



CALLIGRUS

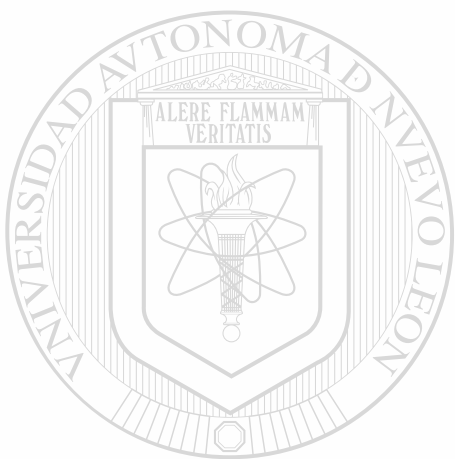
ALTERNACIONES PRODUCCIONES POOR
SEMIOL
EL ETILMETANO SULFONATO

TESIS

TM
Z6658
FM
1984
G3



1020127848



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



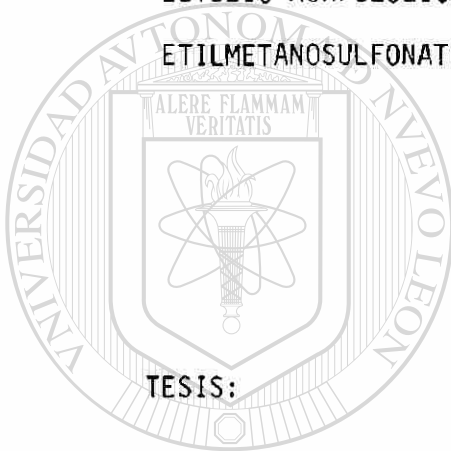
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

SUB-DIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

"ESTUDIO MORFOLOGICO DE LAS ALTERACIONES PRODUCIDAS POR EL
ETILMETANOSULFONATO, EN CELULAS ESPERMATOGENICAS DE RATON"



UANL

Que presenta la Dra. Guadalupe Gallegos de Lerma para

obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD

EN MORFOLOGIA.

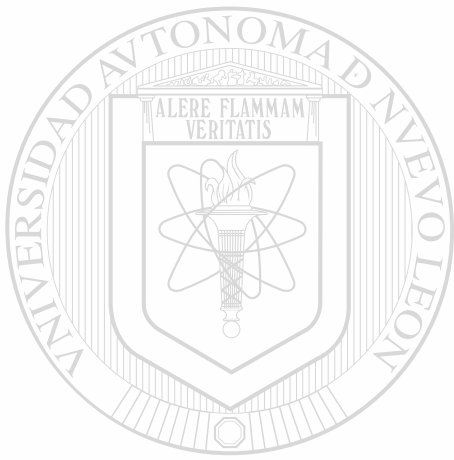
DIRECCION GENERAL DE BIBLIOTECAS

Monterrey, N.L.

20 de Junio de 1984.

TM
26658
FM
1984
G3

100161

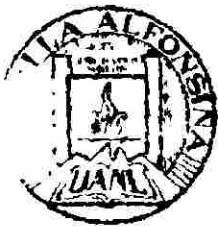


UANL

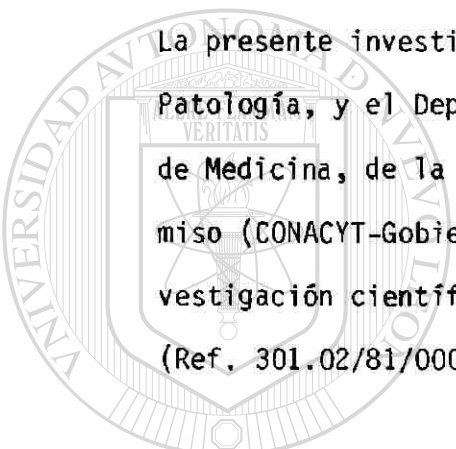
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



FONDO TESIS



La presente investigación fué realizada en el Departamento de -
Patología, y el Departamento de Ultraestructura de la Facultad
de Medicina, de la U.A.N.L. con el apoyo económico del Fideico
miso (CONACYT-Gobierno del Estado-U.A.N.L.), destinada a la in
vestigación científica de la Universidad Autónoma de Nuevo León.
(Ref. 301.02/81/00073).

Asesor: Q.F.B. Enrique Ramírez Bon

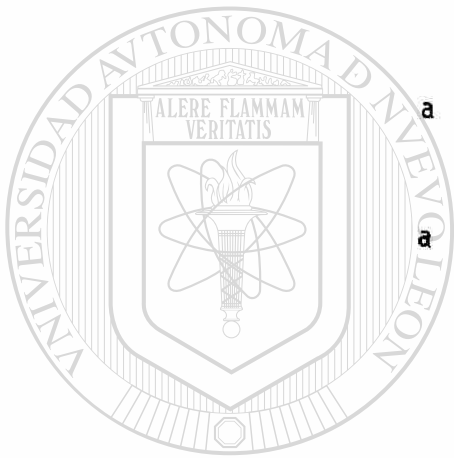
Co-Asesor: Dr. Sergio de la Garza

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Dedico este trabajo y

mi mejor esfuerzo de superación



a mi esposo: Ing. Fermín Lerma Romero

a mi hijo: Jorge Alberto Lerma Gallegos

UANL

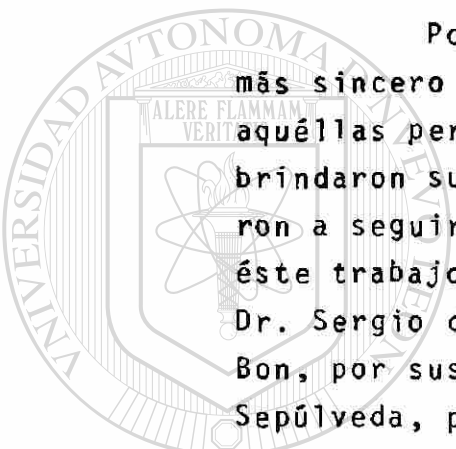
— y a la memoria de mi padre: —

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Sr. Eleuterio Gallegos Salinas



Por este medio deseo hacer patente, mi más sincero y profundo agradecimiento, a todas aquellas personas, maestros y compañeros, que me brindaron su apoyo desinteresado y me estimularon a seguir adelante durante el desarrollo de éste trabajo, y muy especialmente a mis asesores: Dr. Sergio de la Garza y Q.F.B. Enrique Ramírez Bon, por sus enseñanzas; así como al Dr. Julio Sepúlveda, por la lectura crítica a éste trabajo.

Debo reconocer que la presentación de ésta tesis ha sido posible solo gracias a la valiosa colaboración de personal profesional, técnicos y secretarías de ésta Facultad. Por éste motivo, manifiesto a todos ellos mi eterna gratitud.

INDICE DE CAPITULOS

<u>CAPITULO</u>	<u>PAGINA</u>
I.- INTRODUCCION	1
II.- ANTECEDENTES:	
A.- LA ESPERMATOGENESIS EN EL RATON	4
B.- ALTERACIONES PRODUCIDAS EN LA ESPERMATOGENESIS DEL RATON POR AGENTES FISICOS Y QUIMICOS	41
III.- MATERIAL Y METODOS	52
IV.- RESULTADOS:	
A.- INDUCCION DE ALTERACIONES EN LA FORMA DEL ESPERMATOZOI DE DE RATON POR ETILMETANOSULFONATO (EMS).	56
B.- ALTERACIONES PRESENTADAS EN EL EPITELIO SEMINIFERO DE RATONES TRATADOS CON EMS.	59
C.- ALTERACIONES ULTRAESTRUCTURALES EN LA ESPERMATOGENESIS DEL RATON INDUCIDAS POR EMS.	70.
V.- DISCUSION	87
VI.- RESUMEN Y CONCLUSIONES	94
VII.- PERSPECTIVAS	97
VIII.- BIBLIOGRAFIA	99

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

A.-	Espermatogonia A
AN.-	Anillo Nuclear
an.-	Anulo
B.-	Espermatogonia B
C.-	Centríolo
cc.-	Cuerpo cromatoide
CF.-	Canal flagelar
CR.-	Cuerpo residual
Dia.-	Espermatocito en diacinesis
Dipl.-	Espermatocito en diploteno
E.-	Espermátides (Estadio 1,2,.....16)
EN.-	Envoltura nuclear
ENR.-	Envoltura nuclear redundante
F.-	Flagelo
FI.-	Fosa de implantación
G.-	Aparato de Golgi
GA.-	Gránulo acrosómico
I.-	Espermatogonia intermedia
L.-	Espermatocito en leptoteno
LB.-	Lámina basal
M.-	Manchette
M-I.-	Metafase del espermatocito primario
mt.-	Microtúbulos
N.-	Núcleo
P.-	Espermatocito en paquiteno
PL.-	Espermatocito en preleptoteno
S.-	Célula de Sertoli
VA.-	Vesícula acrosomal
VS.-	Vesícula Sexual
Z.-	Espermatocito en zigoteno

I.- INTRODUCCION.-

La presente investigación morfológica, se relaciona con la Patología experimental específicamente con el área de Carcinogénesis, campo que ha tenido gran auge en los últimos años y se encamina hacia la detección - de agentes químicos ó físicos con acción carcinogénica para el hombre, e indaga sobre el mecanismo de acción de los carcinógenos.

Son los datos epidemiológicos los que han señalado con mayor certeza a los agentes carcinogénicos para el hombre (23, 83); sin embargo se requiere un largo tiempo para la evaluación de los efectos en varias generaciones de individuos, y solo pueden aplicarse a agentes a los que grandes poblaciones se encuentran expuestos (93).

Por este motivo, muchos investigadores (Ames 1973; Purchase 1976; Ashby 1977; Soares 1979; Zeeland 1983 entre otros), se han dedicado a la búsqueda de modelos experimentales, que permitan la detección de agentes de potencial acción carcinogénica para el hombre. La mayoría de ellos se realizan en sistemas in-vitro y en organismos situados a diversos niveles taxonómicos, por lo que la principal objeción que se puede poner a su validez, es la dificultad de extrapolación de sus resultados al hombre (22, 78).

Una clasificación de los principales modelos experimentales para la detección de agentes carcinogénicos se presenta en la Fig.1 (2,13, 14,22,45,49,89,93,102).

Entre las pruebas de carcinogénesis a corto plazo, en mamíferos "in-vivo" destaca el modelo propuesto por A.J. Wyrobeck (1975), en el que la elevación del porcentaje de espermatozoides de forma anormal, es indicativa del daño al material genético de las células espermatogénicas expuestas (10,57,97,98). Esta prueba ha resultado ser de gran utilidad, ya que su bajo costo y corta duración permite su aplicación a un gran número de agentes (98).

La prueba descrita por Wyrobeck, se ha enfocado a la detección del aumento en el número de formas anormales de los espermatozoides; - sin profundizar en los detalles estructurales de las células malformadas ni en los de las células predecesoras. En vista de esto, se propone que los cambios inducidos en la morfología de los espermatozoides del ratón, a consecuencia de la administración de agentes mutagénicos y/ó carcinogénicos, son anteceditos - por cambios en la espermatogénesis cuyo aspecto morfológico puede ser estudiado con microscopía de luz y electrónica. Ya que esos cambios no han sido suficientemente analizados, los objetivos de ésta investigación son:

- 1.- Describir los cambios morfológicos producidos por un agente mutagénico; el etil-metano-sulfonato, sobre el epitelio seminífero en el testículo del ratón.
- 2.- Identificar los cambios ultraestructurales que conducen a la producción de espermatozoides de forma anormal.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Fig. No.1 SISTEMAS EXPERIMENTALES PARA LA DETECCION DE AGENTES CARCINOGENICOS.

∞

SISTEMA UTILIZADO

I.- Inducción de Neoplasias en animales de experimentales.

Mamíferos, generalmente monos, perros ó ratones

PARAMETRO INDICADOR DEL EFECTO CARCINOGENICO.

Transformación neoplásica demostrada en la necropsia.

II.- Detección del daño causado al DNA, como mecanismo de acción carcinogénica.

-Cultivo de hepatocitos humanos normales.
-Cultivo de fibroblastos humanos normales.

Resistencia a la 6-Ouabafina

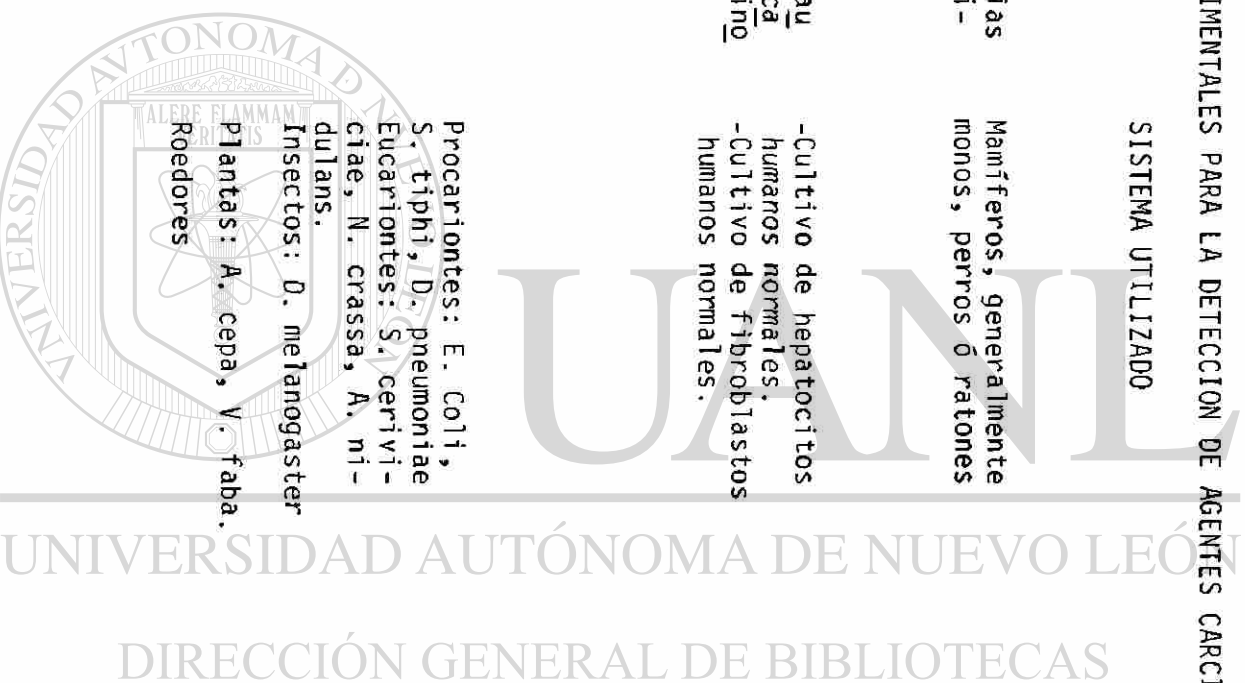
Síntesis de DNA no programada indicada por incorporación de Timidina tritiada.

III.- Detección del efecto mutagénico de los carcinógenos.

Procariontes: E. Coli, S. tiphi, D. pneumoniae
Eucariontes: S. cerviciae, N. crassa, A. nidulans.
Insectos: D. melanogaster
Plantas: A. cepa, V. faba.
Roedores

Cambios en el aspecto de las colonias.
Cambios en los requerimientos nutricionales.
Adquisición de resistencia a una droga.

Mutaciones letales dominantes
Clastogénesis: rupturas cromosómicas, intercambio de cromátides hermanas.
Micronúcleos en reticulocitos
Alteraciones en la forma del espermatozoide.



II.- ANTECEDENTES.

Dados los objetivos de ésta investigación, es necesario presentar en éste capítulo, primeramente una descripción de la espermatogénesis en el ratón, así como de las características morfológicas de las células espermatogénicas del Túbulo Seminífero en ésta especie. En segundo término se presentará, lo que en la bibliografía se reporta acerca de las alteraciones producidas a nivel del epitelio germinal masculino, en especial sobre las células espermatogénicas y los espermatozoides del ratón, por diversos agentes químicos y físicos.

A.- La Espermatogénesis en el Ratón.

La espermatogénesis en los mamíferos, es un proceso continuo de diferenciación celular, que comprende tres eventos principales: la proliferación y renovación de las espermatogonias, la meiosis y la espermiogénesis, que conducen a la formación de células altamente especializadas: los espermatozoides.

