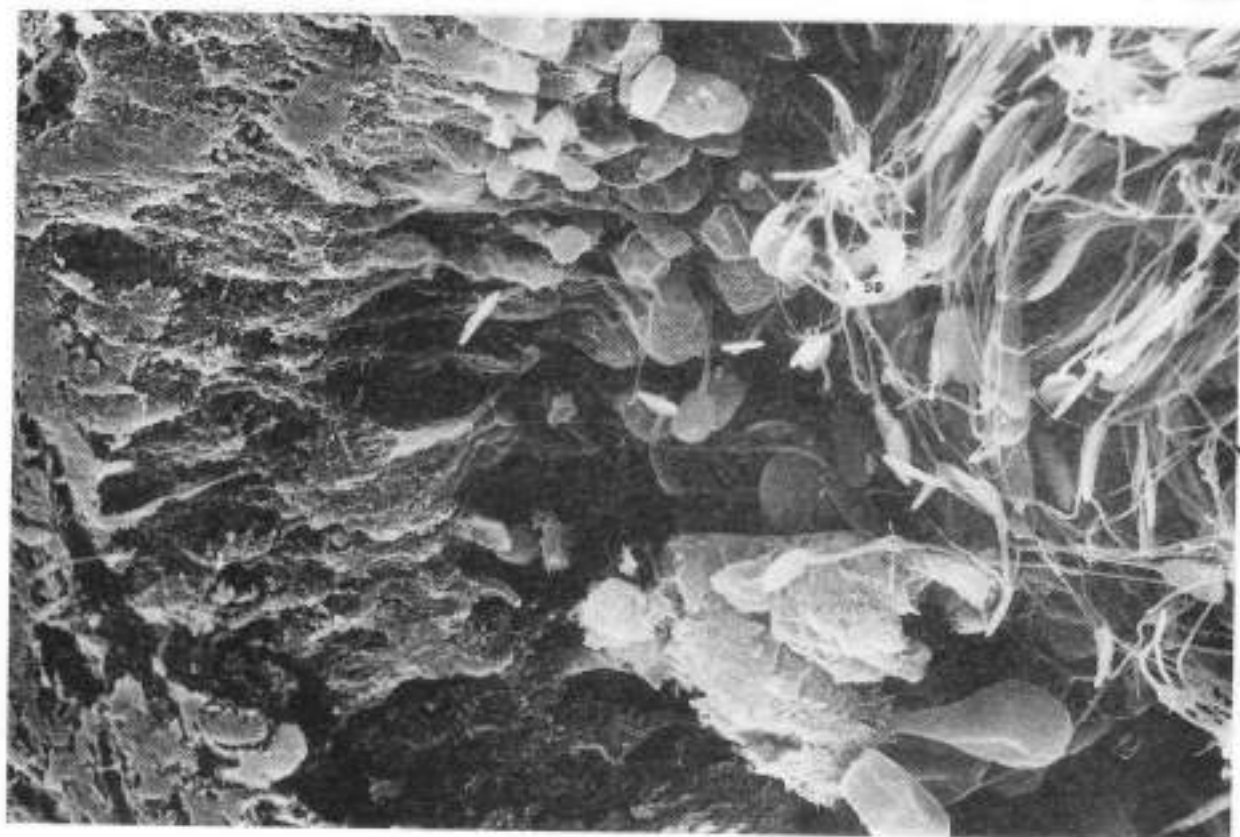


Figura 3. Esterocilios de las células principales en el lúmen de caput y corpus del epididimo de macho cabrío. Nótese los extremos distales de los esterocilios con vesículas globulares (vg). (7000 x).



