

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE LAS ALTERACIONES PRESENTES EN LOS ESPERMATOZOIDES DE TOROS MESTIZOS SIBONEY

Scanning Electron Microscopy of Sperm Alterations of Siboney Crossbred Bulls

*Alpidio A. Boada Sucre*¹, *Hilda De Stefano*¹, *Bernardo González*¹, *Héctor Soto*¹, *Susmira Godoy*² y *Antonio Bretaña*¹

¹*CEBIV-IDECYT, Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez, Apartado 1204.*

²*Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias FONAIAP-Maracay, estado Aragua, Venezuela*

RESUMEN

Los espermatozoides poseen un alto grado de polimorfismo. Se considera normal que hasta un 20% de ellos esten alterados en el eyaculado, mientras que un semen cuyo porcentaje de atipias sea superior al 20%, se tiene como de baja calidad. La mayoría de tales alteraciones pueden ocurrir durante el tránsito y maduración a lo largo del epidídimo. Esas malformaciones pueden ser debido a factores genéticos, parasitarios, etarios, alimenticios, ecológicos, etc., que alteran el normal desarrollo de las diferentes etapas de la morfogénesis del espermatozoide. El propósito del presente trabajo fue describir a través de microscopía electrónica de barrido, las alteraciones presentes en los espermatozoides de toros mestizos Siboney (5/8 *Bos taurus*, 3/8 *Bos indicus*), que no son detectadas por las pruebas convencionales. Para ello, a un grupo de cuatro toros tomados al azar, se les extrajo semen por electroeyaculación en dos ocasiones, en un intervalo de quince días, el cual se procesó para microscopía electrónica de barrido. Se observaron, además de las atipias detectables por microscopía óptica como: flagelos enrollados sobre si mismos, gotas citoplasmáticas y cabezas sin flagelos, otras alteraciones no detectables a ese nivel, tales como: desprendimiento de la membrana plasmática, pliegues de la misma membrana en la zona del acrosoma, restos vesiculares en la membrana que recubre la cabeza, desprendimiento de la misma con exposición del acrosoma. La observación, por microscopía electrónica de barrido de las alteraciones presentes en espermatozoides de toros, incrementó el número de atipias detectadas con respecto a lo reportado por los métodos convencionales. Al poder mostrar alteraciones que escapan del poder resolutivo del microscopio óptico, permite un diagnóstico de viabilidad más confiable, de

manera que se puedan seleccionar los sementales adecuados para la inseminación natural y artificial, y así incrementar significativamente el porcentaje de fertilidad.

Palabras clave: Bovino, espermatozoide, alteraciones, microscopía electrónica de barrido.

ABSTRACT

The sperms possess a high polymorphism degree. It is considered normal that until 20% of them are altered in the ejaculated semen, while a semen whose atypical percentage is superior to 20%, has low quality. Most of such alterations could be happen during the traffic and maturation along the epididymis. Those malformations can be due to genetic, parasitic, age, nutritional and ecological factors, that alter the normal development of the different stages in the morphogenesis of the sperm. The purpose of the present work was to describe by scanning electron microscopy, the present alterations in the sperm of siboney crossbred bull (5/8 *Bos taurus*, 3/8 *Bos indicus*) that are not detected by the conventional tests. From four bulls taken at random, semen was extracted by electroejaculation in two times in an interval of fifteen days, and were processed for scanning electron microscopy. In addition to sperm cells alterations observed in light microscopy, such as: self coiled flagellum, in scanning electron microscopy were observed bovine spermatozoon with detachment of the plasmatic membrane, folds of the same membrane in acrosome area, vesicular structure and detachment of the head membrane with exposure of acrosome. These observations, increased the number of malformations detected and reported by light microscopy. Therefore, scanning electron microscopy allows a more reliable diagnosis of viability of sperm cells, so that, the appropriate bull can be selected for natural and artificial in-

semination, and, in this way, to increase significantly the percentage of fertility.

Key words: Bovine, spermatozoöm, alterations, scanning electron microscopy.

INTRODUCCIÓN

El espermatozoide es una célula especializada y condensada, de 50 a 60 μm de longitud que no crece ni se divide. Consiste de una cabeza, que contiene el material genético paterno, y una cola que provee el mecanismo de locomoción. Los espermatozoides poseen una serie de propiedades: movimiento, zona de reconocimiento, traducción de señal, exocitosis, fusión celular y fertilización. Una vez que son formados en los túbulos seminíferos, estos se transforman y almacenan en el epidídimo hasta el momento de la eyaculación [4,14].

La capacidad de producción de espermatozoides por los testículos, está controlada por la pituitaria anterior y otros factores que actúan de manera indirecta vía la glándula o directa en los testículos, la espermatogénesis se prolonga durante toda la vida hasta la senilidad, cuando en forma progresiva ocurre la atrofia de los testículos y solo unos pocos túbulos son capaces de producir esperma. Para expresar el potencial de fertilidad y la función reproductiva, el espermatozoide debe ser viable, presentar un aparato locomotor eficiente y un núcleo y acrosoma intactos [18].

La mayoría de las alteraciones de los espermatozoides pueden ocurrir en el tránsito y maduración a lo largo del epidídimo. Estas malformaciones, se dividen en dos grupos de acuerdo a su origen: malformaciones primarias, si éstas ocurren en el testículo durante la espermatogénesis y, malformaciones secundarias, si ocurren en el epidídimo durante el proceso de maduración del esperma [8].

La evaluación morfológica, es uno de los tres parámetros más importantes a ser evaluados en un análisis de semen, junto con la motilidad y la concentración. Esta es esencial para el mejoramiento de la fertilidad, basado en el análisis del eyaculado [13, 20]. La misma se realiza de manera rutinaria, por microscopía óptica dividiendo al espermatozoide en cabeza y cola, pasando desapercibidos los defectos más finos [24]. Estos defectos en los espermatozoides son frecuentes en todos los eyaculados bovinos, y su significado funcional en relación a la fertilidad se asocia con la incidencia del defecto a nivel de cada individuo [1].