Este proceso constituye un sistema particularmente favorable para el estudio de los eventos de diferenciación celular, por conducir a un solo tipo de célula, ser altamente sincrónico y localizarse en un órgano específico, acompañándose de notables cambios en la estructura y composición química de éstas células (7).

La espermatogénesis se lleva a cabo en el testículo, que en el ratón se localiza en la región inguinal (66); la anatomía macroscópica y microscópica de esta glándula, así como su desarrollo embrionario han sido ampliamente descritas en varias especies (5,58,66), por este motivo nos enfocaremos a la descripción del epitelio seminífero en el ratón haciendo énfasis en la ultraestructura de las células espermatogénicas. Por último citaremos brevemente la síntesis de macromoléculas en la espermatogénesis, con la finalidad de explicarnos con bases moleculares, sus principales eventos morfológicos.

a).- Estructura del Túbulo Seminífero.

Los túbulos seminíferos constituyen la parte exócrina del testículo (5); cada túbulo está rodeado por una lámina propia ó limitante, que a su vez consta de dos hojas, interna y externa, con fibras de colágena dispuestas paralelamente al eje del túbulo e incluidas en una sustancia de moderada electrodensidad. Ambas hojas encierran una capa de células aplanadas con grumos densos de heterocromatina y agregados perinucleares de organelos citoplásmicos (29). Estas células se han descrito como células mioides ó contráctiles, por presentar características de células musculares lisas (5).

La población celular del epitelio germinal del túbulo seminífero, comprende dos líneas celulares: las células sustentaculares de Sertoli y las células espermatoogénicas. La organización y estructura del túbulo puede ser apreciada en la Fig.2.

La Célula de Sertoli es de forma piramidal, y se extiende desde la lámina propia hasta la luz del túbulo seminífero. Su parte principal descansa sobre la lámina propia y contiene al núcleo, claro y de nucléolo muy característico. La porción intermedia de ésta célula emite proyecciones citoplásmicas laterales entre las cuales quedan colocadas las células espermatoogénicas; finalmente sus proyecciones apicales encierran a los espermátides justo antes de que salgan a la luz del túbulo seminífero (5, 20).

La ultraestructura de la célula de Sertoli, se conoce bastante bien (5, 20, 28) y se ilustra esquemáticamente en la Fig.2. Los límites entre dos células de Sertoli adyacentes pueden distinguirse fácilmente por la presencia de especializaciones de unión, sobre todo en la región basal. Se trata de uniones estrechas modificadas, de gran resistencia, que alterran con uniones de nexo - (28,29,32,67).

En virtud de la presencia de tales uniones estrechas, la célula de Sertoli cumple además de las funciones tradicionalmente señaladas (soporte y nutrición de las células espermatoogénicas), con el establecimiento de la barrera hemato-

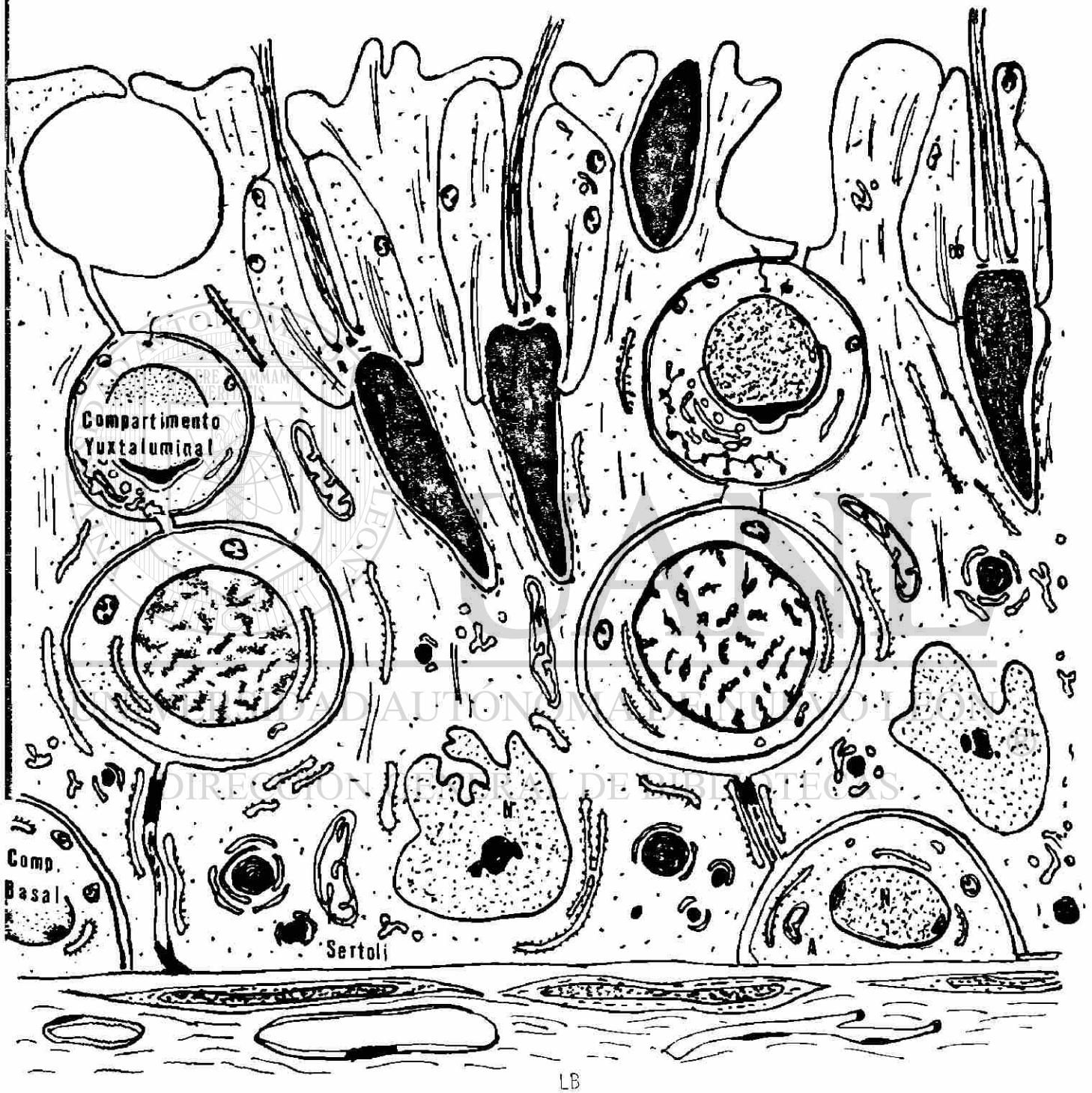


Fig. 2 Población celular del túbulo seminífero. Organización de los compartimentos basal y yuxtaluminal.

testicular y con la compartimentalización del túbulo seminífero, en vista de que impiden la llegada de muchas sustancias provenientes de la sangre a la luz del túbulo y de que se establece un compartimiento basal entre las uniones ocluyentes de la célula de Sertoli y la lámina propia, y un compartimiento luminal entre las mismas uniones y la luz del túbulo (5,20,29,73).

Las células que se sitúan en el compartimiento basal: espermatogonias y espermatocitos preleptoténicos, tienen acceso a las sustancias provenientes de la sangre, por la vía del tejido conectivo intersticial y los espacios intercelulares de la túnica propia; al parecer el proceso de renovación de células madres puede ocurrir independientemente de la célula de Sertoli (16, 20).

Cuando las células germinales del testículo inician la profase de la primera división meiótica, salen del compartimiento basal y entran al microambiente del compartimiento luminal, en donde no están expuestas directamente a las sustancias provenientes del plasma sanguíneo (20,58,73). Para alcanzar a las células germinales avanzadas tales materiales deben atravesar al citoplasma de la célula de Sertoli, en donde están sujetos a modificaciones (16), y parte del mismo quedará retenido en los cuerpos densos multiformes, del tipo de los lisosomas, para su ulterior degradación (73).

La profase meiótica y las dos divisiones de maduración, son procesos únicos en la gónada, que pueden requerir el ambiente especial provisto por los complejos de unión de la célula de Sertoli y la barrera hematotesticular (20).

Por otra parte, los fenómenos de expansión y retracción con pérdida del citoplasma apical, y reabsorción de espermatozoides involutivos y espermatogonias en degeneración, son otras modificaciones morfológicas que en las células de Sertoli acompañan a la espermatogénesis (58).

b) El Ciclo del Epitelio Seminífero.

El linaje del túbulo seminífero de los mamíferos, compuesto de espermatogonias, espermatocitos, espermátides y células de Sertoli, sufre una rígida y

ETAPA DEL CICLO	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
ESPERMATOGONIA	TIPO A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	INTERMADIA	In	In	In	In							
	TIPO B				B	B						
ESPERMATOCITO PRIMARIO	PRIMERA ETAPA					R	R	L	L	L	Z	Z
	SEGUNDA ETAPA	P	P	P	P	P	P	P	P	P	DIP	Dia M-I
ESPERMATOCITO SECUNDARIO												S M-II
	PRIMERA ETAPA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ESPERMATIDES	SEGUNDA ETAPA	13	14	14	15	15	16	16				12

FIG. 3 Asociaciones celulares características en cada etapa del ciclo del epitelio seminífero del ratón.

(OAKBERG 1955).

repetitiva serie de cambios, conocida como el Ciclo del Epitelio Seminífero - (7).

Clermont (1969). Define al ciclo del epitelio seminífero como "una serie completa de asociaciones celulares sucesivas que aparecen en una área dada de un túbulo seminífero". Las células espermatogénicas en diferentes etapas del desarrollo no se encuentran distribuidas al azar en el epitelio seminífero, sino que se presentan en una serie de asociaciones ó combinaciones bien definidas y fácilmente identificables (5, 12).

En el ratón, se han descrito 12 asociaciones celulares distintas, correspondientes cada una de ellas a las 12 etapas del ciclo del epitelio seminífero (68), y el aspecto de túbulo seminífero adyacentes varía de acuerdo a diferentes asociaciones celulares. Estas asociaciones celulares se muestran en la Fig. 3, y fueron propuestas por primera vez por Oakberg (1955) quien hizo una interpretación de la espermatogénesis en el ratón, basada en estudios de la espermiogénesis, en testículos irradiados y con la Técnica de Shiff con Acido Peryódico.

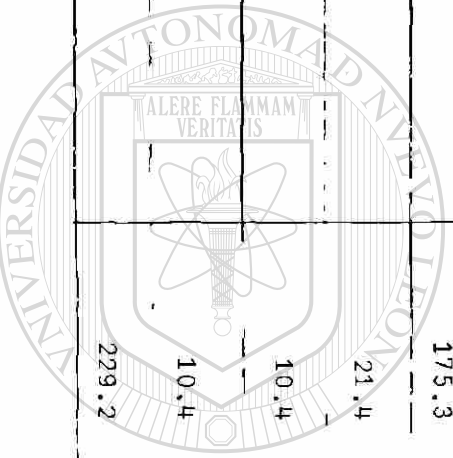
Las figuras 5, 6 y 7 muestran asociaciones celulares diferentes, vistas en cortes semifinos de túbulo seminífero de ratón.

Un ciclo del epitelio seminífero tiene una duración de 8.63 ± 0.26 días, y se requieren cuatro vueltas al ciclo para que una espermatogonia llegue a ser espermatozoide que se libera en la luz del túbulo seminífero; la duración total de la espermatogénesis es por lo tanto de 33.5 a 35.5 días (69). Estudios por captación de timidina tritiada y radioautografía, permitieron conocer la duración relativa de cada etapa del ciclo, basándose en observación de secciones transversas de túbulo seminífero, en las que la frecuencia de presentación de varias etapas, obtenidas del examen de un gran número de secciones es indicativo de su duración relativa en porcentaje (12). Sin embargo, ya que el ciclo es un proceso continuo, y sus etapas constituyentes son por-

FIG. 4 DURACION DE LA ESPERMATOGENESIS EN EL RATON

(OAKBERG 1957)

	DURACION (Hs)	Intervalo para alcanzar la forma madura del espermatozoide en el túbulo.	
		MINIMO (días)	MAXIMO (días)
ESPERMIO	Siempre presente		
Espermatogonia A		33.5	35.5
Espermatogonia intermedia	27.3	28.8	30
Espermatogonia B	29.4	27.6	28.6
Espermatocito Primario en reposo	31	26.3	27.6
Espermatocito Primario Leptoténico	31.2	25.3	26.3
Espermatocito Primario Zigoténico	37.5	23.4	25
Espermatocito Primario Paquítenico	175.3	16.1	23.4
Espermatocito Primario Diploténico	21.4	15.2	16.1
Diacinesis + metafase I	10.4	14.8	15.2
Espermatocito Secundario	10.4	14.4	14.8
Espermátides	229.2	0	14.4

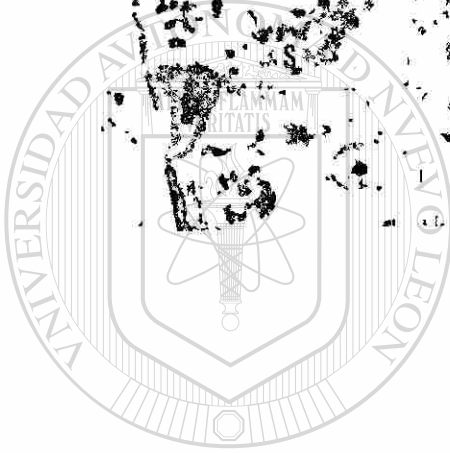


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECA



Etapa II del ciclo del epitelio seminífero: Se observan espermátocitos paquiténicos, espermátides en fase de Golgi, y una generación más avanzada de espermátides alargados en maduración (estadio 13), incluidos en el citoplasma de la célula de Sertoli. Se señala la lámina basal. (Objetivo 40X)

Figura No. 5

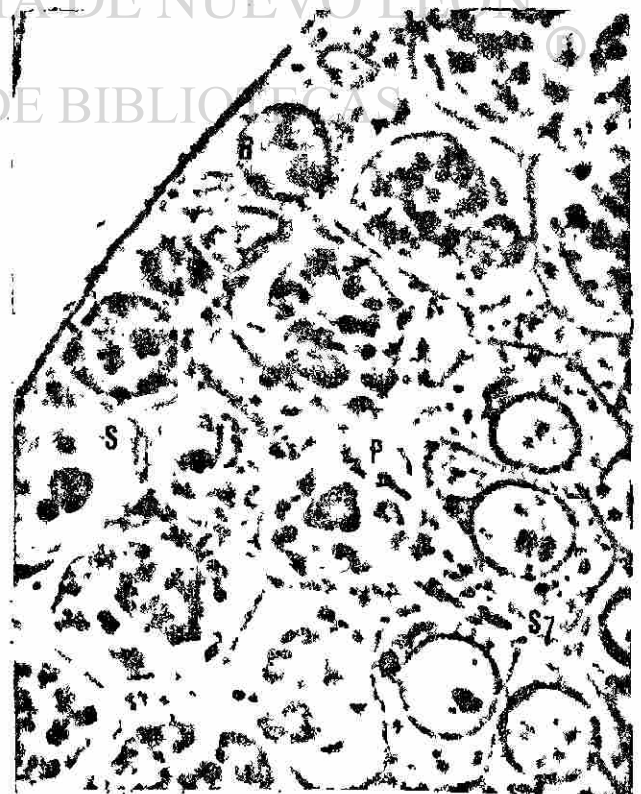


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Etapa VII del ciclo del epitelio seminífero del ratón. Se observan la lámina basal circundante, espermátogonias B, dos filas de espermátocitos paquiténicos y espermátides en fase de casquete. (Objetivo 100X).