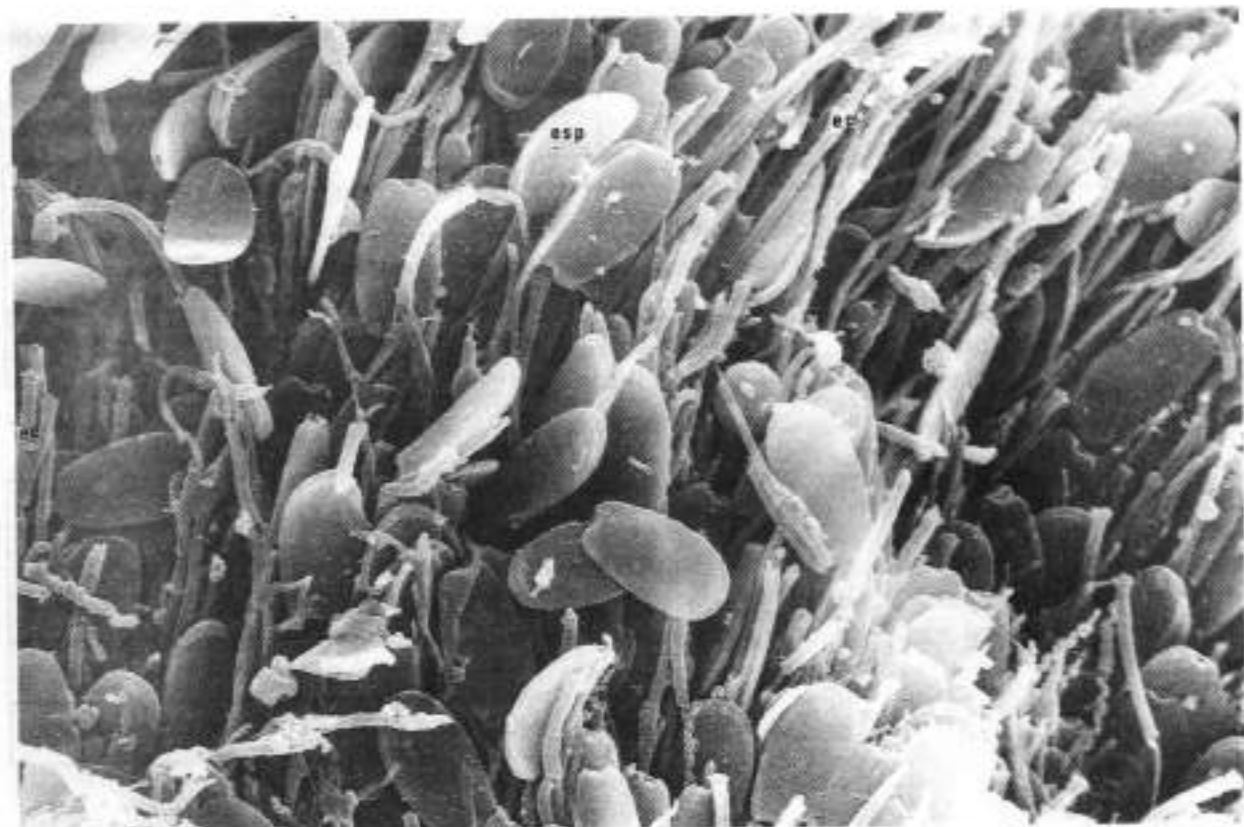


Figura 5. Cauda del epididimo. Se observa la forma como se disponen los espermatozoides (esp) en el lumen y la interacción con los estereocilios (ec), en el extremo de la mayoría de ellos se nota la ausencia de las vesículas globulares (vg). (2900 x).