El microscopio electrónico de barrido de emisión de campo, dado su gran poder de resolución a bajos voltajes, permite una descripción detallada y confiable de las malformaciones presentes en los espermatozoides [12]. Por tal motivo, el propósito del presente trabajo fue describir por microscopía electrónica de barrido, las alteraciones presentes en los espermatozoides de toros sementales mestizos Siboney (5/8 *Bos taurus*, 3/8 *Bos indicus*).

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de semen se tomaron por electroeyaculación según la técnica dereportada por Tagegne [22], en la estación experimental del Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias FONAIAP-Maracay, Venezuela, durante el verano.

Se eligieron al azar a partir de un grupo de 16 toros, cuatro de edad comprendida entre 24 y 30 meses, tipo Siboney (5/8 *Bos taurus*, 3/8 *Bos indicus*) en buenas condiciones de salud, a los que se les había efectuado un seguimiento de la condición física, clínica, parasitológica y de la calidad espermática, durante el año previo al tratamiento.

A dos muestras de semen, una vez descartado el plasma seminal por centrifugación en buffer HEPES 0,1M, se les agregó glutaraldehído al 2,5% en buffer cacodilato 0,1M (pH = 7,2-7,3) por 3 h a 4°C. Luego se le hicieron dos lavados en el mismo buffer por 10 min c/u. Se postfijaron en tetróxido de osmio acuoso al 1% por 1 h, se volvieron a lavar, y entonces deshidratadas en una serie creciente de concentraciones de etanol, secadas por el método de punto crítico (Hitachi, HCP-2), cubiertas con platino en un colector iónico Baltec MED-020, y finalmente observadas y fotografiadas a 5 keV en un microscopio electrónico de barrido, emisión de campo Hitachi, S-4500.

RESULTADOS

Se apreciaron, además de las alteraciones detectables por microscopía óptica como: a) espermatozoide inmaduro con restos de la gota citoplasmática, recubriendo el flagelo desde la zona media hasta una gran porción de la parte principal, FIG. 1; b) espermatozoide con el flagelo enrollado sobre sí mismo al nivel de la pieza media, asociado a una gota citoplasmática, FIG. 2; c) espermatozoide inmaduro con restos de la gota citoplasmática al nivel de la zona media del flagelo, FIG. 3; d) espermatozoide inmaduro con el flagelo enrollado sobre sí mismo en la zona media, FIG. 4; otras alteraciones, sólo observables por microscopía electrónica de barrido, como fueron a) pérdida de la membrana plasmática a nivel del acrosoma, pliegues de la membrana plasmática que recubre el acrosoma, FIGS. 3, 4 y 5; b) depresiones en la zona correspondiente al acrosoma, FIG. 6; c) cabeza de un espermatozoide con depresión notable de la membrana plasmática y posiblemente del acrosoma. Nótese el ángulo de inserción entre la unión del flagelo a la cabeza, FIG. 6; d) espermatozoide con la cabeza disminuida en tamaño (microcefalia), FIG. 7; e) espermatozoides con cabezas de formas diferentes y en donde se aprecia claramente el desprendimiento de la membrana que recubre la cabeza de uno de ellos a nivel del acrosoma con exposición del mismo, obsérvese en la cabeza del otro espermatozoide el mismo proceso en su fase inicial, FIG. 8; f) varios espermatozoides entre los que se observan unos en buen es-

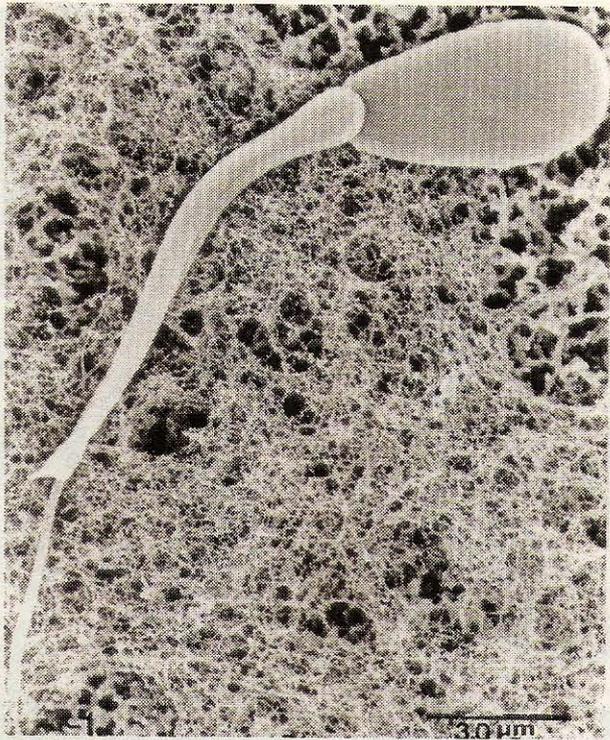


FIGURA 1. ESPERMATOZOIDE INMADURO CON RESTOS DE GOTTA CITOPASMÁTICA, RECUBRIENDO EL FLAGELO DESDE LA ZONA MEDIA HASTA UNA GRAN PORCIÓN DE LA PARTE PRINCIPAL. NO SE OBSERVA NINGÚN TIPO DE ALTERACIÓN SUPERFICIAL EN LA CABEZA DEL MISMO. X 6.000.