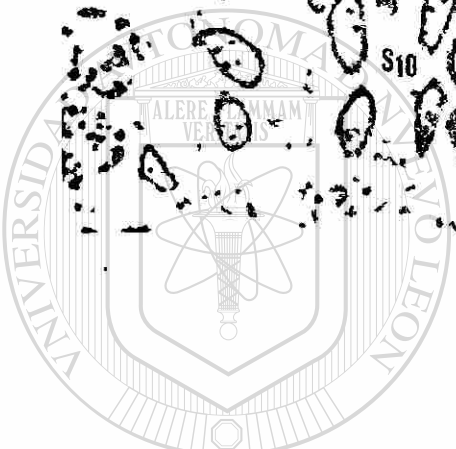
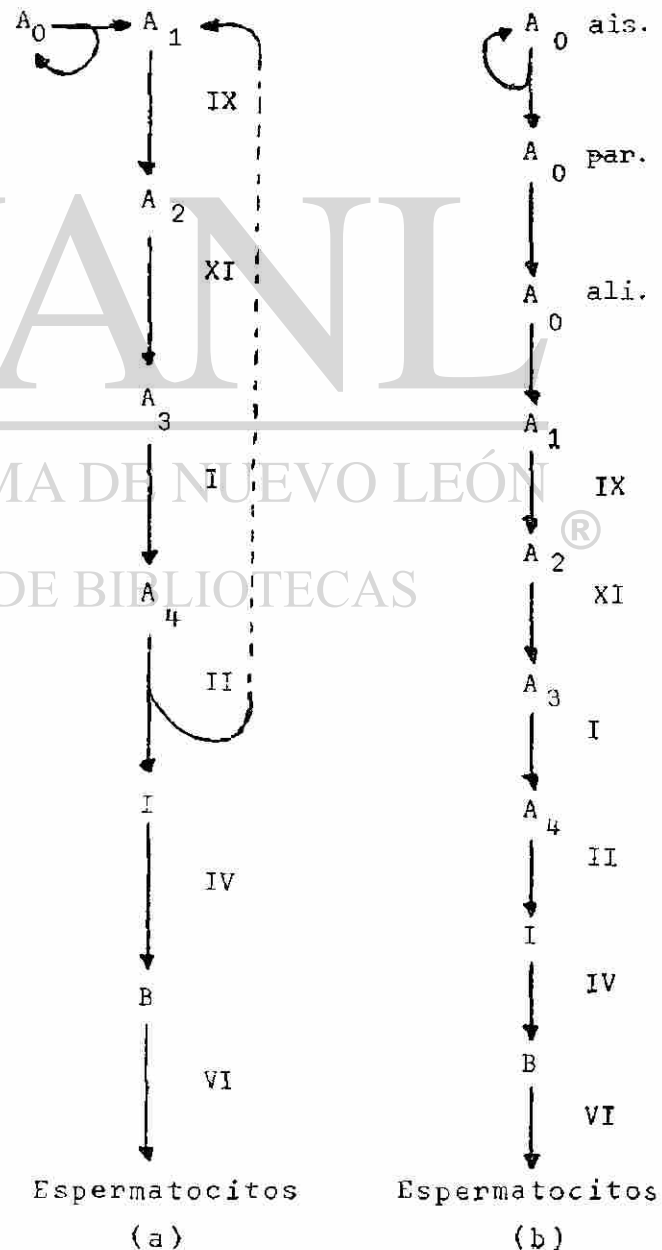
Figura No. 6





Etapa IX. del ciclo del epitelio seminífero del ratón. Se observan espermatozoides leptoténicos, zigoténicos, paquiténicos y espermátides en elongación. Sobre la lámina basal se observan los núcleos de algunas células de Sertoli. (Objetivo 40X).

Figura No. 7



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

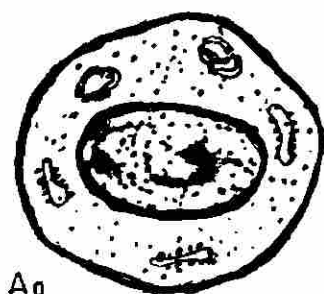
Esquema que representa los modelos de renovación de espermatozoides en el ratón; propuestas por Bustos Obregon, 1968 (a) y Luckins, 1971 (b), modificados de acuerdo a Oackberg, 1956. (Ver explicación en el texto). Los números romanos indican las etapas del ciclo en que se dividen las células.

Figura No. 8

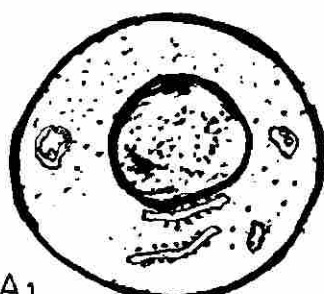
ratón prepuberal (4). Las espermatogonias A, miden unas 12 micras de diámetro, presentan una cromatina nuclear homogénea y nucléolos múltiples y reticulados cerca de la envoltura nuclear. El citoplasma es escaso, finamente granular, pobre en retículo endoplásmico y pequeñas mitocondrias ovoides ó esféricas vesiculares. Las espermatogonias B, son vistas con más frecuencia y tienen un diámetro de 8 a 9 micras. El núcleo presenta mayor cantidad de heterocromatina en masas centrales y un fino borde de heterocromatina alrededor de la membrana nuclear (29); el nucléolo simple y reticulado es visto cerca del centro del núcleo (4). El citoplasma y los organelos son similares a los descritos para las espermatogonias A (5).

A pesar de varias investigaciones la forma exacta de renovación de las espermatogonias A en roedores, aún no se define bien, y prevalecen dos puntos de vista diferentes. Uno propuesto por Clermont y Bustos Obregón (1968), sugiere la presencia de dos grandes categorías de espermatogonias A: las "células madres reserva" ó tipo A_0 y las "células madres en renovación" ó tipo A_1 a A_4 . El tipo A_0 corresponde a espermatogonias A aisladas ó por pares, de bajo índice mitótico (0.19) que aunque se encuentran presentes en todas las etapas del ciclo, solo esporádicamente contribuyen a la formación de nuevas espermatogonias. Los tipos A_1 a A_4 son más numerosos, forman grupos lineales a lo largo de la membrana limitante del túbulo, y se dividen durante el ciclo para aumentar su número y renovarse así mismas. Según este modelo las espermatogonias A e I provienen de las espermatogonias A_4 .

El segundo modelo, propuesto por Huckins y Oakberg (1971) considera a las espermatogonias A_0 , responsables de la renovación y a los tipos A_1 a A_4 , así como las espermatogonias I y B, células en diferenciación. Estos dos modelos de renovación se presentan en esquema de la Fig. 8, tomado de Bratmaska y Clermont (1983), cuyos recientes estudios concuerdan con el primero de los modelos que hemos descrito.

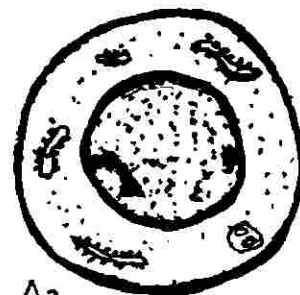


A₀



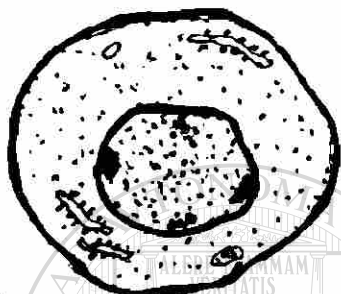
A₁

(VII-IX)



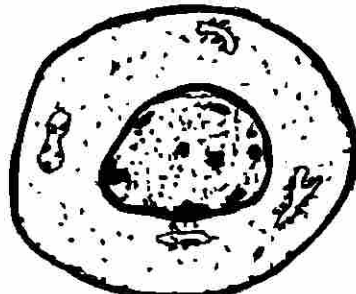
A₂

(IX-XI)



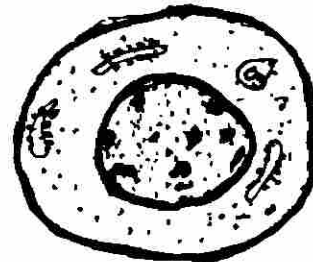
A₃

(XI-I)

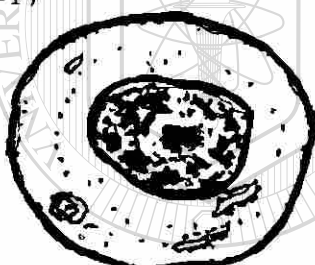


A₄

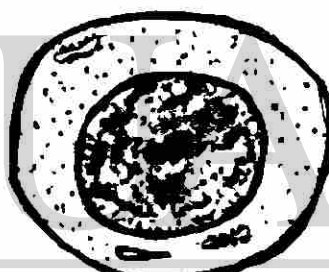
(I-II)



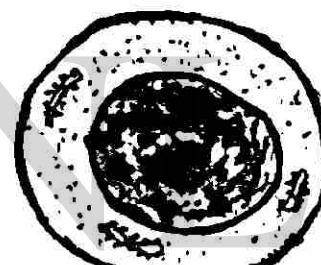
I



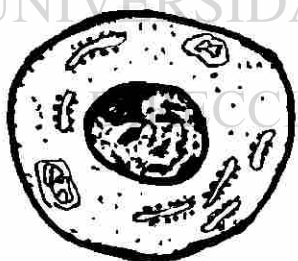
B



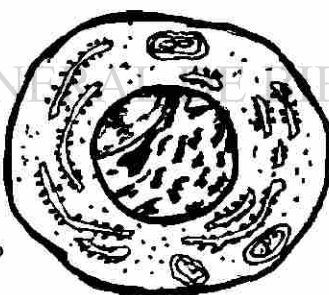
PL



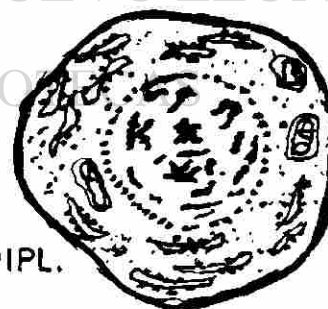
L



Z



P



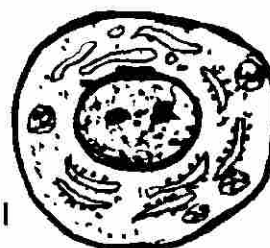
DIPL.



DIA



M-I



II

FIG.9 MORFOLOGIA DE ESPERMATOGONIAS Y ESPERMATOCITOS

A pesar de que no puede hacerse una clara distinción entre los diferentes tipos de espermatogonias A, basándose en los datos aportados por varios autores (4,36,70) se presentan esquemáticamente en la Fig. 9. Las diferencias morfológicas son mínimas y referentes sobre todo a la tinción nuclear, la presencia y tamaño del núcleo, y la cantidad y localización de pequeñas masas de heterocromatina. La identificación del tipo de espermatogonia A_1 a A_4 se hace sobre todo por la etapa del ciclo en la que se presentan (indicados con números romanos en la Fig. 9).

d) Meiosis: Morfología de los Espermatocitos.

Como resultado de una serie de divisiones mitóticas y fenómenos de diferenciación celular, las espermatogonias producen un sincitio de espermatocitos primarios (24), los cuales entran juntos a la fase final de síntesis de DNA y después de un período de crecimiento celular, inician el proceso de meiosis (7).

La meiosis es una forma de división celular, cuyas finalidades son: reducir a la mitad el número de cromosomas de una célula, es decir producir la condición haploide en las células hijas, y permitir el intercambio del material genético (82). Esto se logra a través de dos divisiones: La meiosis I que culmina con la formación de los Espermatocitos Secundarios, que entran rápidamente a la Meiosis II para formar espermátides (4,52,82).

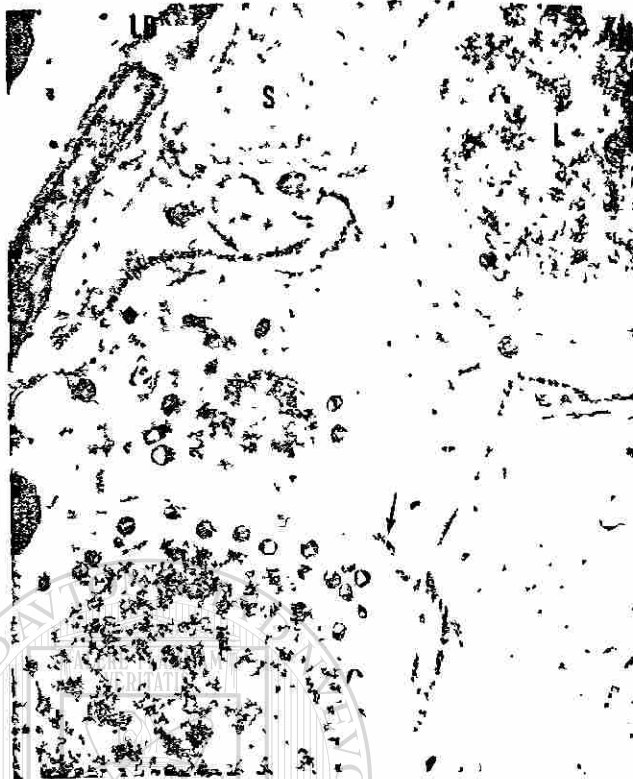
La profase de la meiosis I, es marcadamente larga, e incluye las etapas de Leptoteno, Zigoteno, Paquíteno, Diploteno y Diacinesis. Los principales eventos que acontecen en ella son el apareamiento de los cromosomas homólogos y el intercambio de segmentos de sus cromátides (4,82).

La siguiente descripción morfológica de los espermatocitos está basada esencialmente en los trabajos de Gardner (1964) y Bellvé (1977). Los espermatocitos primarios en etapa de preleptoteno y leptoteno están presentes en el ratón a los 10 días después del nacimiento; en ratones adultos son observables

en las etapas IX, X y XI temprana del ciclo del epitelio seminífero (4). Los espermatoцитos preleptoténicos son los más pequeños de las células germinales, miden 7.5 a 8.2 micras de diámetro y están separados de la membrana basal por procesos citoplásmicos de la célula de Sertoli. Areas localizadas de heterocromatina se presentan esparcidas en el núcleo y ocasionalmente cerca de la membrana nuclear. La cromatina restante está dispersa en forma homogénea pero es más densamente granular que en las espermatogonias tipo B (Fig. 9).

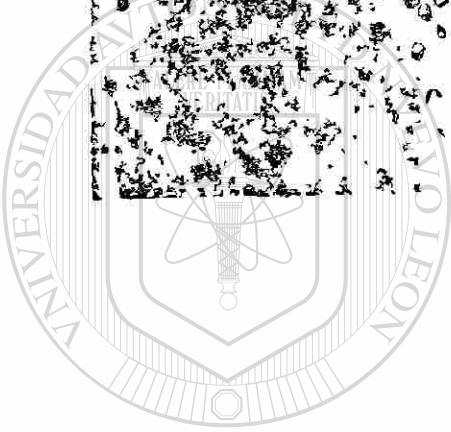
Característicamente el preleptoteno contiene una cantidad limitada de citoplasma. El Leptoteno se caracteriza por la aparición de finos filamentos longitudinales en el núcleo que representan el inicio de la formación de los cromosomas. En otras áreas la cromatina de los espermatoцитos leptoténicos es homogénea y granular y la cromatina condensada vista en preleptoteno empieza a comprimirse sobre la envoltura nuclear. Frecuentemente se observan fragmentos de nucleonema. Estas células tienen un diámetro de 8 a 10 micras y son similares en tamaño a las Espermatogonias B (Figs. 9 y 10).