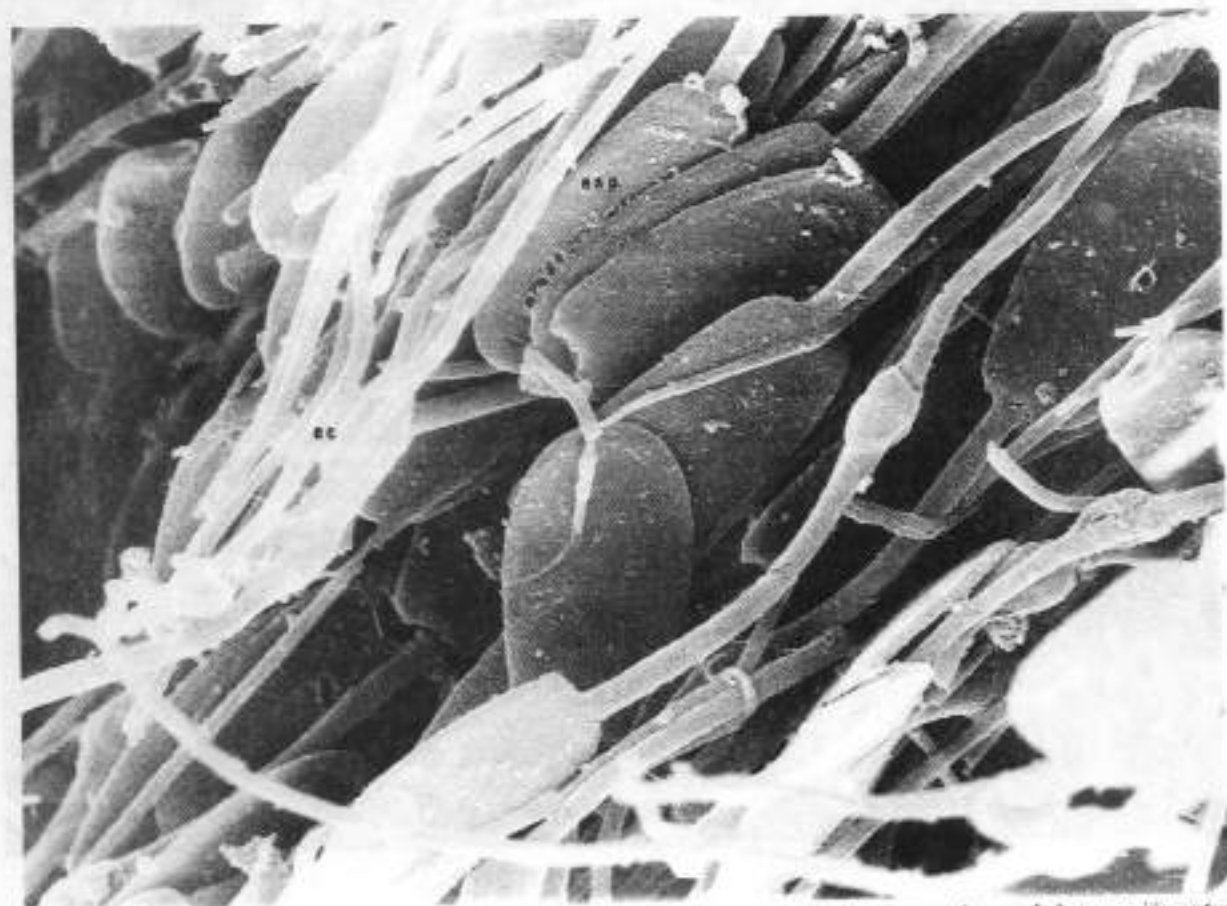


Figura 5. Cauda del epididimo. Los estereocilios, muchos de ellos sin vesícula globular (vg), se observa la interacción entre la superficie de las cabezas de espermatozoides. (4500x).

epidídimo del macho cabrío.

Los valores de la reacción hiposmótica de la membrana plasmática del espermatozoide (RHE +) se incrementan desde el caput a la cauda epididimaria (tabla No. 1 y gráfico No. 1). Los porcentajes en caput (29.6%), corpus (48.9) y cauda (80.7%), indican la progresión de madurez durante el tránsito epididimario.

El grado de condensación de cromatina es un buen indicador para evaluar la madurez nuclear de la población espermática en los diferentes segmentos del epidídimo.