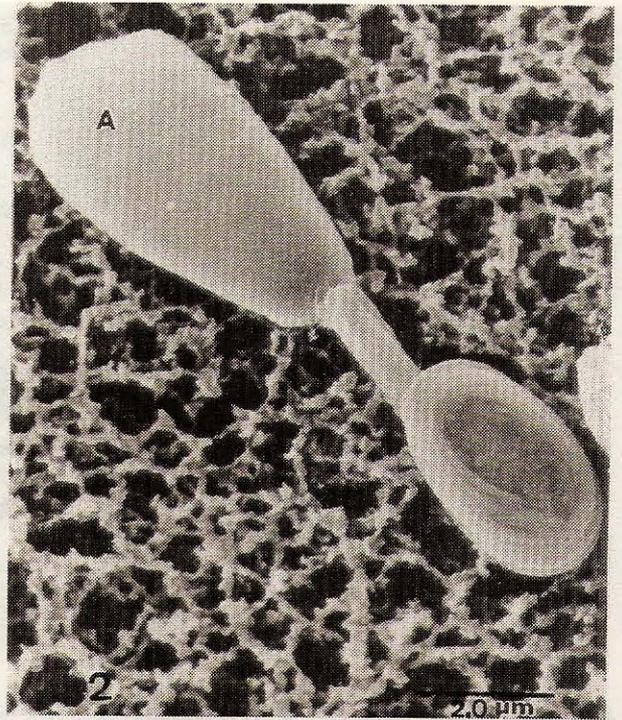


FIGURA 2. ESPERMATOZOIDE CON EL FLAGELO ENROLLADO SOBRE SI MISMO, A NIVEL DE LA PIEZA MEDIA, ASOCIADO A UNA GOTTA CITOPASMÁTICA, CON PÉRDIDA DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA A NIVEL DEL ACROSOMA (A). X 9.000.

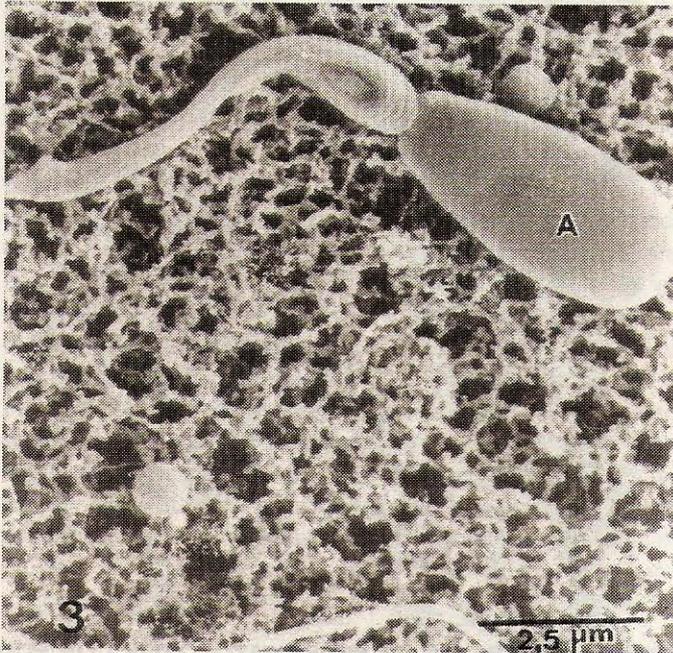


FIGURA 3. ESPERMATOZOIDE INMADURO CON RESTOS DE GOTTA CITOPASMÁTICA A NIVEL DE LA ZONA MEDIA QUE IMPIDIÓ EL DESARROLLO COMPLETO DEL FLAGELO. OBSÉRVESE EL DESPRENDIMIENTO DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA EN LA ZONA DEL ACROSOMA. (A). X 8.000.

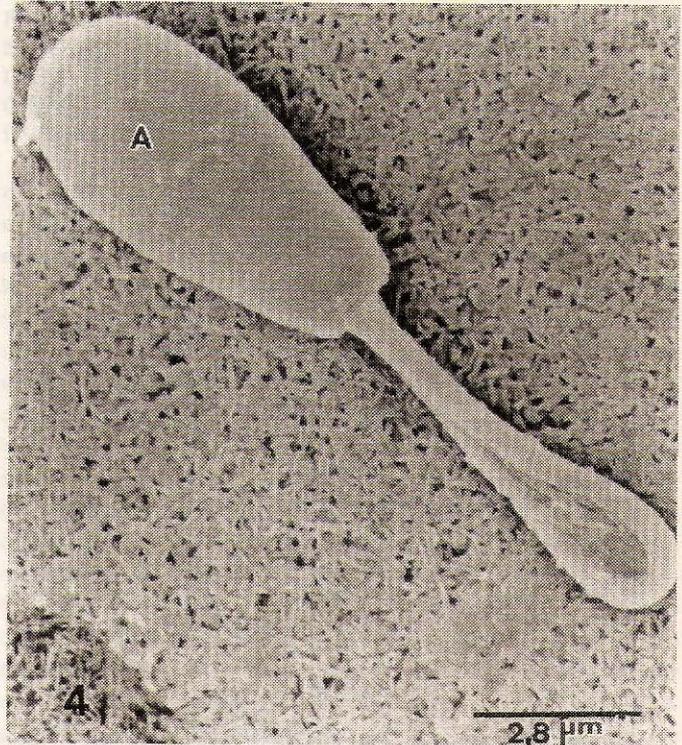


FIGURA 4. ESPERMATOZOIDE INMADURO CON EL FLAGELO ENROLLADO SOBRE SI MISMO EN LA ZONA MEDIA Y RELIEVES EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA QUE RECUBRE AL ACROSOMA (A). 7.000.

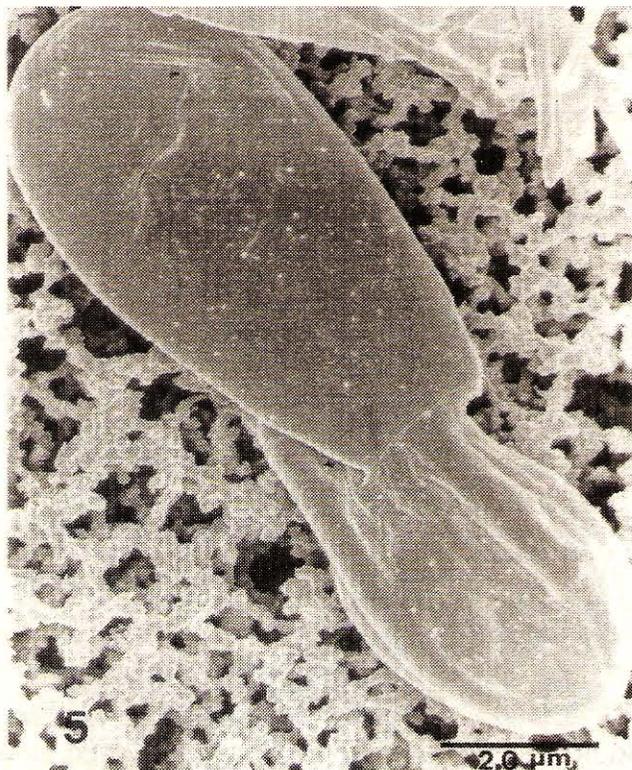


FIGURA 5. DEPRESIONES EN FORMA DE PLIEGUES EN LA CABEZA (ZONA DEL ACROSOMA), ADEMÁS EL FLAGELO APARECE ADHERIDO SOBRE SI MISMO POR LA PRESENCIA DE LA GOTA CITOPLOASMÁTICA. X 9.500.