Los Espermatoцитos primarios zigoténicos se observan por primera vez hacia el día 12 después del nacimiento y una vez establecido el ciclo de la espermatogénesis del ratón adulto, se presentan en las etapas XI y XII temprana (68). Se caracterizan morfológicamente por la presencia de segmentos cortos de complejos sinaptonémicos. La condensación de los cromosomas X y Y forma la "vesícula sexual" que también se inicia en ésta etapa de la profase meiótica. Un nucléolo reticulado se observa situado tangencialmente ó en la vecindad de la vesícula sexual. Estas células tienen un diámetro de 10 a 12 micras y son por lo tanto mayores que los espermatoцитos preleptoténicos. El citoplasma contiene cantidades crecientes de retículo endoplásmico rugoso en pilas de cisternas estrechas. Las mitocondrias se vuelven más alargadas con unas pocas crestas difatadas (Figs. 9 y 11). La transición de zigoteno a paquiteno es gradual; los autosomas están ahora apareados por los Complejos Sinaptonémi-



Microfotografía electrónica en la que se observan espermatoцитos leptoténicos en el compartimiento yuxtaluminal del túbulo seminífero, separadas de la lámina basal por el citoplasma de una célula de Sertoli. Complejos de unión entre las células de Sertoli adyacentes, están señalados con flechas. (b, 600 X)

Figura No. 10



UANL

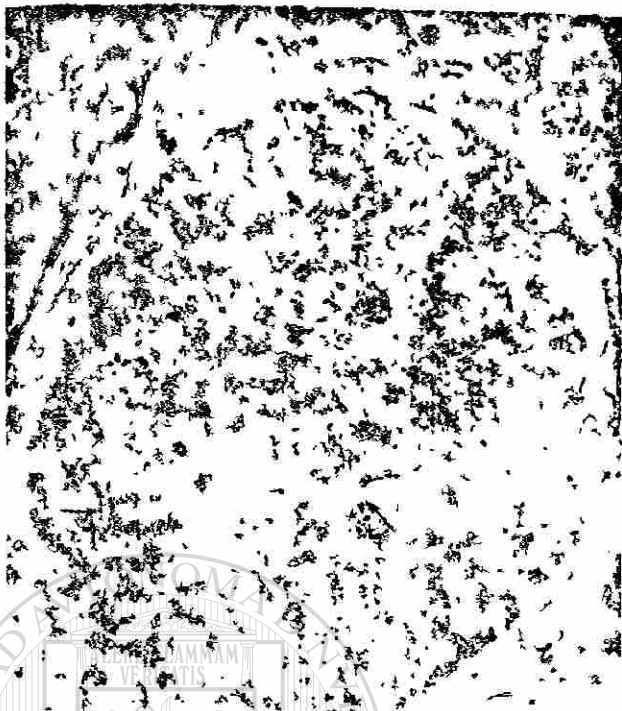
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Espermatoцитo zigoténico de la profase meiótica I. La cromatina empieza a condensarse; pequeñas porciones de material electrodensito están en relación a la vesícula sexual. El citoplasma es muy abundante y contiene mitocondrias vesiculosas y una gran cantidad de pequeñas vesículas membranosas. (5, 700 X)



Figura No. 11



Espermatocito primario paquiténico. El núcleo presenta grumos más gruesos de heterocromatina y se observan los complejos sinaptonémicos (flechas), así como la envoltura nuclear. En el citoplasma, que es menos abundante que en etapas anteriores, se observan mitocondrias y cisternas de retículo endoplásmico rugoso. (8, 700 X)

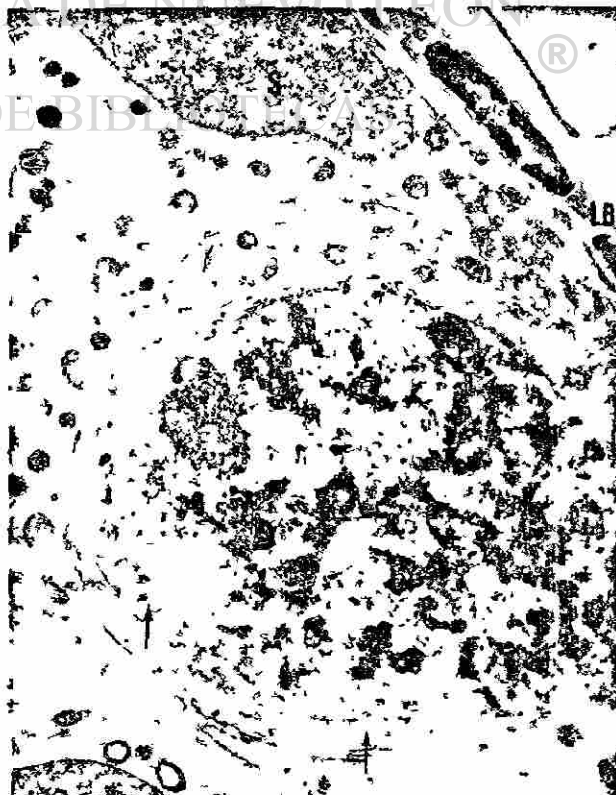
Figura No. 12

Espermatocito primario diploténico.

En el núcleo se observan segmentos de cromatina muy condensada que corresponden a los cromosomas. La vesícula sexual está asociada a la envoltura nuclear, que en algunos sitios ha desaparecido (flechas). Aún se observa material nucleolar. El citoplasma es muy escaso, presenta mitocondrias y una red muy extensa de cisternas membranosas, que se continúa con la cisterna perinuclear. Se señalan la lámina basal y la célula de Sertoli.

(9,000 X)

Figura No. 13



En la Diacinesis el proceso de "terminalización, por el que los sitios de unión entre los cromosomas anteriormente apareados se desplazan a los extremos, es lo más prominente, además de la desaparición de la envoltura nuclear. (82)

En la Anafase I los centrómeros de cada par homólogo se desplazan hacia los polos opuestos del espermatocito, arrastrando con ellos ambos cromátides (82).

Espermatocitos en Diacinesis pueden ser vistos en la etapa XII del ciclo del epitelio seminífero del ratón, al igual que metafases de espermatocitos primarios, espermatocitos secundarios y metafases meióticas II (68) Figs. 9, 14, 15.

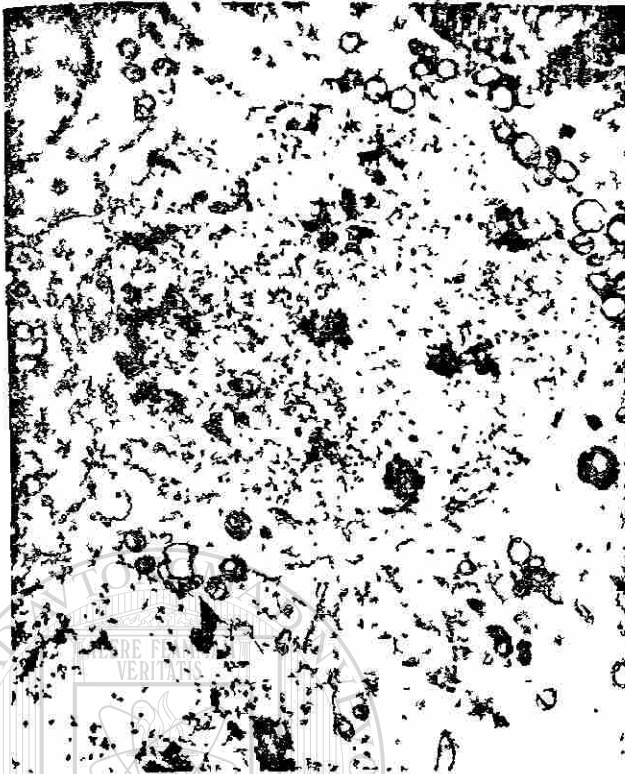
Los estudios ultraestructurales, confirman la escasez de Espermatocitos Secundarios; que tienden a ser más pequeños que los espermatocitos primarios tardíos; su núcleo es esférico con agregados de sustancia cromatínica centralmente localizados. Las mitocondrias muestran similitud a las de los espermátides; grandes magnificaciones muestran que las paredes engrosadas de las mitocondrias es debida a crestas que se disponen paralelamente a la membrana externa (29). En general existe poca información respecto a la morfología del espermatocito secundario; en la bibliografía disponible no se encontraron más detalles de su ultraestructura.

e) Espermiogénesis.

La espermiogénesis, fase final de la espermatogénesis, consiste en una compleja transformación morfológica de la células germinal haploide que culmina con la salida de espermatozoides maduros a la luz del túbulo seminífero.

Aunque los fenómenos generales de la espermiogénesis pueden seguirse con el microscopio óptico, los detalles más finos y exactos han sido estudiados con microscopía electrónica.

Los cambios morfológicos que conducen a la formación de espermatozoides



Espermatocito primario en la etapa de la Diacinesis de la profase meiótica I. Aún se observa la envoltura nuclear, aunque el nucléolo y la vesícula sexual no se aprecian en ésta sección. La condensación del material cromatínico es mayor. El escaso citoplasma presenta los organelos ya descritos.

(6, 600 X)

Figura No. 14

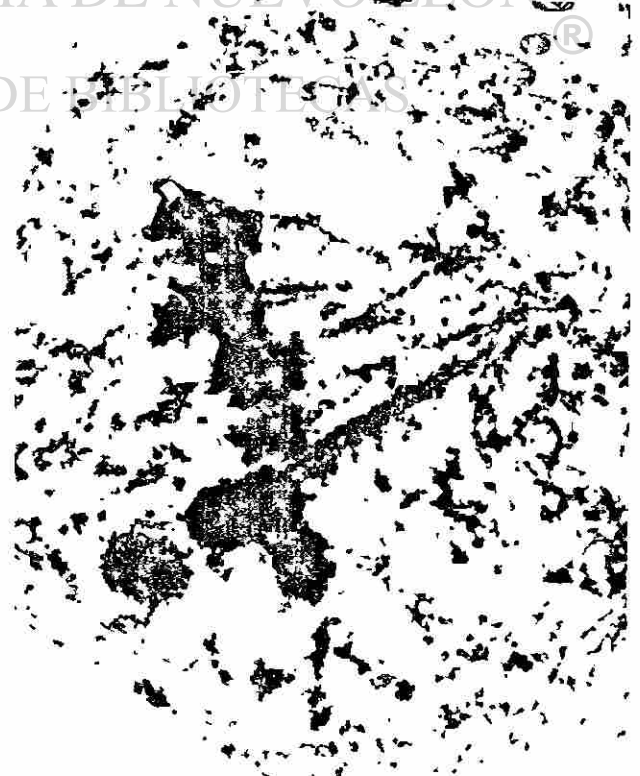
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Espermatocito primario durante la metafase de la primera división meiótica. Los cromosomas se encuentran alineados en el ecuador de la célula.

(8, 900 X)

Figura No. 15



quedan comprendidos en cuatro grandes fases ó etapas: la Fase de Golgi, la Fase de Casquete, la Fase Acrosomal y la Fase de Maduración (5), que en el ratón incluyen 16 estadios diferentes, descritos en base a cambios acrosomales y nucleares (68), observables en cortes de 5 micras de grosor, de tejido testicular fijado en Zencker-Formol y teñidos con PA-Schiff.

Estudios con microscopía electrónica, analizando los cambios ultraestructurales comprendidos en este proceso de diferenciación celular han sido reportados por diversos autores (13,15,25,30,41,43,80,85,86,100 y 101).

A continuación presentamos una descripción de los principales eventos en cada etapa, que se ilustran esquemáticamente en la Fig. 16.

Fase de Golgi.- Se inicia con la aparición de espermátides redondos ó poliédricos que resultan de la división de los espermatoцитos secundarios, (estadio 1), los cuáles pueden ser identificados con certeza, cuando uno ó más gránulos pequeños se aprecian en el interior de los sáculos del Aparato de Golgi de posición yuxtannuclear (estadio 2). Generalmente se trata de dos ó tres gránulos limitados por una membrana de Golgi; éstos gránulos se tiñen con el reactivo de Schiff y su contenido es rico en carbohidratos (5,30,68). La fusión de los gránulos proacrosómicos en un gran gránulo adyacente al núcleo, marca el inicio de la etapa 3; el gránulo acrosómico queda contenido en una gran vesícula limitada por una membrana que se adhiere a la envoltura nuclear en el estadio 4, - Figs. 17 y 18. El punto de adherencia marca la futura punta anterior del espermatozoide.

Durante la Fase de Golgi el núcleo es esférico, grande y claro, con un carioplasma finamente particulado, de electrodensidad moderada; es común ver uno ó más grumos de heterocromatina (30). La evolución del retículo endoplásmico en la espermiogénesis fué descrita por Clermont (1978); en la Fig. 21 se ilustra su disposición en etapa de casquete; se ha propuesto que la continuidad del retículo endoplásmico a través de los puentes intercelulares pueda con

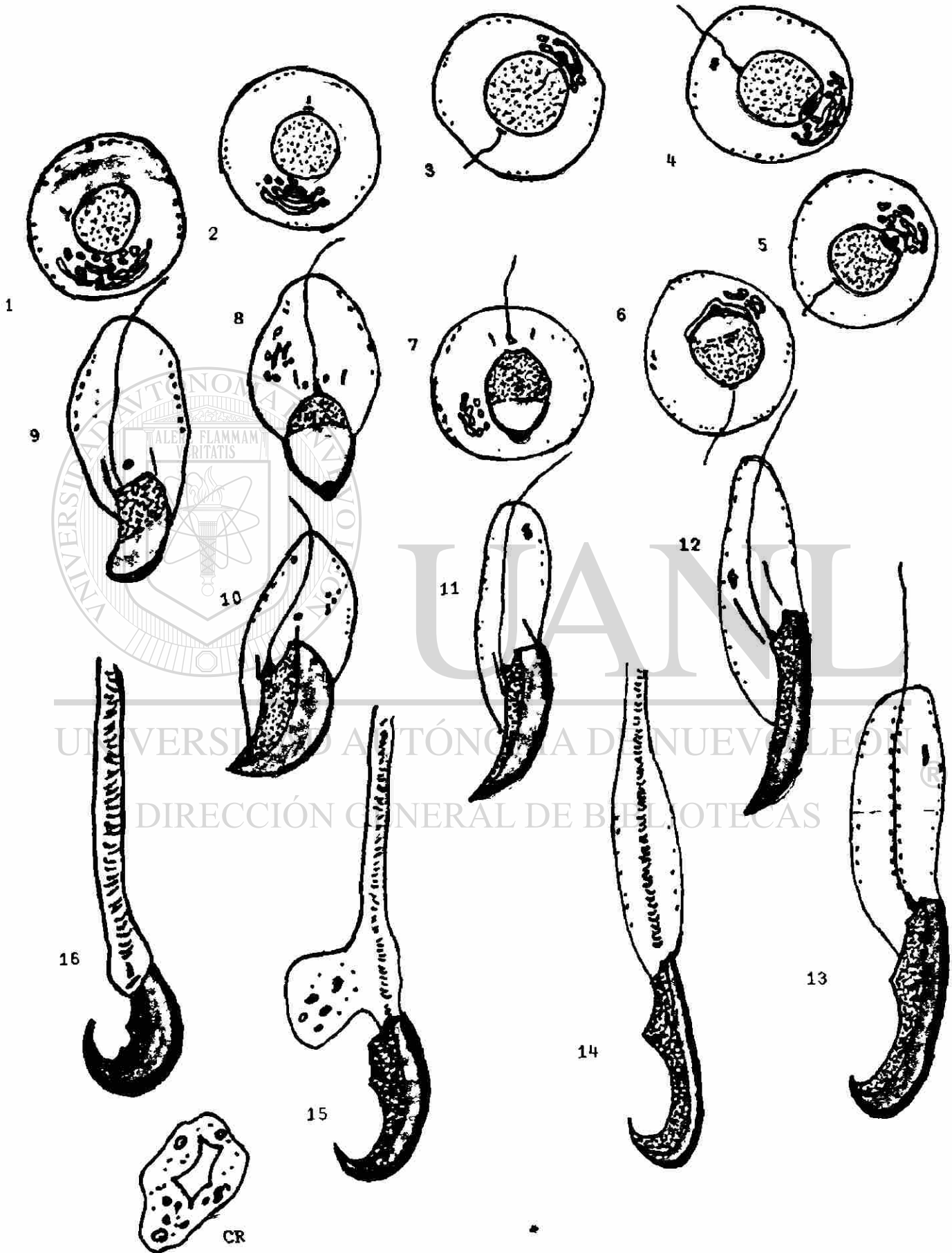
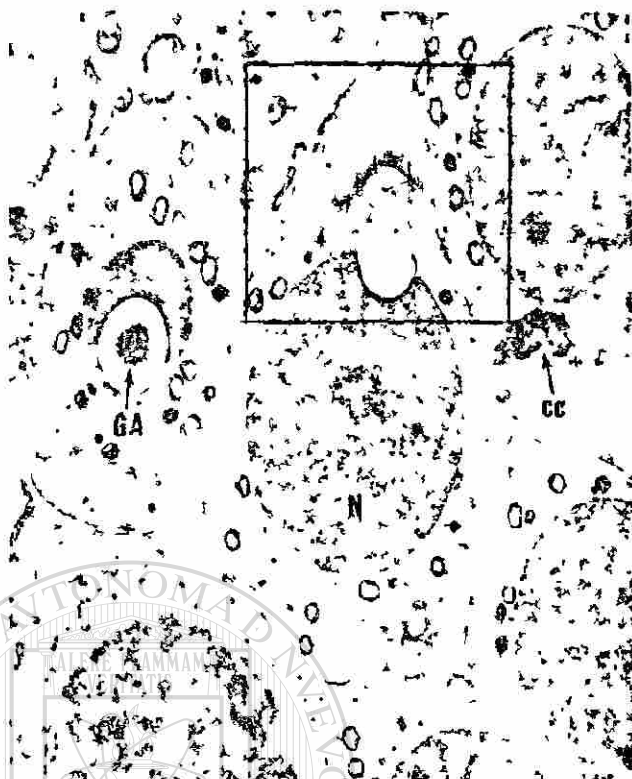


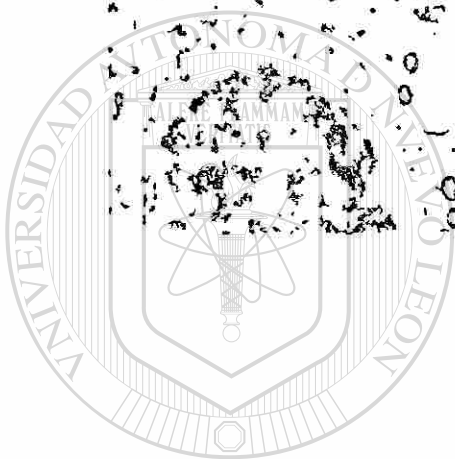
Fig. 16. Espermiogénesis en el ratón.