El porcentaje de espermatozoides condensados y semicondensados en caput (26.7%), corpus (30.2%) y cauda (95.69%) indican que la condensación de la cromatina nuclear ocurre en forma similar a la madurez de la membrana plasmática durante el tránsito epididimario. (tabla No. 2 y gráfico No. 2).

TABLA 1. PROMEDIO DE RHE EN EPIDÍDIMO DE MACHO CABRÍO

Región del epidídimo	R. H. E +	R.H.E. -
CAPUT	29.655	70.341
CUERPO	48.935	51.073
CAUDA	80.742	19.257

TABLA 2. CONDENSACIÓN DE LA CROMATINA NUCLEAR EN LAS REGIONES DEL EPIDÍDIMO DE MACHO CABRÍO.

Regiones	Núcleos		
	condensados	parcialmente condensados	descondensados
CAPUT	5.7	21.05	73.25
CUERPO	10.7	19.5	69.8
CAUDA	79.62	16.07	4.31

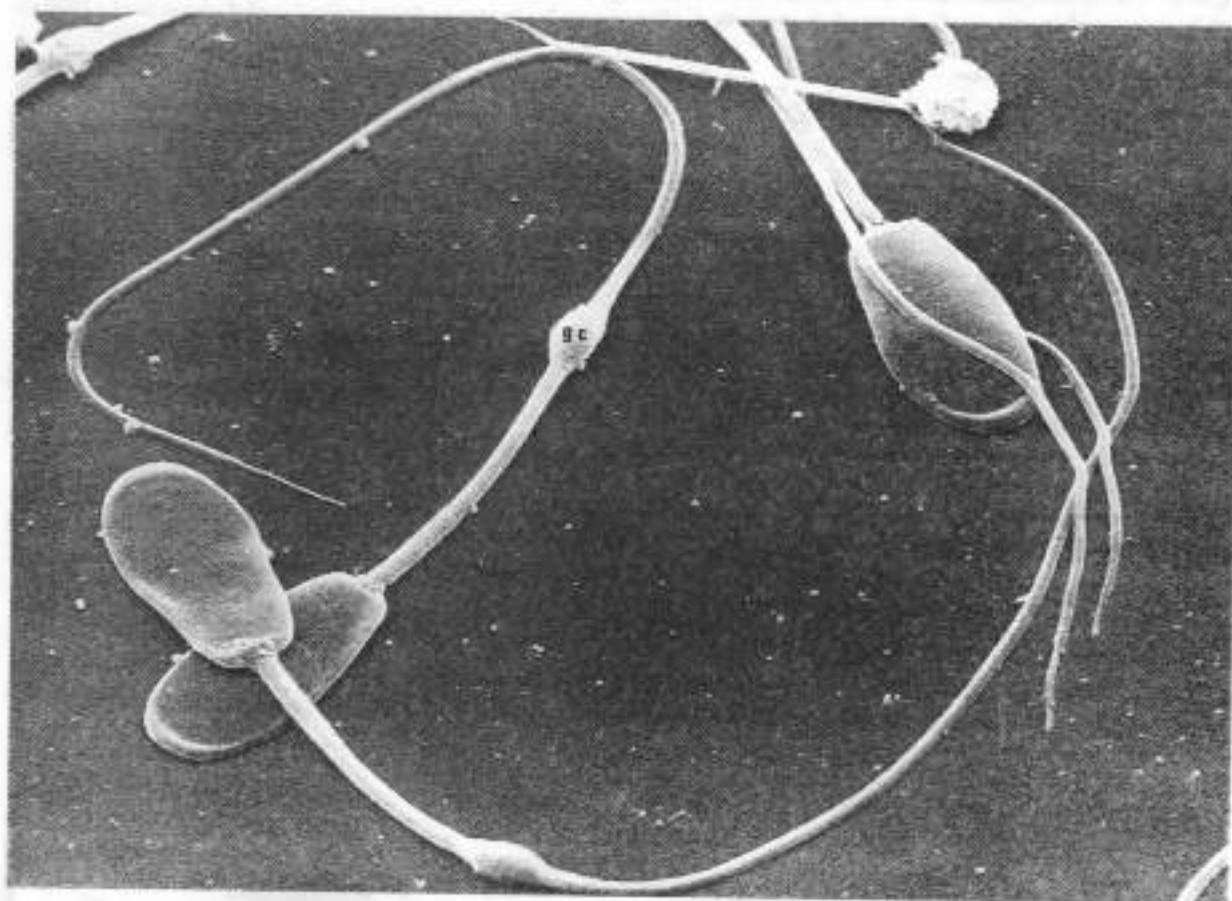


Figura 7. Espermatozoides inmaduros del corpus del epidídimo de macho cabrío. Se observa la gota citoplasmática (gc) y protuberancias en la mitad posterior del flagelo. (3000 x).