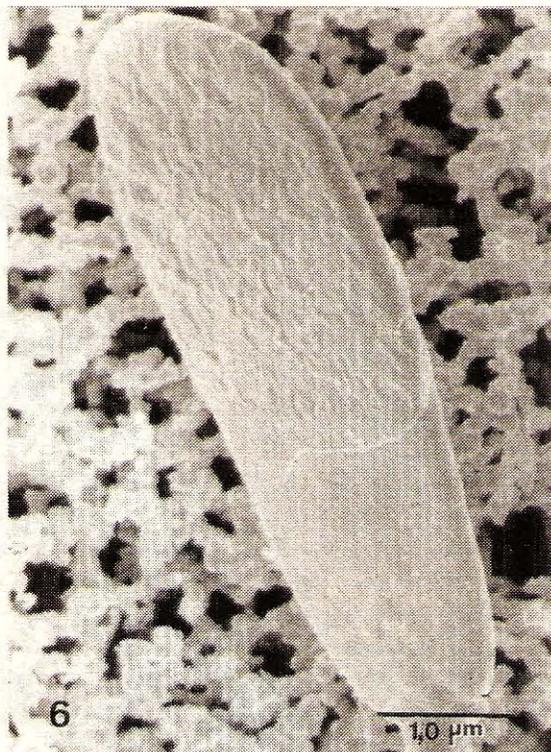


FIGURA 6. CABEZA DE ESPERMATOZOIDE CON DEPRESIÓN NOTABLE DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y POSIBLEMENTE DEL ACROSOMA,. NÓTESE CIERTO ÁNGULO EN LA INSERCIÓN DEL FLAGELO A LA CABEZA DEL ESPERMATOZOIDE. X 16.000.



FIGURA 7. PARTE DE LA CABEZA DE UN ESPERMATOZOIDE INMADURO LA CUAL APARECE DISMINUIDA EN TAMAÑO (MICROCEFALIA). X 7.000.

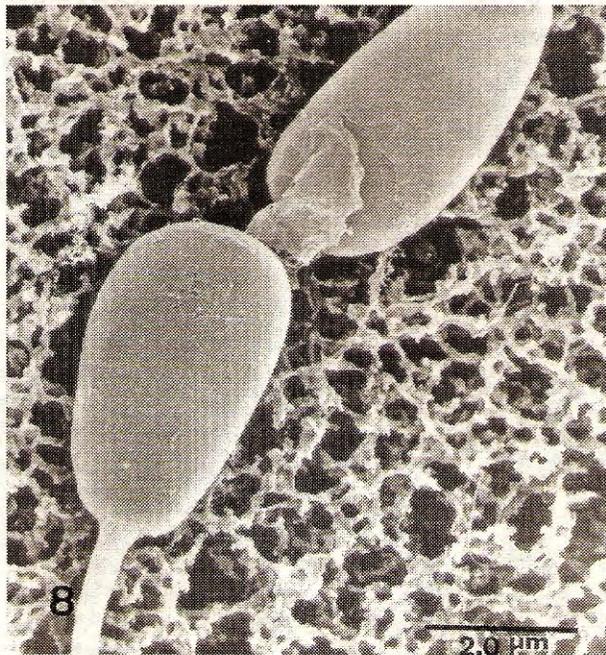


FIGURA 8. CABEZAS DE ESPERMATOZOIDES CON FORMAS DIFERENTES Y EN DONDE SE APRECIA CLARAMENTE EL DESPRENDIMIENTO DE LA MEMBRANA QUE RECUBRE UNA DE ELLAS, A NIVEL DEL ACROSOMA Y CON EXPOSICIÓN DEL MISMO. OBSERVÁNDOSE EN LA CABEZA DEL OTRO ESPERMATOZOIDE EL MISMO PROCESO EN SU FASE INICIAL. X 9.000.

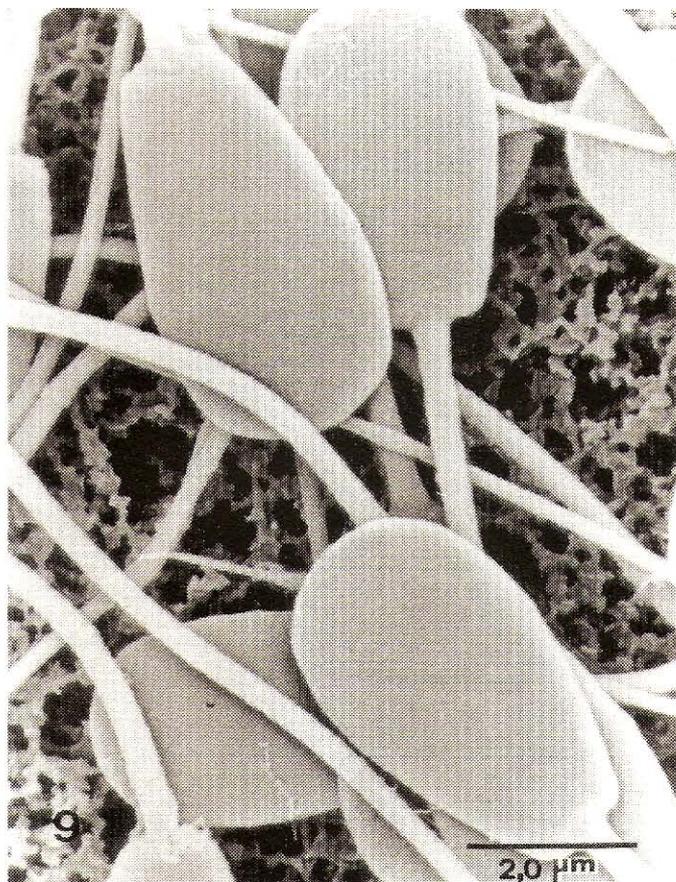


FIGURA 9. GRUPO DE ESPERMATOZOIDES ENTRE LOS QUE SE OBSERVAN UNOS EN BUEN ESTADO Y OTROS CON ALTERACIONES EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA QUE RECUBRE LA CABEZA. X 9.000.