Espermátide en fase de Golgi. El núcleo presenta una cromatina finamente granular, y algunos grumos densos centrales. El citoplasma es abundante, con numerosas mitocondrias vesiculosas de paredes engrosadas. El aparato de Golgi y la vesícula acrosómica observan en el polo anterior de la célula. En una de las células se observa el gránulo acrosómico y en otra el cuerpo cromatoide.

(3, 600 X)

Figura No. 17



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Extremo anterior de un espermátide en fase de Golgi (aumento de la región - indicada en la Fig. anterior). Pequeñas vesículas se desprenden de la cara de maduración del Golgi y se dirigen hacia la vesícula acrosomal a la que se fusionan agregándole su contenido. La envoltura nuclear aparece en grosada en el sitio donde la vesícula acrosomal se adhiere a ella, se señala con flechas.

(7, 300 X)

Figura No. 18



tribuir a la sincronización del proceso de diferenciación del espermátide. (94) Las mitocondrias tienden a localizarse periféricamente (41), y grandes magni-
ficaciones permiten observar dilatados espacios intracrísticos, que a baja -
magnificación dan el aspecto de mitocondrias vacuoladas. En muchos casos las -
crestas se disponen paralelamente a la superficie mitocondrial (30). En el
citoplasma yuxtannuclear presenta además un corpúsculo densamente teñido y de
forma irregular, que ha sido llamado cuerpo cromatoide (76), Fig. 17.

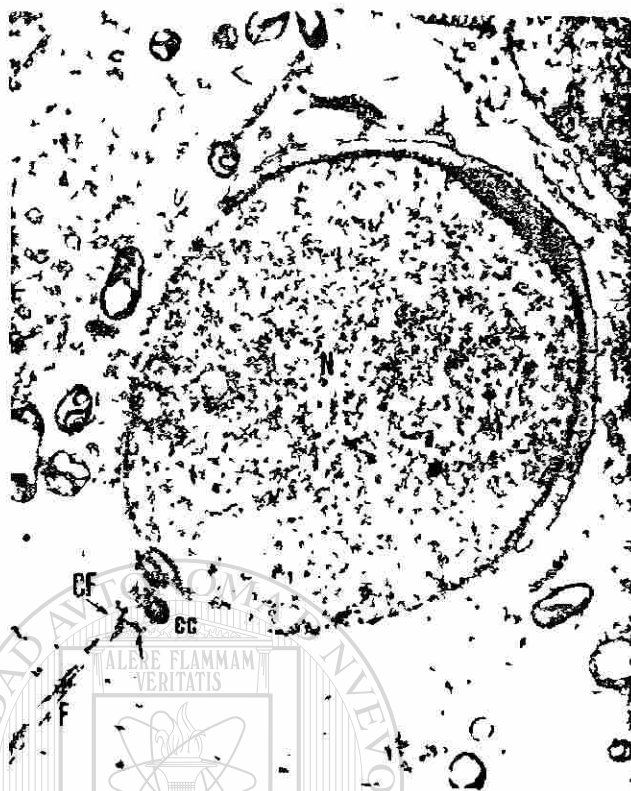
Fase de Casquete.- La membrana limitante de la vesícula acrosómica aumenta su
zona de adherencia a la envoltura nuclear, formando un delgado pliegue que se
extiende sobre el polo del núcleo para recubrir todo su hemisferio anterior -
como un casquete cefálico membranoso (estadio 5). Mientras tanto el gránulo -
acrosómico permanece localizado en el polo anterior del núcleo (5). El Apa-
rato de Golgi es substituido completamente por vesículas, las más grandes de
las cuales se encuentran cerca de la vesícula acrosomal y se fusionan a ella
(30), Figs. 19 y 20.

En el citoplasma los centriolos se desplazan al polo abacrosomal del nú-
cleo, donde uno de ellos se dispone perpendicularmente a la superficie celular
y produce un flagelo, el cual crece en una estrecha hendidura extracelular -
que hay entre el espermátide redondo ó poliédrico y la célula de Sertoli adya-
cente (25), Figs. 21 y 22. El cuerpo cromatoide emigra ligeramente hacia el
polo centriolar y las mitocondrias continúan en posición periférica. (13)

La fase de casquete corresponde a los estadios 5, 6 y 7 de la espermiogé-
nesis en el ratón (Fig. 3).

Fase Acrosomal.- Se inicia en el estadio 8 de la espermiogénesis del ratón,
cuando los espermátides jóvenes se orientan a sí mismos con el sistema acrosó-
mico hacia la membrana basal y la elongación del núcleo comienza (68).

Durante esta fase se constituye el acrosoma, estructura limitada por una
membrana que ha sido comparada a un lisosoma, por su contenido rico en carbo-



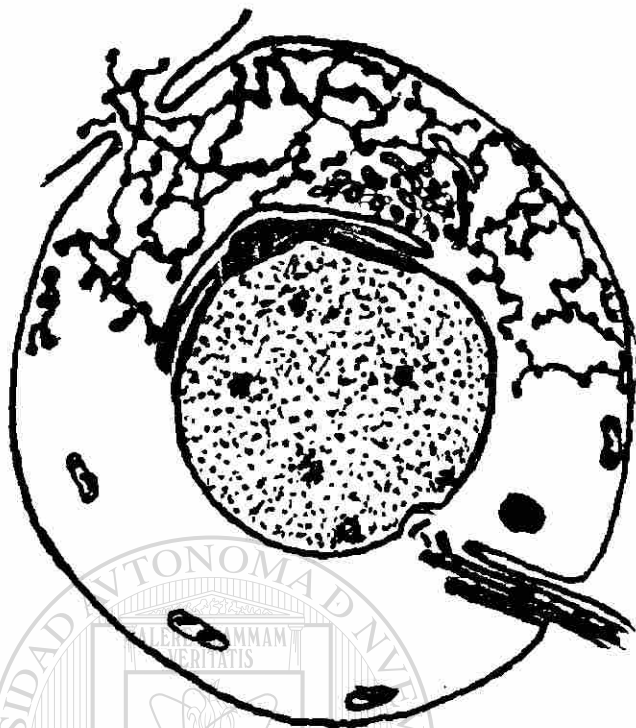
Espermátide en fase de casquete. La envoltura nuclear subyacente al casquete membranoso está engrosada al igual que en la fosa de implantación. En éste sitio se observan el par de centriolos, el annulus (flecha) y el cuerpo cromatoide en relación con el flagelo en formación. El citoplasma es abundante y contiene las mitocondrias ya descritas y gran cantidad de vesículas revestidas por una unidad de membrana, de contenido electrodenso. Se observa también el canal flagelar. (4,300 X).

Figura 19

Espermátide en fase de casquete. El núcleo muestra un agregado electrodenso de cromatina. En el extremo anterior del casquete se observa el gránulo acrosómico, cuyo material empieza a distribuirse en el interior de esta estructura. En el citoplasma vecino el aparato de Golgi se encuentra en posición lateral al casquete. En el extremo posterior del acrosoma, entre éste y la envoltura nuclear, el citoplasma muestra mayor densidad. (6,600 X).

Figura 20





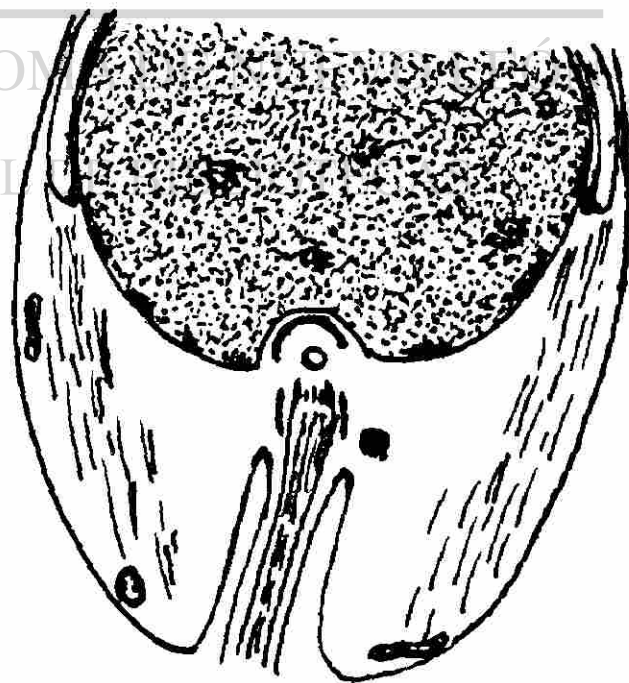
Dibujo esquemático en el que se observa un espermátide en fase de casquete. El retículo endoplásmico se dispone en una red tridimensional de túbulos y esférulas conectadas entre sí, carentes de ribosomas. Se extiende sobre la superficie convexa del Aparato de Golgi, y delinea la membrana continuándose a las células vecinas a través de los puentes intercelulares. (Clermont 1978).

F i g u r a No. 21

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA

Dibujo esquemático de un espermátide en fase de acrosomal. Se ilustra la posición del manchette en relación con el anillo nuclear. El citoplasma se desplaza caudalmente, para circundar la porción proximal del flagelo, constituyendo el canal flagelar; éste es abierto en su extremo posterior, mientras que en el anterior se invagina y refleja sobre el flagelo. (Clermont 1978).



F i g u r a No. 22

hidratos y enzimas hidrolíticas (5). El acrosoma presenta una subestructura ordenada y característica, al parecer debido a la distribución específica por regiones, de las enzimas que contiene, en arreglos paracrystalinos (77). Aunque se encuentra presente en todos los mamíferos, el acrosoma varía de forma y tamaño según la especie (5).

En el ratón la Fase Acrosomal corresponde a los estadios 8, 9, 10 y 11 de la espermiogénesis (68), y durante ella el sistema acrosomal se extiende para cubrir la superficie dorsal y apical del núcleo y su superficie externa se aplica estrechamente a la membrana plasmática (30), Figs. 11 y 12.

En el núcleo, la cromatina se condensa formando grumos densamente empaquetados; por modificaciones en su forma el núcleo empieza a aplanarse, y deja de ser redondo para volverse primero ovoide y luego estrecharse en su extremo anterior alargándose y adquiriendo su extremo posterior una forma angulada (68), Figs. 23 y 24.

Simultáneamente a los dos eventos anteriores, se presenta un alargamiento del espermátide. Cuando la condensación de la cromatina se inicia aparecen numerosos microtúbulos que se asocian lateralmente circundando al extremo caudal del núcleo (25,43,62,80), Fig. 22. Se trata de un organelo transitorio, el Manchette ó Vaina Caudal, cuya formación parece iniciarse en el espermátide redondo ó poliédrico, el cual contiene muchos microtúbulos que predominan en el extremo caudal del núcleo y se extienden por todo el citoplasma (estadio 7), Figs. 23 y 24, y en el que el margen posterior del casquete acrosomal está cubierto por una banda electrodensa aplanada: depósito de material fibroso - electrodense en su lado citoplásmico que circunda al núcleo y recibe el nombre de anillo nuclear (5,80), Fig. 24. En relación con ésta estructura los elementos microtubulares del manchette son rápidamente polimerizados y se extienden caudalmente hacia el citoplasma de la pieza del cuello en formación. Inicialmente los microtúbulos del manchette tienen un trayecto oblicuo siguiendo el contorno del núcleo, desde el anillo nuclear a la base del flagelo, pero su



Micrografía electrónica de un espermátide en fase acrosomal. El citoplasma del polo anterior ha sido desplazado caudalmente, y la membrana acrosomal externa está adherida a la membrana citoplásmica. El núcleo es más alargado, y se observan masas de heterocromatina en la periferia.
(15, 000 X)

Figura No. 23



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Espermátide en fase acrosomal. La elongación del núcleo es más evidente, y su extremo anterior es de forma cuadrada. La cromatina condensada en la periferia es más abundante; en el extremo caudal del núcleo se observa la fosa de implantación y los elementos propios del cuello en formación. En el citoplasma se ven claramente los microtúbulos del manchete de trayecto recto. Se observan también el cuerpo cromatóide, una porción del canal flagelar y del flagelo.

(6750 X)

Figura No. 24



tendencia a ser rectos parece modificar la forma del extremo posterior del núcleo a la de una pirámide de base truncada, extendiéndose paralelamente al eje longitudinal del espermátide en elongación. Por su asociación lateral los microtúbulos forman una especie de cilindro alrededor del núcleo en su polo caudal y la base del flagelo (5,80). Los microtúbulos del Manchette, aumentan de longitud y cuando el núcleo tiene forma elipsoide, se extienden a varias micras de la región del cuello (Figs. 25 y 26). Un estudio morfológico y morfométrico, cuidadosamente realizado ha revelado las dimensiones de los microtúbulos del Manchette y su relación con la envoltura nuclear, mediante "brazos" que se extienden hacia ésta (80).

Mientras esto sucede y cuando el Acrosoma ha alcanzado su volumen definitivo, el Aparato de Golgi abandona su superficie y se desplaza hacia la región caudal de la célula; el desplazamiento del Golgi parece ser parte del flujo citoplásmico en sentido anteroposterior. El cuerpo Cromatoide se sitúa en éste momento entre el núcleo y el extremo proximal del flagelo (76), y al parecer contribuye a la formación del Anulo, estructura que contribuye a la formación de la cola del espermatozoide como veremos después (5,13), Figs. 22 y 24.

Fase de Maduración.- A diferencia del humano, durante ésta fase suceden profundas modificaciones en la forma del acrosoma que son características en el ratón; comprendiendo los estadios 12 a 16 de la espermiogénesis en ésta especie (68). Así en el estadio 12, cuando el espermátide alcanza su tamaño máximo, el acrosoma presenta un extremo anterior cuadrado (Figs. 7 y 24), y aparece como una estructura en forma de cuña, subyacente al núcleo, que crece más en su extremo y forma un pico muy agudo (Figs. 29,30 y 31). El núcleo a su vez forma una expansión anterior subyacente al acrosoma. En el estadio 13 se presenta un abrupto acortamiento de la longitud del espermátide de cerca del 20%. Los ángulos caudales asumen la forma del espermatozoide maduro, que se mantiene durante los estadios 14 y 15; el espermatozoide abandona el túbulo seminífero en el estadio 16 (67), Fig. 31.