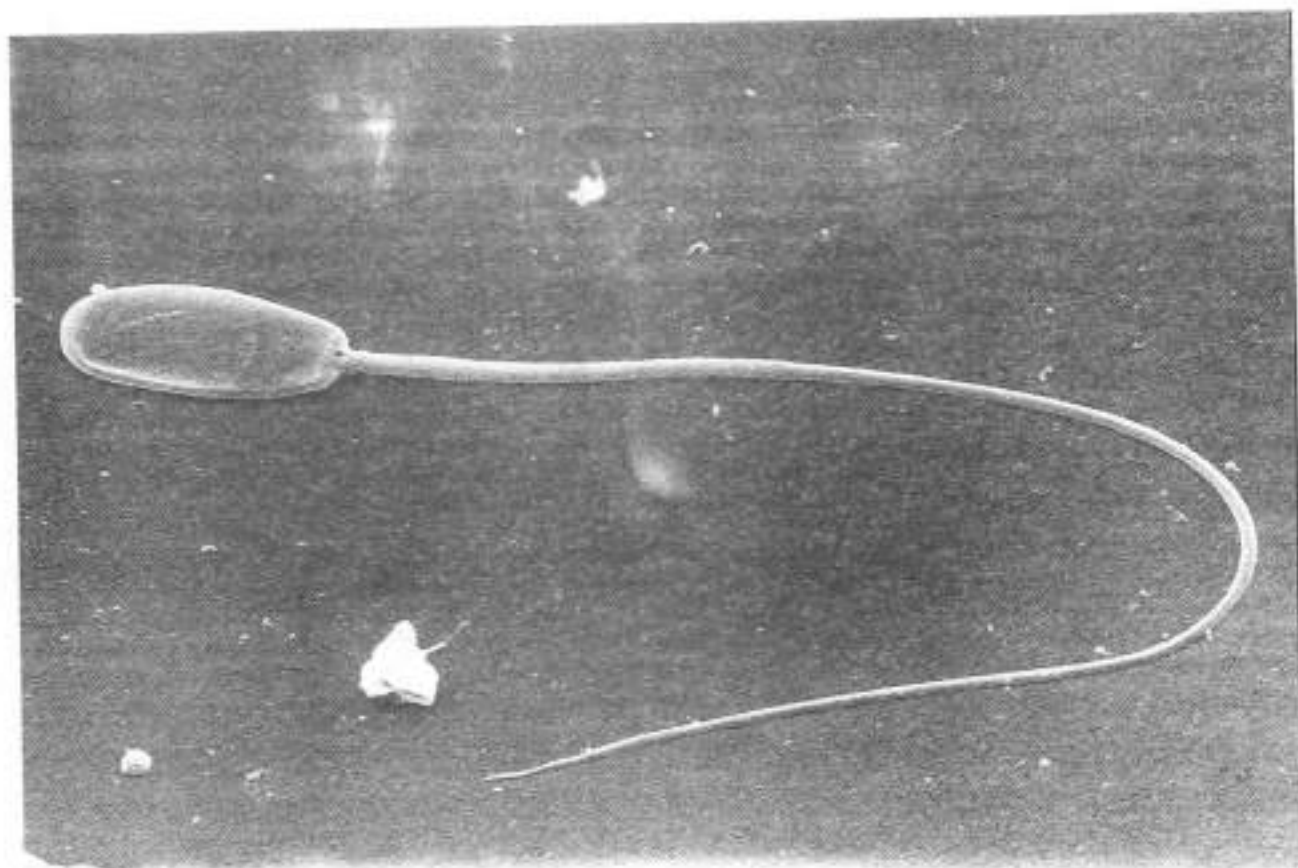


Figura 8. *Spermatozoides* maduro provenientes de la cauda del epididimo de macho cabrío. Se nota la ausencia de la gota citoplasmática (gc) y de las