tado y otros con desprendimientos de la membrana plasmática, FIG. 9; g) dos cabezas de dos espermatozoides, una en buen estado adherida al flagelo y la otra desprendida de su flagelo con grandes daños a nivel de la membrana plasmática FIG. 10; h) cabeza de un espermatozoide con la membrana que recubre al acrosoma totalmente desprendida en forma vesiculada FIG. 11; i) cabeza de un espermatozoide en la cual se ha desprendido totalmente la membrana que la recubre, incluso a nivel del flagelo. Al fondo y a la izquierda se aprecia parte de otro espermatozoide con morfología normal, FIG. 12; j) segmento de un espermatozoide, que incluye el punto de unión del flagelo a la cabeza. En este segmento se observan las mitocondrias de la vaina mitocondrial en su disposición característica y algunos filamentos, probablemente del citoesqueleto FIG. 13; k) conjunto de espermatozoides junto a cuerpos esféricos, también se observan cabezas y flagelos desprendidos y espermatozoides inmaduros con cabezas reducidas FIG. 14.

DISCUSIÓN

En un lapso de 10 a 14 días se dan cambios importantes en la diferenciación espermática y cualquier defecto que ocu-

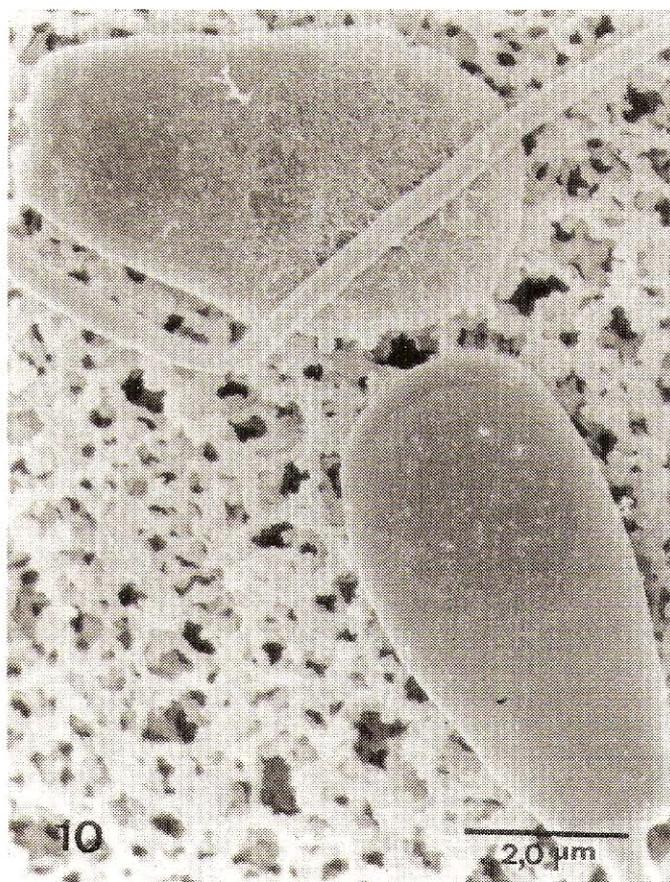


FIGURA 10. DOS CABEZAS DE ESPERMATOZOIDES, UNA EN BUEN ESTADO ADHERIDA A SU FLAGELO Y OTRA DESPRENDIDA DEL MISMO, CON NOTABLES ALTERACIONES EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA QUE LA RECUBRE. X 9.000.

rra durante este período, pudiera ser la causa del desarrollo anormal del espermatozoide; de allí, que cuando se observa en detalle, se presenta una muy amplia gama de variación en la forma y estructura, dentro de las diferentes categorías en las anomalías de la célula espermática. El enrollamiento de la cola del espermatozoide, FIGS. 1, 2, 3 y 4, a menudo va acompañado de la fusión de partes adyacentes de la cola con dislocación de las fibras axiales; estos dos tipos de malformaciones no necesariamente tendrían un origen común; en estudios realizados en toros sugieren que el enrollamiento de la cola del espermatozoide está estrechamente relacionado a una debilidad en las fibras densas externas, causado por un exceso de zinc en el fluido epididimal [7]. Mientras que Koeffoed-Johnsen y Pedersen [15], sugieren que el enrollamiento de la cola, es una malformación de origen epididimal como consecuencia de debilidad en las fibras densas provocada por enzimas digestivas lisosomales. Estas mismas enzimas de algunos espermatozoides inmaduros, podrían salir al medio y producir agujeros, desprendimiento de membranas, y afectar mitocondrias en otros espermatozoides que entren en contacto con ellas. Esta interpretación, se basa en la estrecha relación entre la curvatura de la cola y la mitad distal de la pieza media