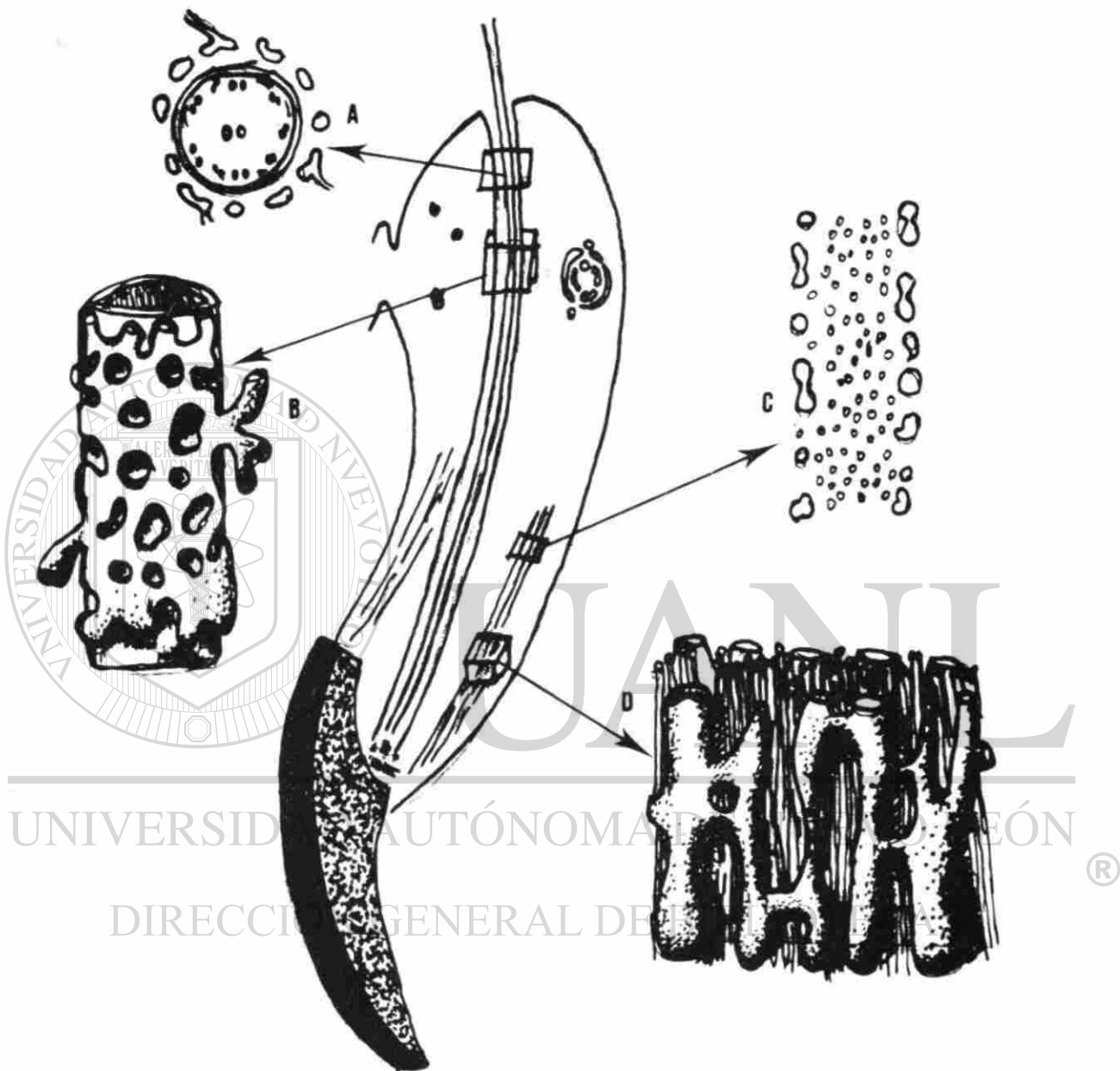


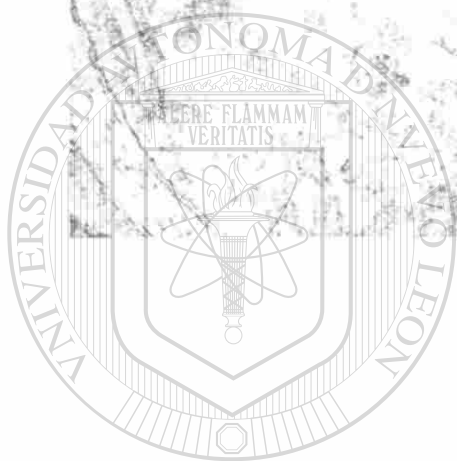
Fig. 25 Representación esquemática de un espermátide del estadio 14 mostrando la configuración del Retículo Endoplásmico Rugoso, (Clermont 1978). En A y B se muestra la conformación del Retículo Endoplásmico a nivel de la vaina caudal. En C y D se ilustra la configuración a nivel del flagelo, (descripción más detallada en el texto).



Polo caudal de un espermátide en elongación. Se observa la fosa de implantación en la que los centriolos se disponen perpendicularmente uno al otro. Adyacente a ellos puede verse una masa de material electrodenso correspondiente al cuerpo cromatoide. Se observan también los microtúbulos del manchete.

(39, 000 X)

Figura No. 26



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE

Esquema que muestra la formación del cuello y pieza intermedia del espermatozoide. Se observa el capitulum y una de las columnas estriadas de la pieza de conexión. El centriolo distal ha desaparecido y el proximal está dispuesto perpendicularmente al eje del flagelo. Las mitocondrias rodean la vaina fibrosa de la pieza intermedia. Puede verse también la envoltura nuclear redundante. (Bloom y Fawcett 1972).

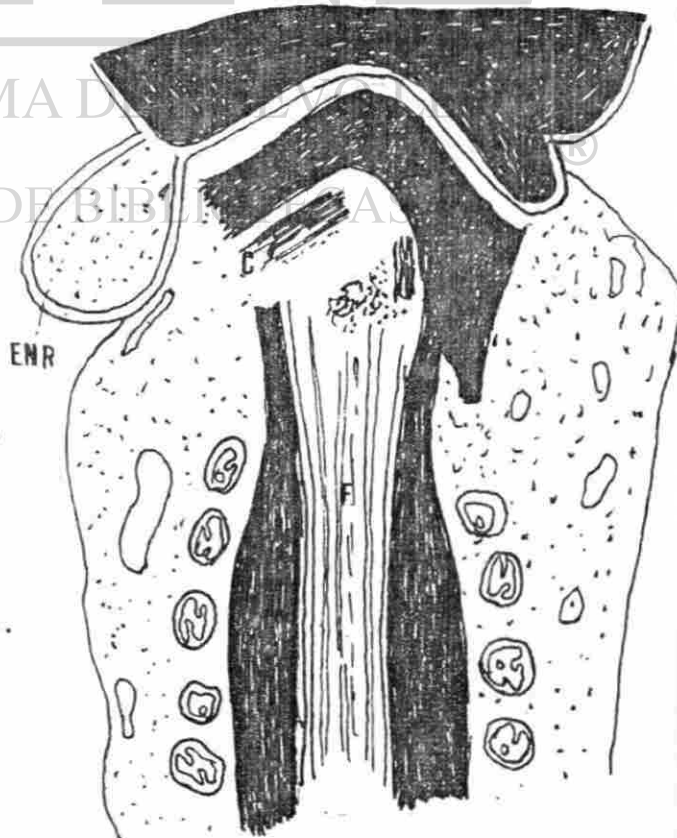


Figura No. 27

El manchete cilíndrico excluye las mitocondrias de la región del aparato centriolar, base del flagelo, y del citoplasma que rodea al canal flagelar; - sin embargo en secciones transversas, caudales al núcleo, se observan túbulos de Retículo Endoplásmico Liso que corren paralelas por dentro y por fuera de - la vaina, conectadas por finas anastomosis (13), Fig. 25.

La formación de la cola del espermatozoide sucede durante la fase Acrosomal tardía y la fase de Maduración. Inicialmente el flagelo consta de un complejo axial filamentoso ó axonema típico cuyos microtúbulos periféricos se continúan con la pared del centriolo posterior, mientras que el centriolo anterior ocupa una hendidura poco profunda en el polo posterior del núcleo, llamada Fosa de Implantación (Fig. 19). En ésta etapa los centriolos están rodeados de una estructura anular fibrosa laxa que hacia la membrana nuclear se relaciona con un pequeño anillo fibroso denso, el Anulo, presente en el sitio donde - la membrana citoplásmica se refleja sobre el flagelo y adherido tan fuertemente a ella como lo está el anillo nuclear a la membrana celular suprayacente al - acrosoma (5,101), Fig. 21 y 22.

Ulteriormente se forman 9 columnas segmentadas fibrosas, orientadas longitudinalmente que se unen entre sí y a la base del núcleo para formar la pieza de conexión (101), Figs. 26 y 27.

En sentido distal las nueve columnas segmentadas se unen a nueve fibras - densas longitudinales que se desarrollan en la periferia de los dobletes del axonema. Cierta controversia existe con respecto al destino del centriolo distal; mientras que Zamboni (1971_b) indica que persiste en forma modificada, Fawcett (1978), señala que desaparece al igual que el anillo laxo, una vez que la pieza de Conexión y las fibras externas son formadas. Para Zamboni (1971_b), el centriolo proximal, dispuesto perpendicularmente al flagelo, podría actuar como un cuerpo basal de orientación única, centro de la motilidad especial del flagelo del espermatozoide.

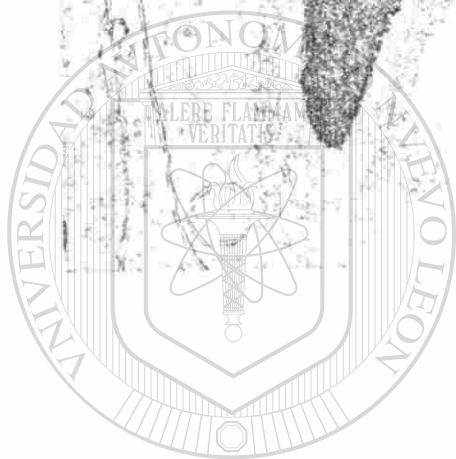
Las fibras densas externas comienzan a desarrollarse al tiempo que el flu



Sección oblicua de un espermátide en elongación. El núcleo es muy largo y estrecho. En ésta sección ambos extremos tienen forma aguda. La cromatina está más condensada en el centro del núcleo. El contenido acrosomal presenta un aspecto estratificado. El citoplasma de la célula de Sertoli vecino al acrosoma muestra mayor electrodensidad que el resto de él. Los microtúbulos del manchette aparecen en sección transversa.

(25, 000 X)

Figura No. 28



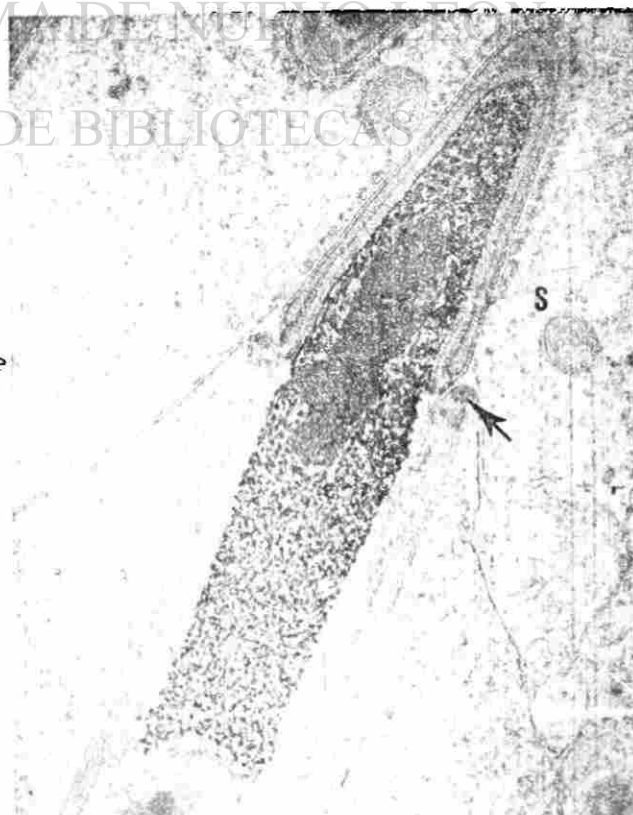
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Sección longitudinal de un espermátide en elongación. Las características acrosomales y nucleares corresponden a las descritas en la Fig. anterior. La sección permite apreciar el trayecto recto de los microtúbulos del manchette que se extienden desde el anillo nuclear, caudalmente hasta más allá del cuello en formación.

(25, 600 X)

Figura No. 29





Espermátide en maduración. El núcleo presenta forma alargada, la cromatina se ve muy condensada. El extremo anterior del acrosoma presenta una proyección aguda. Los grumos electrodensos del citoplasma de la célula de Sertoli aún se observan. El anillo nuclear se ha desplazado caudalmente al igual que los microtúbulos del manchette - que excluyen a las mitocondrias de la región periflagelar.

(15, 000 X)

Figura No. 30



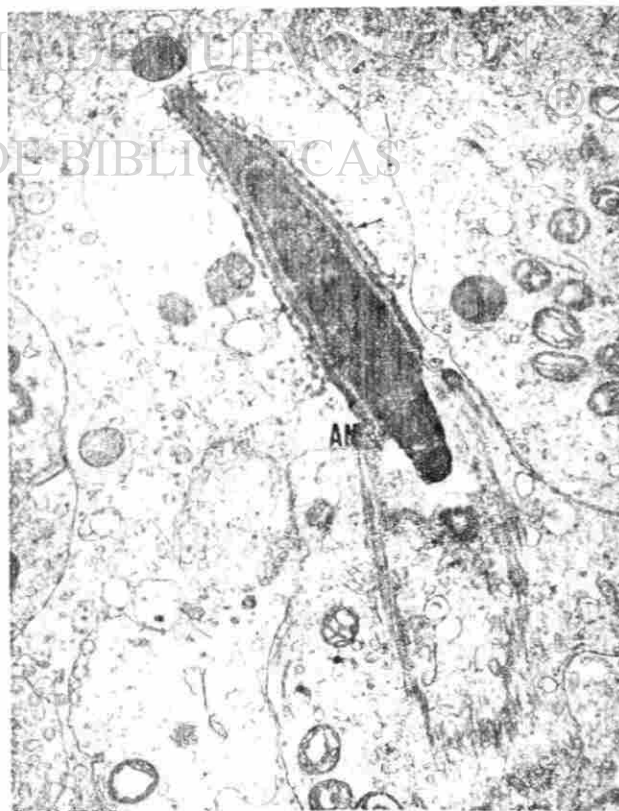
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LEÓN

Espermátide en elongación. La condensación de la cromatina ha alcanzado su grado máximo. El material acrosomal es denso electrodenso en la vecindad del núcleo. Los grumos densos del citoplasma de la célula de Sertoli son más escasos. Se observa también la pieza de conexión y los microtúbulos de la vaina caudal de disposición helicoidal.

(30, 000 X)

Figura No. 31





Espermátide en maduración. La orientación del corte permite observar la cabeza del espermátide y el acrosoma. Este último se extiende casi desde el extremo caudal del núcleo por el dorso para formar una proyección anterior y aguda. En el extremo caudal se observa la implantación del flagelo. Las mitocondrias se disponen alrededor de éste. La mayor parte del citoplasma se localiza en la región caudal.

(7, 000 X)

Figura No. 32



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Espermátide que se encuentra en la última etapa de maduración. El núcleo y el acrosoma tienen su aspecto definitivo; el cuello y la pieza principal están también completamente desarrollados. En la pieza intermedia, el filamento axial aparece rodeado por la vaina fibrosa y la vaina mitocondrial, limitada caudalmente por el anillo, que se encuentra en su posición definitiva. En secciones transversales se aprecian la pieza principal y la terminal. Se señalan (flechas) porciones de citoplasma residual.

(3, 600 X)

Figura No. 33



jo citoplásmico hace que el canal flagelar aumente de longitud, mientras la distancia entre el anillo nuclear y el ánulo permanece constante (5).

f) Síntesis de Macromoléculas Durante la Espermatogénesis.

Muchos de los conocimientos sobre eventos macromoleculares se han derivado de estudios citoquímicos (7). La Figura 34 reúne los datos sobre síntesis de macromoléculas en la espermatogénesis, que a continuación describimos.

Síntesis de DNA.- Estudios radioautográficos usando timidina H^3 , en testículos de ratón (64), han detallado los eventos de síntesis de DNA, durante la espermatogénesis, indicando que dicha síntesis se lleva a cabo durante el recambio y proliferación de espermatogonias así como en espermatocitos primarios, donde sucede justo antes de ser visible la profase meiótica. No hay, en cambio, síntesis de DNA en las etapas tardías de la espermatogénesis.