protuberancias en el flagelo. (4500 x).

Grafico 1. Reacción hiposmótica (R.H.E.) de la membrana plasmática

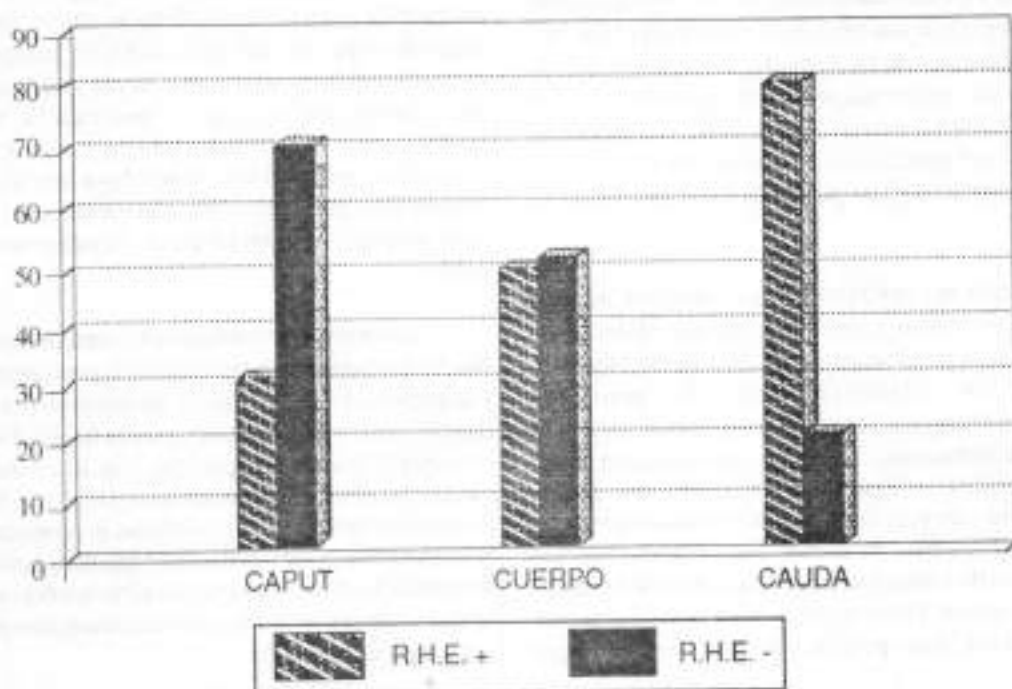
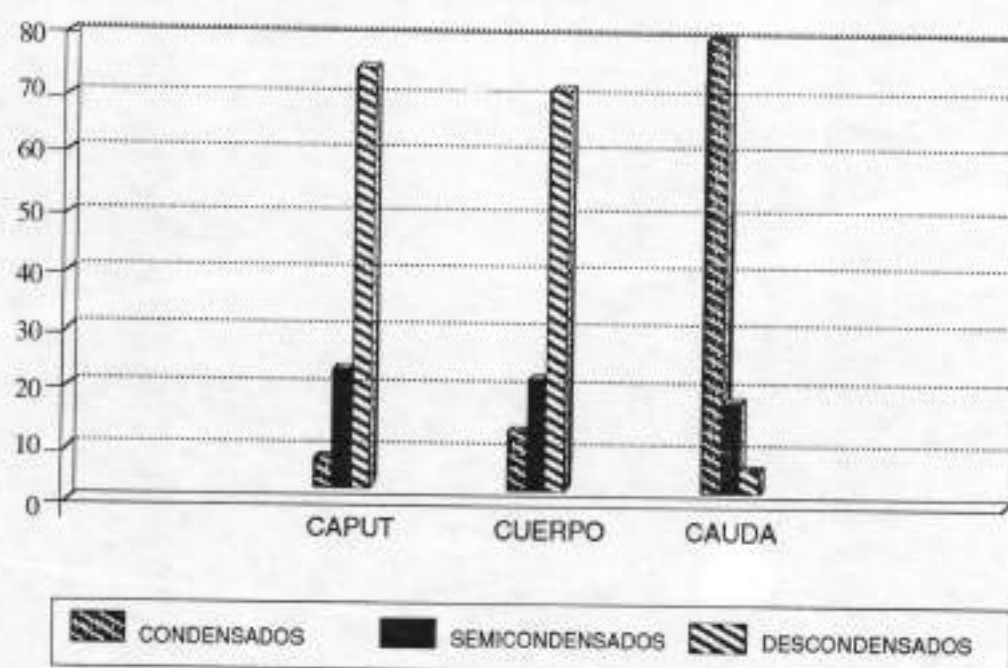