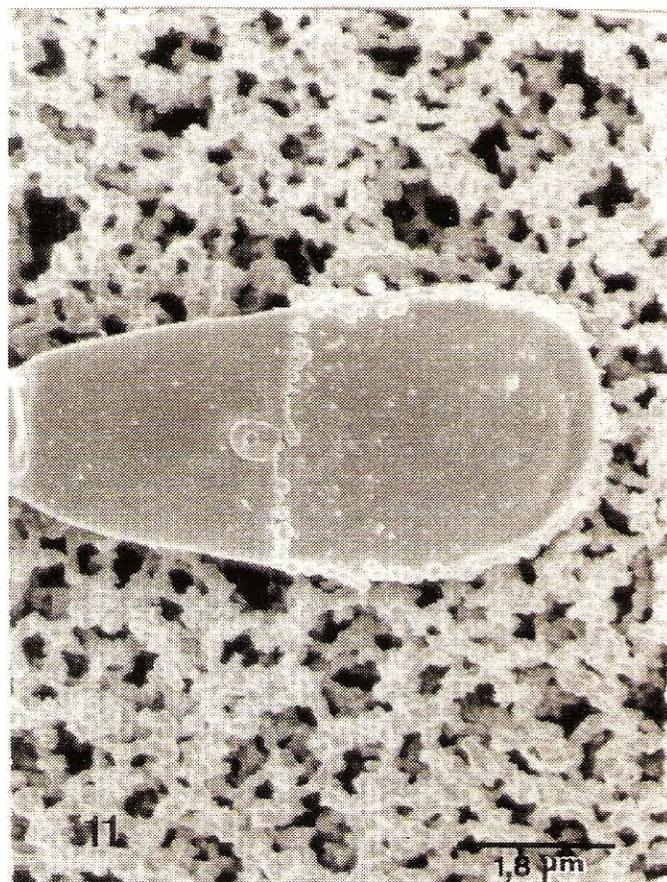


FIGURA 11. CABEZA DE UN ESPERMATOZOIDE CON LA MEMBRANA PLAMÁTICA QUE RECUBRE AL ACROSOMA TOTALMENTE DESPRENDIDA. X 9.500.

y, el remanente de la gota citoplasmática con una prematura liberación de las enzimas lisosomales por esta gota que produce la digestión y desorganización de los componentes estructurales de la cola y resto del espermatozoide.

Un normal desarrollo de la vaina de mitocondrias supone un soporte estructural al anillo de Jensen, a la pieza principal, y a las fibras de la pieza media, de donde depende la capacidad de deformación del citoesqueleto que da forma a dicha pieza [1]. La alineación defectuosa de las mitocondrias, justo antes de la espermatogénesis puede influir en la desorganización de las fibrillas axiales y el enrollamiento de la cola, registrado más tarde en el epidídimo y en el espermatozoide eyaculado. Otra causa puede ser que el cambio de osmolaridad del fluido epididimal en la región caudal [18]. Una tercera causa del enrollamiento flagelar es la asociada a las anomalías de la pieza media, particularmente la presencia de restos citoplasmáticos provocados por defectos durante la espermatogénesis. En la FIG. 2 se observa la presencia de gota citoplasmática, éstas últimas se presentaron con una alta frecuencia en las muestras observadas, examinadas mediante microscopía óptica. Estos restos han sido identificados como de particular importancia para definir la capacidad de fertilización del espermatozoide *in vitro* [19].

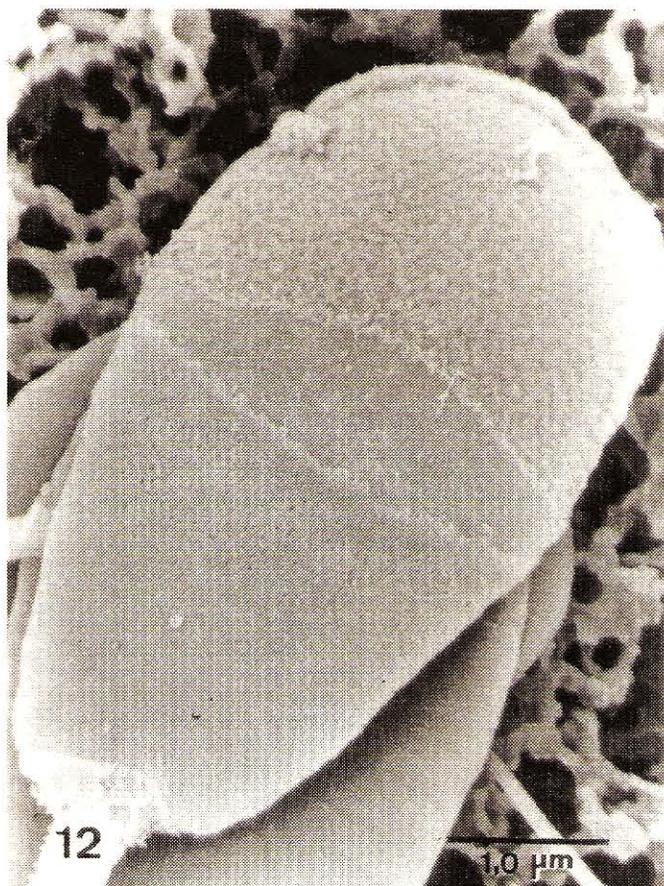


FIGURA 12. CABEZA DE UN ESPERMATOZOIDE EN LA CUAL SE HA DESPRENDIDO TOTALMENTE LA MEMBRANA QUE LA RECUBRE, INCLUSO A NIVEL DEL FLAGELO. AL FONDO SE APRECIA PARTE DE LA CABEZA DE OTRO ESPERMATOZOIDE, CUYA MEMBRANA LUCE NORMAL. X 20.000.

El doblez del flagelo, relacionado con la gota citoplasmática, dentro de la patología seminal, está asociado al desarrollo defectuoso de las fibras densas, daño a las mitocondrias y presencia de estructuras membranosas lamelares. Esta anomalía fue definida como "Defecto Dag" por Blom [6] y fue hallada por dicho autor como un defecto hereditario en el semen de toros. Por otra parte otros investigadores como Barth y Oko Bernard, [2], Bernard, [3] las han detectado en animales altamente saludables de otras especies. Koefoed-Johnsen y Pedersen [15] propusieron que esto sucede cuando la gota citoplasmática permanece en el espermatozoide y las enzimas hidrolíticas que contienen, digieren parcialmente las fibras densas y provocan el doblez del flagelo.