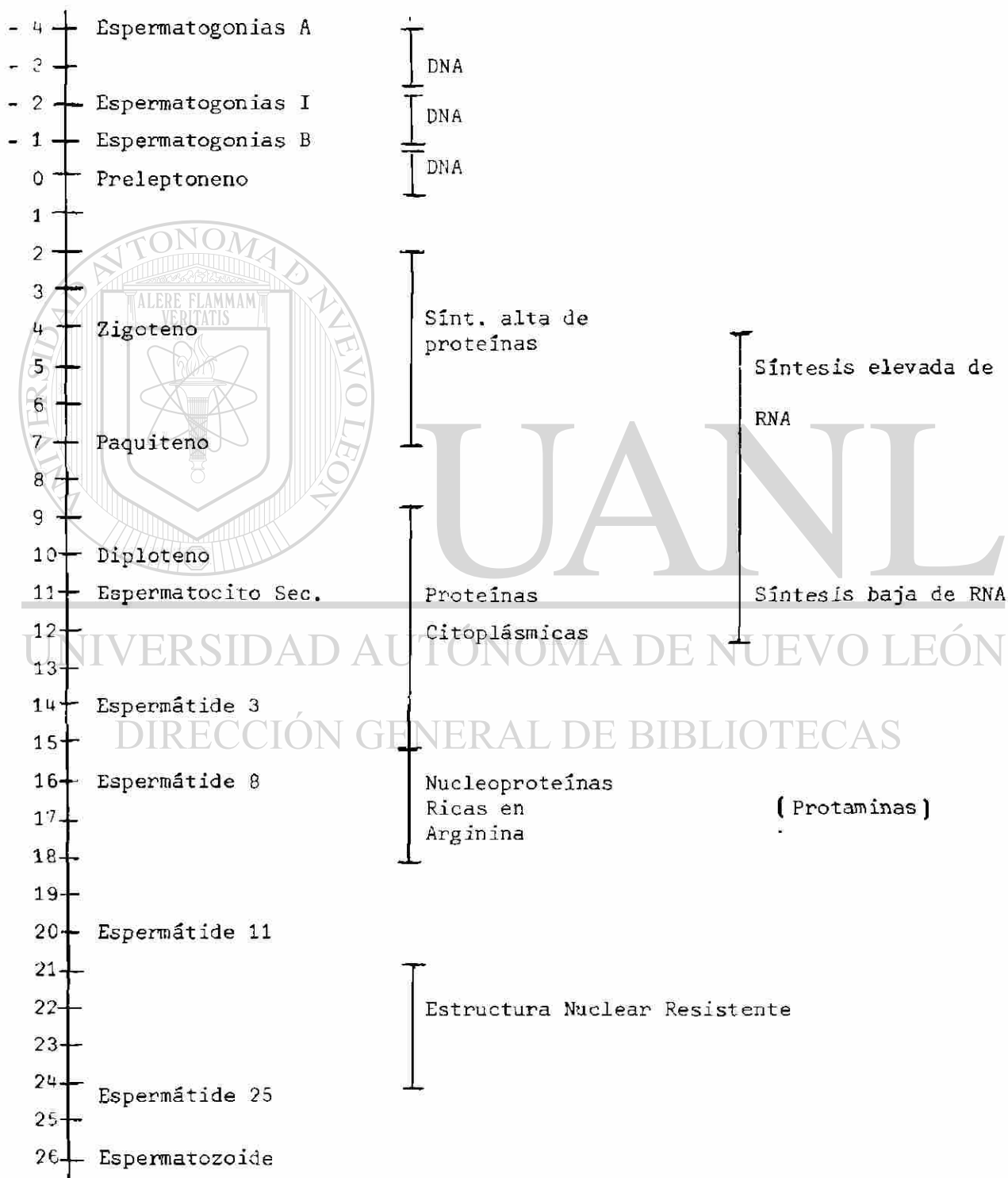
Igualmente ha sido determinado por Monesi (1962), el tiempo de duración del período de síntesis de DNA en las células en que sucede: En espermatogonias A_1 a A_4 , que tienen un promedio de vida y de duración de la etapa presintética muy semejante (de 27 a 30 hrs. y 10.5 hrs. respectivamente), el período de síntesis de DNA y el postduplicacional son muy variables.

En espermatogonias B la síntesis de DNA es muy larga, tiene una duración de 14.5 hrs.; igual que en espermatogonias I donde es de 12.5 y en espermatogonias A_4 , en las que la síntesis de DNA dura 13 hrs.; en cambio es mucho más corta en espermatogonias A_3 , A_2 y A_1 , en las que dura de 7 a 8 hrs.

El período postduplicacional es por el contrario corto en espermatogonias B (4.5 hrs.), más largo en las I (11 hrs.), y mucho más largo en A_3 , A_2 y A_1 (14 hrs.).

Síntesis de RNA y Proteínas.- Estudios radioautográficos empleando uridina H^3 y aminoácidos marcados, en testículo de ratón (65), han proporcionado información sobre la síntesis de RNA y proteínas en las células espermatogénicas y de Sertoli.

Fig. 34 Síntesis de Macromoléculas en la espermatogénesis del ratón (citado por Bruce y Meistrich 1972).



En espermatogonias la tasa de síntesis de RNA y proteínas es mucho más alta en células que son inmaduras es decir tipo A que en las maduras, tipo B, lo cual posiblemente está en relación a su grado de diferenciación y condensación de cromatina. La síntesis de proteínas nucleares y citoplásmicas ocurre en todas las etapas del ciclo y en la división celular, mientras que la síntesis de RNA se detiene en metafase y anafase.

Durante la Meiosis, la síntesis de RNA en relación con los autosomas cesa ó falla para alcanzar niveles significativos durante la profase temprana (leptoteno y zigoteno) así como en la profase tardía (diacinesis), alcanzando su pico máximo en Paquiteno mediano. En cambio, en relación con los cromosomas sexuales que permanecen como un cuerpo heteropicnótico, no se sintetiza RNA y permanecen invariablemente sin marcar a través de la profase meiótica. La síntesis de proteínas por el contrario, continúa durante los períodos de depresión de síntesis de RNA y está presente también en los cromosomas sexuales.

Durante la espermiogénesis, la síntesis de RNA se detiene tempranamente. Aunque en espermátides redondos la tasa de RNA sintetizado puede ser comparable con la producida en los momentos más activos de transcripción de la meiosis (92).

El RNA producido durante la Meiosis desaparece del núcleo ya sea por ruptura ó transferencia al citoplasma, y hacia la espermiogénesis media ya no es posible ver RNA en el núcleo. En el citoplasma puede verse RNA escaso, del que ha sido sintetizado en la profase meiótica.

La síntesis de proteínas que se ve en los espermátides de los estadios 9 al 15, es probablemente sostenida por el RNA producido en la meiosis. Esta síntesis resulta esencial para los marcados cambios morfológicos que tienen lugar durante esas etapas de la espermiogénesis. Muchas de las proteínas requeridas para el ensamblaje de los componentes de la cola son sintetizadas durante la espermiogénesis, igualmente muchas enzimas que incluyen la fosfo-

gliceratocinasa específica de testículo, la hexocinasa tipo espermatozoide, - la hialuronidasa y la beta-galactosidasa, aparecen por primera vez durante la espermiogénesis (92).

Existen evidencias de que un RNA_m de "larga duración", es sintetizado en paquiteno y se conserva a través de la espermiogénesis hasta sus etapas más tardías. Se ha especulado mucho sobre la posibilidad de que el cuerpo cromatoide, que aparece en paquiteno y es prominente en espermiogénesis temprana (76), sirva de sitio de almacenamiento para ese RNA_m de larga duración. Estudios de marcación con uridina tritiada en espermátides tempranos, sugieren que el RNA_m sintetizado en espermátocitos paquiténicos y espermátides redondos, pudiera ser almacenado en el Cuerpo Cromatoide, aportando una fuente de RNA_m para la diferenciación celular post-meiótica (76).

Síntesis de Proteínas Nucleares. Cambios Cromatínicos en Espermiogénesis.-

El núcleo de los espermátides de los mamíferos, sufre profundos cambios morfológicos, los cuales ya hemos descrito, y además modificaciones bioquímicas que involucran a la cromatina, cambios que son claramente adjudicables al proceso de citodiferenciación, y que ocurren con un contenido constante de DNA y sin actividad transcripcional (citado por Redi 1983).

La transición estructural de la cromatina, a una estructura altamente condensada, se acompaña de profundos cambios en la composición de las proteínas - básicas nucleares. Durante el proceso de maduración del espermatozoide, la formación de puentes disulfuro entre los grupos tioles de las proteínas nucleares y la eliminación de RNA del núcleo sucede concomitantemente (81).

A nivel testicular, es particularmente notable la substitución de histonas ricas en Lisina por histonas ricas en arginina, con la aparición de proteínas nucleares básicas específicas de testículo (44). Estas proteínas nucleares, las Protaminas, comienzan a sintetizarse en el estadio 12 de la espermiogénesis; la substitución de histonas por protaminas, causa una condensación extrema del genoma paterno (7,61).

B.- Alteraciones Producidas en la Espermatogénesis del Ratón por Agentes Físicos y Químicos.

Además de lo descrito en la introducción, con respecto a la inducción de anomalías morfológicas de espermatozoides de ratón, como prueba carcinogénica el conocimiento acerca de la sensibilidad de las células espermatogénicas a la acción de agentes mutagénicos físicos y químicos, determina la existencia de una abundante literatura acerca de éste tema. En esta sección se expondrán separadamente las alteraciones producidas en espermatozoides y las producidas en células espermatogénicas; en éste último caso se describirán estudios de tipo citogenético así como estudios morfológicos con microscopía de luz y electrónica.

a).- Alteraciones en Espermatozoides.

Desde hace tiempo se ha indicado que tanto en el ratón como en el hombre, cierto porcentaje de espermatozoides muestra una morfología anormal. La frecuencia de anomalías y el tipo de ellas, puede variar en diferentes cepas, pero se mantiene constante para una cepa en particular. Se ha sugerido que los tipos y frecuencias están bajo control genético (citado por Soares 1979).

Bruce y cols. (1974), observaron que la radiación ionizante, a dosis bajas de 30 rads, aumenta la frecuencia de espermatozoides morfológicamente anormales, que se extiende por varias semanas, y propusieron que el estudio de las anomalías de los espermatozoides, podría ser usada como una prueba de mutagenicidad en mamíferos.

La inducción de alteraciones morfológicas en espermatozoides de ratón ha sido reportada por muchos investigadores (8,9,90,95,97,98,103), como prueba del potencial mutagénico de agentes químicos y radiaciones. Sin embargo, es conveniente considerar los reportes hechos de incrementos en espermatozoides anormales por hipertermia (58) y restricciones dietarias (46).

Agentes de conocida acción mutagénica, teratogénica y carcinogénica, pro

ducen una elevación en el porcentaje de formas anormales de espermatozoides - (97), los cuales son presentados en la figura 35. La inducción de mutaciones por radiación, que afectan la morfología del espermatozoide, ha sido evidenciada recientemente por Hugenholtz (1983).

La forma en que se inducen éstas anomalías aún no es clara, se han adjudicado a aberraciones cromosomales, aunque la búsqueda de translocaciones indican que ésto es poco probable (8); parece ser más factible que los cambios puedan deberse a alteraciones en los genes responsables de la espermatogénesis (97). También es factible que se induzcan cambios en la expresión génica durante la transcripción ó el traslado de la información genética.

Sin embargo aún en ausencia de un claro entendimiento del mecanismo de inducción de anomalías morfológicas de espermatozoides, ésta prueba ha resultado ser de gran valor en la búsqueda de agentes que pudieran ser de efecto deletéreo para el hombre; ya que los gametos masculinos pueden ser examinados rápidamente, en forma reproducible y en gran número (97).

El tiempo de aparición de las formas anormales de espermatozoides puede ser indicativa de la etapa de la espermatogénesis ó las células espermatogénicas que son afectadas por el agente administrado. El Thiram (sulfuro de bisdimetil-tioxil-carbamoil), un agente fungicida, produce elevaciones del porcentaje de espermatozoides anormales, 5 semanas después de la administración del tóxico, indicando ésto que el daño ha ocurrido en etapa premeiótica, es decir en espermatogonias tardías ó espermatoцитos tempranos (103).

Aunque se ha sugerido por otros autores que muchos mutágenos probados dan lugar a incrementos de espermatozoides anormales a partir de espermatogonias tratadas, como es el caso de la Mitomicina C, (95), las anomalías en espermatozoides inducidas por agentes mutagénicos, son más relevantes 5 semanas después de la exposición (97). Por otra parte la exposición a mutágenos durante la espermatogénesis tardía (espermátide), no parece conducir a ningún incremento substancial en anomalías de espermatozoides (98).

Fig. No. 35

Agentes químicos que producen alteraciones morfológicas en espermatozoides de ratón.

(citados por Wyrobeck 1975).

Actividad Reportada:

Agente Químico	Mutagénica	Teratogénica	Carcinogénica
Actiomicina D	+	+	+
Aminopterina		+	+
Benzo (a) pireno		+	+
Colchicina	+	+	+
Ciclofosfamida	+	+	+
Diclorvós	+	+	+
Dietilestilbestrol			+
Etilmetano Sulfonato	+	+	+
Griseofulvina		+	
Hidroxiurea		+	+
Inmurán		+	+
5-Iodo-de-oxiuridina		+	+
Metil-colantreno	+	+	+
Metil-metano-sulfonato	+	+	+
Metepa	+	+	+
Mitomicina C	+	+	+
Myleran	+	+	+

Un aspecto más importante sobre la inducción de anomalías morfológicas en espermatozoides de ratón, es el hecho de que éstas anomalías pueden ser heredables, ya que la progenie F_1 y F_2 , de ratones tratados para inducir espermatozoides anormales, presentan incrementos de éstos (37,95); ésto confirma el hecho de que las frecuencias aumentadas de espermatozoides aberrantes, es indicativa de mutagénesis (90) y que la prueba puede ser de utilidad para la identificación de compuestos que causen daño genético transmisible en mamíferos (95).

A éste respecto, estudios citogenéticos indican que la forma del espermatozoide es altamente heredable; que la fracción de espermatozoides anormales está controlada por una multitud de factores autosómicos y que probablemente involucre a los cromosomas sexuales (98).

El estudio de las formas anormales de espermatozoides ha sido hecho en frotis ó extensiones del contenido del epidídimo y conducto deferente de los ratones tratados, teñidos con Eosina y examinados a 400 X (97). La mayoría de las alteraciones descritas por éste método corresponden a alteraciones de la forma de la cabeza del espermatozoide, entre las que se describen formas sin gancho, cabezas con forma de plátano, cabezas amorfas, formas plegadas y formas con doble flagelo, las cuales se presentan en la figura 36. Detalles más finos ó bien estudios ultraestructurales de estas formas anómalas de espermatozoides no han sido presentadas en la literatura.

Recientemente se ha propuesto otro método cuantitativo que determina la producción de espermatozoides anormales para la evaluación tóxica de agentes contaminantes (11) basado en la obtención de espermatozoides testiculares por sonicación y para completar estudios histopatológicos del tracto reproductor; ésta técnica ha sido propuesta para detectar efectos sutiles tales como oligospermia en ausencia de lesiones histopatológicas.

El estudio morfológico de los espermatozoides para la evaluación del efecto genotóxico de agentes químicos, puede ser complementado con otros da-

tos fenotípicos del espermatozoide como lo son la motilidad, el número de espermatozoides producidos y la actividad proteolítica acrosomal (26,27). Estos tres parámetros se ven afectados cuando el tratamiento con agentes mutagénicos (Mitomicina C), es dado a nivel del espermaticitos preleptoténicos y espermatogonias. En cambio no se producen a consecuencia del tratamiento de espermátides y espermatozoides (27). Se ha reportado disminución de la motilidad de los espermatozoides a consecuencia de la administración también de teratogénos (26).