Gráfico 2. Condensación de la cromatina nuclear en epidídimo



DISCUSION

El epidídimo de mamífero es una verdadera cámara de maduración del espermatozoide a través de la secreción de proteínas andrógenos dependiente, este proceso se debe a una interacción gameto-epididimaria gobernada por este tipo de proteínas (Burgos *et al.*, 1993).

Los estereocilios de las células principales, en el caput epididimario de macho cabrío, orientan su extremo distal de forma globular hacia el lumen donde se encuentran los espermatozoides, disposición que puede relacionarse con la madurez de la membrana plasmática y la condensación de la cromatina nuclear que en este segmento son relativamente bajos (tabla No. 1). Los valores encontrados tanto para la RHE y la prueba de CROMAT son parecidos a los reportados Por Bustos - Obregón (comunicación personal) en el epidídimo de potro.

El caput del epidídimo de rata contiene muchos tioles que se oxidan a disulfuros durante el pasaje de corpus a cauda, proceso que está íntimamente relacionado con la adquisición de la motilidad espermática (Seligman *et al.*, 1992). Los espermatozoides de macho cabrío empiezan a tener una motilidad sostenida (González - Figueroa *et al.*, 1993) en corpus epididimario y es precisamente en el límite entre caput y corpus (Fig. No. 3) donde los extremos de los estereocilios de forma globular, contactan con la superficie espermática. Esta interacción que aparece en esta región, sería una prueba de que los cambios

morfofisiológicos en la célula espermática durante su paso por el epidídimo, se deben a factores extrínsecos.

Existen proteínas de membrana como la SP -10, localizada dentro del acrosoma, (Herr *et al.*, 1990); la PH - 30 ubicada en la parte posterior de la cabeza, tiene un papel fundamental en la fusión de los gametos (Primakoff *et al.*, 1987), las que están enmascaradas hasta la región del corpus del epidídimo y cuando los espermatozoides contactan el epitelio con sus estereocilios se hacen visibles (Burgos *op. cit.*). La interacción gameto - epididimario que se encuentra a partir de corpus a cauda (Figs. 4,5 y 6), indicaría que en el epidídimo de macho cabrío la madurez espermática está regulada por este tipo de proceso. Es interesante resaltar como los estereocilios en cauda carecen de vesículas en sus extremos distales por que seguramente su contenido pudo integrarse a la membrana plasmática en el corpus o a lo mejor en el segmento inicial de la cauda.