En el presente estudio, realizado a nivel de microscopía electrónica de barrido, en las estructuras que componen al espermatozoide, se definen con claridad los componentes estructurales mal formados. Con frecuencia, estos se corresponden con rupturas a nivel de la membrana plasmática y del acrosoma, FIGS. 5, 6, y 8 y, por lo general están asociadas a malformaciones en la cabeza y en un alto porcentaje a defec-

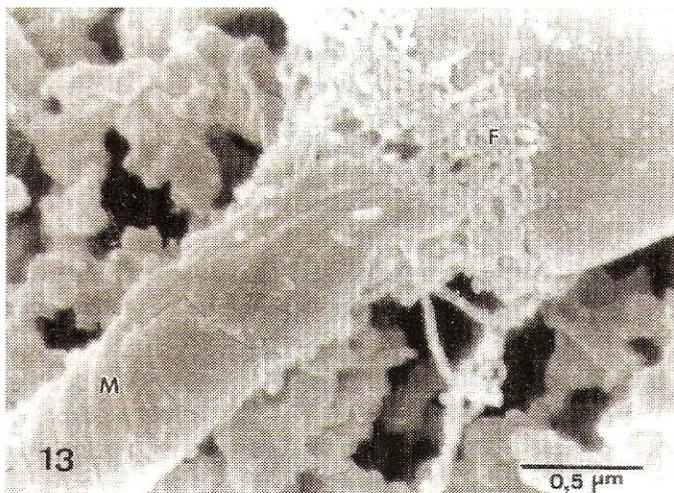


FIGURA 13. MICROGRAFÍA ELECTRÓNICA DE UN SEGMENTO DE ESPERMATOZOIDE, A NIVEL DEL PUNTO DE INSERCIÓN DEL FLAGELO A LA CABEZA. SE PUEDE OBSERVAR LAS MITOCONDRIAS (M) DE LA VAINA MITOCONDRIAL EN SU DISPOSICIÓN CARACTERÍSTICA, FILAMENTOS (F) DEL CITOESQUELETO. X 42.000.

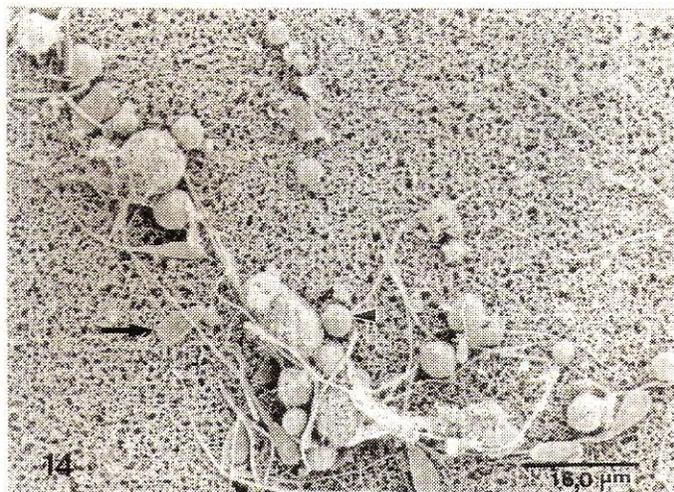


FIGURA 14. CONJUNTO DE ESPERMATOZOIDES JUNTO A CUERPOS ESFEROIDES (CABEZA DE FLECHA). TAMBIÉN SE OBSERVAN CABEZAS DESPRENDIDAS (FLECHA). X 1.200.

tos en la condensación de la cromatina, la cual aparece granular al microscopio electrónico de transmisión [18, 23].

Estudios ultraestructurales realizados por microscopía electrónica de transmisión muestran que solo las cabezas anormales presentan cromatina no condensada [11]. Mientras que en otros se ha reportado la pérdida del acrosoma y la presencia de la matriz acrosomal electrontransparente, como la principal alteración en los espermatozoides de hamster [9, 10]. Koehler y col. reportaron la presencia de un gran número de anomalías morfológicas en *Canis rufus* que incluyen espermatozoides con dos cabezas y dos colas, doblez en la cola y el cuello doble y la presencia de células blancas en un tercio

de las muestras tomadas [16]. En experimentos controlados de fertilización "in vitro" realizados por Sukcharoen y col. [21], con espermatozoides humanos, demostraron que la pérdida de membrana acrosomal y el incremento significativo de células anormales está asociado a una fertilización menor al 50%. Esto se demuestra porque una reacción acrosomal fisiológicamente normal, se identifica por la persistencia de una banda de plasma y por la membrana acrosomal externa, ambas en el segmento ecuatorial de la cabeza del espermatozoide.

La presencia de hipoplasia de la cabeza del espermatozoide, FIG. 7, es considerada como de un impacto devastador en la fertilidad, dicha anomalía se le menciona dentro de la patología seminal como "microcefalia" y es común en humanos con problemas de infertilidad, donde el espermatozoide es incapaz de penetrar la zona pelúcida del oocito, a pesar de que el análisis de semen muestre niveles de concentración, motilidad y morfología aceptables [24].

Otros cambios morfológicos como cráteres en la cabeza, cabeza sin flagelo, fragmentación y vesiculación de la célula, pérdidas de las membranas de la cabeza y del flagelo, asociados a una ruptura y desaparición del contenido acrosomal, FIGS. 9, 10, 11 y 12, se clasifican como espermatozoides muertos [11]. Estas notables alteraciones, podrían estar asociadas a la lisis enzimática y/o ser producto de la senescencia de los espermatozoides, o a injurias por las altas temperaturas (33-36°C), interfiriendo éstas con el proceso de espermatogénesis y en menor grado con la maduración del esperma en el epidídimo [23]. También ellas han sido observadas en experimentos realizados *in vitro*, indicadas por la presencia de cambios degenerativos difusos y ultraestructurales que incrementan el porcentaje de alteraciones en el eyaculado [5, 17].

CONCLUSIONES

La observación por microscopía electrónica de barrido de las alteraciones presentes en espermatozoides de toros mestizos, incrementó el número de atipias detectadas, con respecto a lo reportado por los métodos convencionales. Al poder mostrar alteraciones que escapan del poder resolutivo del microscopio óptico, nos permite emitir un diagnóstico de viabilidad más confiable, de manera que se puedan seleccionar los sementales adecuados para la inseminación natural y artificial, y así incrementar significativamente el porcentaje de fertilidad.