La inmadurez morfológica del espermatozoide (Fig. No. 7) expresada por la presencia de la gota citoplasmática y la presencia de vesículas en su extremo posterior del flagelo, así como los valores para la RHE y CROMAT, en caput y corpus comparados con lo encontrado en cauda, en el aspecto morfológico (Fig. No. 8) y en lo fisiológico (tablas 1 y 2), apoyarían la propuesta de que la maduración postesticular del espermatozoide es consecuencia del intercambio de secreciones del epidídimo, las que se dan por la interacción entre las células epiteliales y la célula espermática.

Agradecimiento: Quiero expresar mi gratitud al Dr. Claudio Barros Rodríguez y a la Bga. Martha Valdivia Cuya del Laboratorio de Embriología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile, por la gentileza de procesar las

muestras para el microscopio electrónico de barrido. Así mismo expresó mi reconocimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC) por la subvención económica otorgada para realizar el presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AMAN, R.P.** 1987. Function of the epididymis in bulls and ram. *Journal of Reproduction and Fertility* (suppl.) 34: 115 - 131.
- BURGOS, M.H.** 1989. Epididymal maturation of spermatozoa. *Archivos de Biología y Medicina Experimental* 22: 190 abstr.
- BURGOS, M.H. FORNES, M. W., GUTIERREZ, L.S. & VICENTI, A.** 1993. El proceso de maduración del espermatozoide durante el tránsito epididimario. En: *Progresos en Biología Celular* (Becerra J., Pérez Figares JM., Fernández - Llebreg P. eds). pp 99 -103
- GONZALES FIGUEROA, H.** 1988. Análisis de la capacidad fértil del espermatozoide de cuy en función a la estabilidad territorial de la cauda del epidídimo. Tesis Doctoral UNMSM. 141 pp.
- GONZALES - FIGUEROA, H., YAÑEZ, D., BRESCIA, G., PACHECO, F. & STUCHI, M.** 1993. Manejo reproductivo integral en caprinos: supervivencia del espermatozoide epididimario en condiciones hipotérmicas. *Tradición* 1: 83-86
- HERR, J.C., FLICKINGER, CH.J., HOMYK, M., KLOTZ, K., & JOHN, E.** 1990. Biochemical and morphological characterization of the intra-acrosomal antigen SP - 10 from human sperm. *Biology of Reproduction*. 42: 181 - 193.
- JEYENDRA, R.S., VANDEERVEN, H.H., PEREZ PELAEZ, M.**, 1984. Development of an assay to asses the functional integrity of the human sperm membrane and the relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*. 70: 219 -228.
- MARENGO, S.R., & AMAN, R.P.** 1990. Morphological feature of principal cells in the ovine epididymis: A quantitative and qualitative study. *Biology of Reproduction*. 42: 167 - 179.
- ORGBIN - CRIST, M.C.** 1969. Studies on the function of epididymis. *Biology of Reproduction* 1: 155 - 175.
- PRIMAKOFF, P., HYATT, H. & TREDICK - KLINE, J.** 1987. Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm - egg membrane fusion. *Journal of Cell Biology* 104: 141 - 149.
- ROBAIRE, B., HERMO, L.**, 1988. Efferent ducts, epididymis and vas deferens: structure, functions, and their regulation. In: *The Physiology of Reproduction*. Vol 1. Knobil E, Nell JD, eds. Raven Press pp. 999- 1089.
- SELIGMAN, J., KOSOWER, N.S., & SHALGI, R.** 1992. Effects of caput ligation on rat sperm and epididymis: protein thiols and fertilizing ability. *Biology of Reproduction*. 46: 301-308.
- TERQUEN, A., & DADOUNE, P.** 1983. Aniline blue staining of human spermatozoa chromatin: Evaluation of nuclear maturation. In: *The sperm cell*. André J, ed. The Hague, Martinus. Nyhoff Publishers. 249 - 252.