AGRADECIMIENTO

Al personal del Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, U.C.V. Este proyecto fue financiado por el CONICIT a través de su programa de fortalecimiento de Centro; por el FONAIAP a través de su presupuesto ordinario para investigaciones; y por la Universidad Simón Rodríguez.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ANDENDEN-BERG, K.; FILSETH, O.; ENGELAND, E.A. Sperm Midpiece Defect in Hereford Bull with Variable Semen Quality and Freezability. **Acta Vet. Scand.** 37: 367-373. 1996.
- [2] BARTH, A.; OKO, R. **Abnorm. Morph. Bov. Sperm.** Ames, Iowa State University Press, USA: 214-270. 1989.
- [3] BERNARD, R. The occurrence of abnormal sperm in the cauda epididymis of *Rhinolophus capensis* (Mammalia: Criroptera). **J. Morphol** 183: 177-183. 1985.
- [4] BISHOP, M.W.; WALTON, A. Spermatogenesis and the structure of Mammalian Spermatozoa. In **Marshall's Phys. Rep.** A.S. Parkes (de.), London, Longmans. 1969a.
- [5] BJORND AHL, L.; KVIST, U. Loss of an intrinsic capacity for human sperm chromatin decondensation. **Acta Physiol. Scand.** 124: 189-194. 1985.
- [6] BLOM, E. A new sterilizing and hereditary defect (the "Dag defect") located in the bull sperm tail. **Nature** 209: 739-740. 1966.
- [7] BLOM, E.; WALSTRUP C. Zinc as possible causal factor in the sterilizing sperm tail defect, the "Dag defect", in new Jersey bulls. **Nord. Vet. Med.**, 28: 515-518. 1976.
- [8] BRIZ, M.; BONET, S.; PINART, B.; EGOZCUE, J.; CAMPS, R. Comparative study of boar sperm coming from the caput, corpus, and cauda regions of the epididymis. **J. Androl.**, 16: 175-188. 1995.
- [9] CALVO, A.; PASTOR, L.M.; GALLEGU-HUIDORO, J.; HORN, R.; PALLARES, J. Abnormal Spermatozoa in the Cauda epididymis of adult and aged hamster (*Mesocricetus auratus*) **Acta Anat.** 154: 186-195. 1995.
- [10] FRANCAVILLA, F.; ROMANO, R.; MARRONE, V.; VALENTI, M.; SANTUCCI, R. Relationship between acrosome reactions and hamster egg penetration after ionophore challenge in absence of teratozoospermia. **Fertil. Steril.** 63: 1301-1305. 1995
- [11] FRANCAVILLA, S.; CORDESCHI, G.; GABRIELE, A.; GIANNAROLI, L.; PROPERZI, G. Chromatin defects in normal and malformed human ejaculated and epididymal spermatozoa: a cytochemical ultrastructural study. **J. Reprod Fertil.** 106: 259-268. 1996.
- [12] HANCOCK, J. L. The Ultrastructure of Mammalian Spermatozoa. In **Adv. Rep. Phys.** (1). A. McLaren (de.), London Logos. 1996.
- [13] JOUANNET, P.; DUCOT, B.; FENEUX, D.; SPIRA, A. Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples: 1. Study of sperm characteristics. **Int. J. Androl.**, 11: 379-374. 1988.
- [14] JONSHON, A.D.; GOMES, W.R.; VANDEMARK, N.L. **The Testis** (1). New York, Academic Press. 173 pp. 1970.
- [15] KOEFOED-JHONSEN, H.H.; PEDERSEN, H. Further observations on the Dag defect of the tail of the bull spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.** 26: 77-83. 1971.
- [16] KOEHLER, J.K.; PLATZ C.C.; WADDELL, W.; JONES, M.H.; BEHRNS, S. Semen parameters and electron microscope observations of spermatozoa of the red wolf, *Canis rufus*. **J. Reprod. Fertil.** 114 (1) 95-101. 1998.
- [17] KVIST, U. Spermatozoal thiol-disulphide interaction: a possible event underlying physiological sperm nuclear chromatin decondensation. **Acta Physiol. Scand.** 115: 503-505. 1982.
- [18] ROBERTS, J.S. Veterinary Obstetrics and Genital Diseases. In: **Theriogenology**. Ed. Edwards Brothers Inc. Ann Arbor, Michigan, U.S.A. 776 pp. 1971.
- [19] SCHIRREN, C.G.; HOLSTEIN, A.F.; SCHIRREN, C. Ueber die Morphogenese Rundkopfiger Spermatozoen des Menschen. **Andrologia** 3: 117. 1971.
- [20] SEIBEL, M.M.; ZILBERSTEIN, M. The diagnosis of male infertility by semen quality. **Hum. Reprod.** 10: 247-248. 1995.
- [21] SUKCHAROEN, N.; KEITH, J.; STEWART, D.; AITKEN, R. Predicting the fertilizing potential of human sperm suspensions in vitro: importance of sperm morphology and leukocyte contamination. **Fertil. Steril.** Vol. 63, 6: 1293-1300. 1995.
- [22] TAGEGNE, A.; DEMBARGA, Y.; KASSA, T.; FRANCESCHINI, R.R. Effect of plane nutrition and season on body and testicular growth and on semen characteristics in boran and boran x fresian bulls in Ethiopia. **Anim. Reprod. Sci.** 36: 197-209. 1994.
- [23] VOGLER, C.J.; BAME, J.H.; DEJANETTE, J.M.; MCGILLIARD, M.L.; SAACKE, K.G. Effects of elevated testicular temperature on morphology characteristics of ejaculated spermatozoa in the bovine. **Theriogenology.** 40:1207-129. 1993.
- [24] ZAMBONI, L. The ultrastructural pathology of the spermatozoon as a cause of infertility: the role of electron microscopy in the evaluation of semen quality. **Fertil. Steril.** 48: 711-734. 1987.