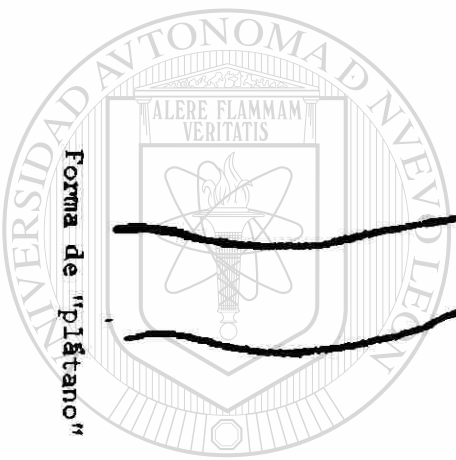
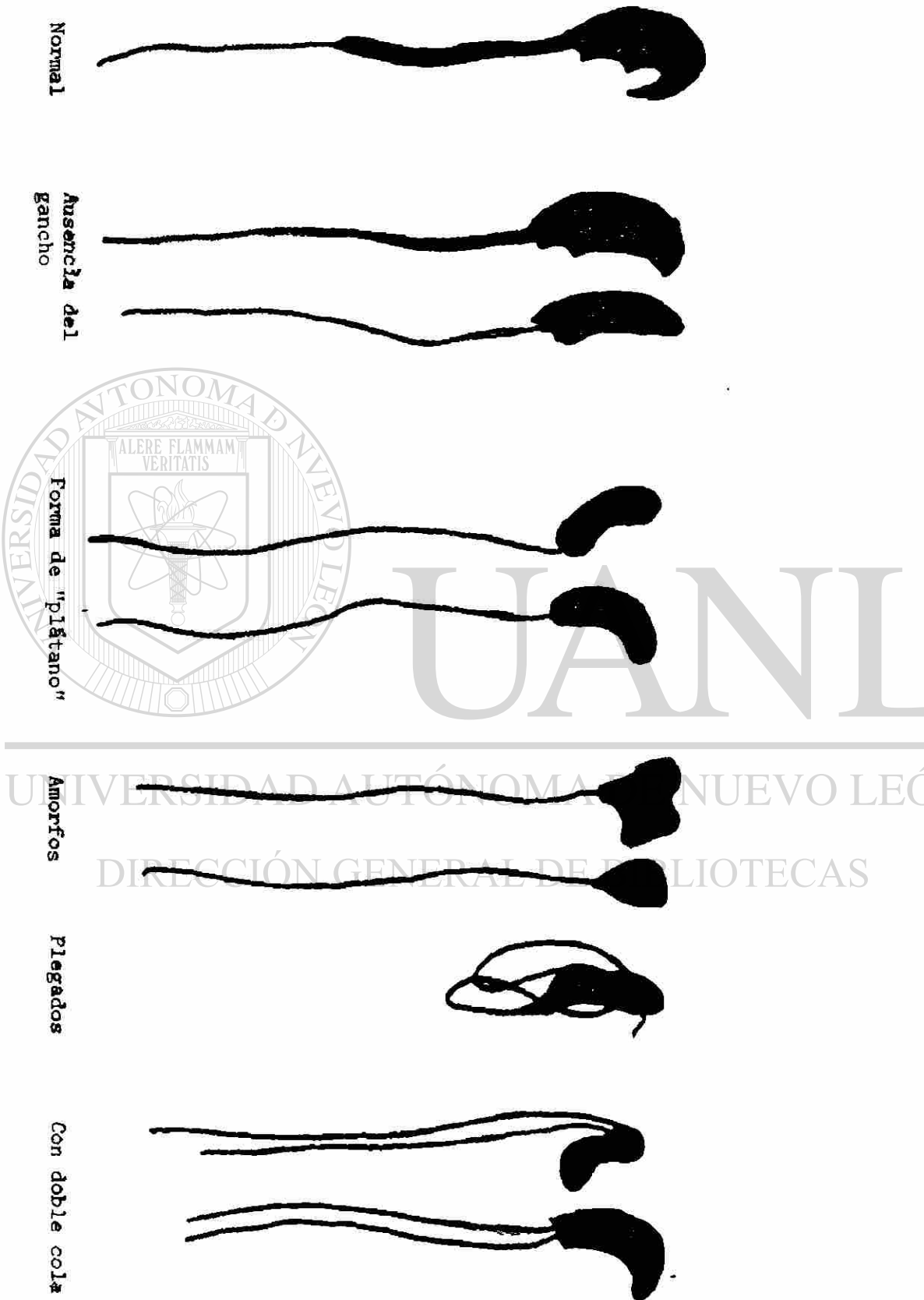
b) Alteraciones en Células Espermatogénicas.

La búsqueda de modelos experimentales apropiados en los que el potencial mutagénico de sustancias químicas pueda ser medido, ha conducido a la utilización de las células gonadales de mamíferos. El estudio de los gametos se ha complementado con estudios citogenéticos en las células espermatogénicas del epitelio germinal en ratones, donde los cambios cromosómicos pueden ser determinados directamente (79). Los químicos y las radiaciones producen en general muerte de las células germinales, esterilidad temprana, mutaciones y rupturas cromosómicas (72).

La importancia de alteraciones cromosómicas en espermatogonias, ha sido reconocida en vista de que las espermatogonias constituyen la población celular permanente del testículo y el daño genético inducido en ésta etapa, puede ser de gran significado (19,59 y 88).

Se ha reportado que la administración de Mitomicina C a dosis de 5 mg/Kg. de peso produce rupturas en la cromatina pericentromérica de espermatogonias - en división, así como recambio de cromátides hermanas; igualmente Ciclofosfamida, una droga antineoplásica, produce elevaciones del porcentaje de formas anormales de espermatozoides (97), y citogenéticamente se ha comprobado que produce rupturas cromosómicas en espermatogonias I y B, además de falta de -- disyunción en diacinesis con aparición de univalentes (1,74,79). Un agente --

Fig. 36 Formas anormales de espermatozoides inducidas por diferentes agentes químicos de acción mutagénica, carcinogénica ó teratogénica. (Myrobeck 1975).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

antineoplásico, el sulfuro de tris (2 metil-1 aziridil) fosfina ó THIOTEPA, - produce translocaciones en espermatoцитos primarios.

El daño genético y somático inducido por agentes químicos muestra especificidad y es selectivo para diferentes etapas de las células germinales masculinas (71). En la figura 37 , se resumen los cambios inducidos por diversos agentes químicos, reportados en la literatura, y el tipo de célula espermato-génica específica que afectan. Cabe destacar entre ellos el Etilmetanosulfonato, por ser el agente químico que utilizamos en nuestro estudio, el cual como se indica, produce mutaciones letales dominantes en espermátides y espermatozoides así como mutaciones específicas de locus, en estadíos postgoniales, y translocaciones en ésta misma etapa (57).

Cambios testiculares en ratones expuestos a radiación ionizante (1000 - rads), y a agentes mutagénicos (Mitomicina C a dosis de 5 mg/Kg de peso), han sido reportados desde hace tiempo (31,53). Ambos agentes tienen efectos similares: disminución del peso testicular, disminución de espermatogonias hasta un 10%, de 7 a 14 días después del tratamiento; disminución de espermatoцитos 14 a 28 días después y de espermátides a los 35 días. Estos cambios son producidos por muerte de las espermatogonias, con desaparición de espermatoцитos y espermátides, por falta de substitución por parte de las espermatogonias en las que la síntesis de DNA está deprimida.

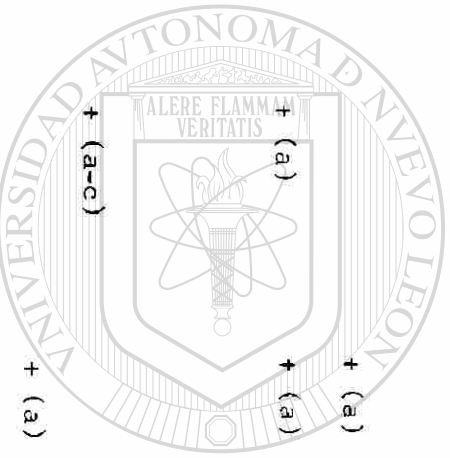
Como se ha podido observar en lo presentado hasta el momento, el aspecto morfológico de los daños inducidos por agentes físicos ó químicos en el epitelio seminífero y sobre las células espermato-génicas en particular, ha sido -- tratado muy someramente en la bibliografía disponible al respecto, y de hecho, pocos estudios se han referido a los cambios estructurales que suceden en la - espermato-génesis a consecuencia de agentes mutagénicos.

Parvinen (1979a) reporta los efectos tempranos de la Procarbazina, en -- segmentos de túbulos seminíferos dañados, analizados con microscopía de contraste de fase. Las alteraciones tempranas se vieron en espermatoцитos zigoténicos

Fig. 37 Efecto de agentes químicos sobre las células espermatogénicas en roedores, revisada en la bibliografía por varios autores. (1, 9, 26, 27, 31, 53, 54, 57, 63, 71, 72, 74, 75, 79, 87, 88, 97 y 103)

(a) En Espermatogonias; (b) En Espermatocitos; (c) En Espermátides; (d) En Espermatozoide.

Agentes Químicos	Mutaciones Letales Dom.	Mutaciones Esp. de Locus	Aberraciones Cromosómicas	Síntesis de DNA no prog.	Alt. en espermatocitos Forma Mot. Act. Prot. D.
Adriamicina			+ (a)		
Cafeína				+ (a-c)	
Ciclofosfamida	+ (c-d)		+ (a)		
EMS	+ (c-d)	+ (c-d)	+ (c-d)		+
ENU	+ (c-d)	+ (a)			
Fosfesteroil	+ (d)				
Hidroxiurea	+ (b-d)				+
MMS	+ (c-d)	+ (c-d)	+ (c-d)	+ (a-c)	+
I MS					+
MEPEPA	+		+ (a)		+
Mitomicina C	+ (b-c)	+ (a)	+ (a)		+
Mylerán	+ (c)				+
6-Mercaptopurina	+ (b)				
Natulán	+ (a-c)	+ (a-c)		+ (a)	
PMS					+
Procarbarina					+

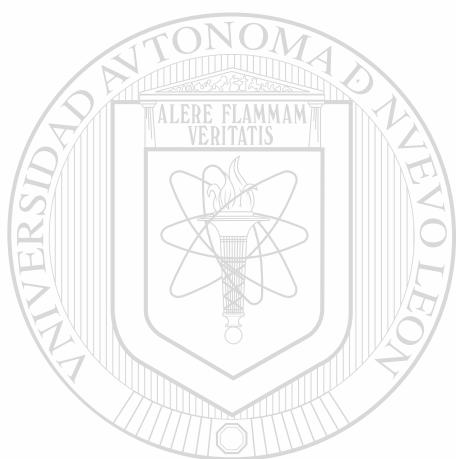


y medios paquiténicos, especialmente en sus cromosomas. A dosis altas la Procarbazona produjo daño también en espermátides redondos, y retardo en la espermiación probablemente a consecuencia de acción primaria a nivel de la célula de Sertoli.

Un estudio sobre la morfología testicular en casos de atrofia inducida por químicos no relacionados entre sí (Acido ftálico, Oxido de etileno, Hexafluoroacetona y acrilamida), proporciona más detalles sobre los cambios histopatológicos, señalando la aparición de túbulos atróficos, con disminución del diámetro y depleción del epitelio germinal, donde los espermátides en maduración fueron los más dañados, y con la aparición de células gigantes multinucleadas ocasionalmente; en túbulos más severamente dañados los espermatozoides y espermátides desaparecieron, y el epitelio germinal comprendía sólo una capa delgada de espermatocitos y espermatogonias ó bien sólo una capa de espermatogonias y células de Sertoli; éstas al igual que las células de Leydig, no mostraron alteraciones. Túbulos menos dañados presentaron degeneración de espermátides en maduración y numerosos glóbulos eosinófilos que contienen espermátides maduros picnóticos; ya que las espermatogonias no presentaban cambios degenerativos ni necróticos, la atrofia testicular producida por éstos agentes químicos se considera reversible (33).

En nuestra búsqueda de alteraciones ultraestructurales en células espermátogénicas a consecuencia del tratamiento con agentes físicos ó químicos, solamente encontramos las alteraciones histológicas y ultraestructurales en testículos de rata sometidos a inhalación crónica de adelgazador de pinturas (60); dicho estudio señala la pérdida de peso testicular y del tejido adiposo vecino, disminución en la cuenta de espermatozoides en suspensión y en cortes de testículo, retracción y vacuolización del citoplasma de las células espermátogénicas en el estudio con microscopía de luz y la aparición de gránulos electrodenso, vacuolas abundantes e irregulares de contenido electrodenso y mitocondrias dispersas, en espermatogonias, espermatocitos y espermátides, a nivel ultraes-

estructural. Igualmente con microscopía electrónica se observaron abundantes espermátides inmaduros y anormales de localización anormal. Las anomalías encontradas en los espermátides se localizaron sobre todo a nivel del acrosoma. En células de Sertoli se observaron retracción y disminución del tamaño, aumento en el número de lisosomas, vacuolas de material electrodensó y cuerpos multivesiculares.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

III. MATERIAL Y METODOS

Se utilizó como material biológico, 24 ratones machos de genotipo híbrido (C57 BL X C3H) F1, de 8 a 12 semanas de edad. La selección de ésta cepa de animales se basó en reportes previos de la literatura, que la señalan como una de las mejores para éste tipo de ensayos por presentar un porcentaje muy bajo de anomalías morfológicas de espermatozoides. Los ratones fueron obtenidos de Charles River, Breeding Laboratories Inc.

Para la inducción de anomalías morfológicas en espermatozoides se empleó una agente mutagénico: El etilmetanosulfonato (de Sigma Che. Co.), el cuál ha sido reportado junto con el metilmetanosulfonato como químicos de una potente acción sobre la forma del espermatozoide (97).

Se llevaron a cabo dos experimentos similares, en cada uno de los cuáles se formaron cuatro grupos de 3 ratones cada uno. El etilmetanosulfonato se administró por vía intraperitoneal a dosis de 200 mg/Kg. de peso, diariamente, durante 5 días consecutivos. Uno de los grupos fué usado como control, inyectándosele únicamente el vehículo; 0.3 ml. de agua tridestilada.

Después de la administración del etilmetanosulfonato, los ratones se mantuvieron en cuarto a temperatura de 25°C, con ciclos controlados de luz-obscuridad, y alimentados con Purina Lab. Chow.

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical; el primer grupo de ratones se sacrificó 3 semanas después de la última inyección de etilmetanosulfoanto; el segundo grupo y el grupo control se sacrificaron a las 4 semanas y el tercer grupo a las 5 semanas; de ésta forma se cubrió toda la duración del ciclo del Epitelio Seminífero, reportada por Oakberg (1957) como de 35 días.

Una vez sacrificados los ratones, se disecaron; testículos, epidídimos y conductos deferentes.

Los epidídimos y conductos deferentes, de cada ratón, se fragmentaron -

con tijeras y pinzas y se suspendieron en 0.6 ml. de solución amortiguadora de fosfatos, 0.2 molar, de pH 7.3. La suspensión se filtró dos veces, con rejillas de 200 mesh para eliminar fragmentos de tejidos, y se hicieron con ella 10 fro_{ntis} o extensiones, los cuáles se trataron de la siguiente manera:

- 1) Secado al aire por 12 horas.
- 2) Fijación en una solución de:

Metanol absoluto	85%
Formaldehído	10%
Acido acético	5%

durante una hora.

- 3) Lavado en agua (10 inmersiones).
- 4) Tinción con Eosina "Y" acuosa al 5%, por una hora.
- 5) Secado a temperatura ambiente por 24 horas.
- 6) Lavado en Etanol para retirar el exceso de colorante.
- 7) Secado al aire.

Las laminillas se analizaron con microscopio de luz (Zeiss K7) a 600 X, y en cada una de ellas, se contaron 100 espermatozoides para establecer el porcentaje de anomalías morfológicas.

De los testículos disecados en cada ratón, uno de ellos se fijó en Líquido de Zenker por 12 horas, después de incidir la albugínea; se lavó con agua corriente por 24 horas, y se deshidrató con cambios de alcohol en grados ascendentes, para incluirse en parafina por los métodos convencionales.

Del otro testículo se obtuvieron fragmentos de 1 a 2 mm. de espesor, que se fijaron de inmediato por el método recomendado por Hayat (1972), para el estudio ultramicroscópico de espermátides.

Las soluciones empleadas y el método se detallan a continuación:

Solución A.	Glutaraldehído al 25%	25 ml.
	Buffer de cacodilatos 0.1 M. pH 7.2	75 ml.
Solución B.	Sacarosa	7.5 grs.
	Buffer de cacodilatos 0.1 M. pH 7.2	100 ml.

Solución C.	Dicromato de Potasio al 5%	16 ml.
	Hidróxido de Potasio 2.5 N.	2 ml.
	Agua destilada	2 ml.
	Buffer de cacodilatos 0.1 M. pH 7.2	20 ml.
Solución D.	Tetraóxido de Osmio	1 grs.
	Buffer de cacodilatos 0.1 M.	100 ml.
	Sacarosa	.4 M.

METODO:

- 1.- Fijar piezas pequeñas de testículos en la sol. A por 1 hora a 4°C.
- 2.- Lavar y guardar los especímenes en la Sol. B por 30 hrs. a 4°C.
- 3.- Pasar a la Solución C por 30 minutos a 4°C.
- 4.- Lavar en la solución B y post-fijar en la solución D por 80 minutos a 4°C.

Una vez fijados los fragmentos de tejidos, se lavaron con la solución B, se deshidrataron e incluyeron en Epoxiresina LX112, por la técnica habitual- (55).

El tejido testicular incluido en parafina se utilizó para estudio histológico con microscopía de luz, para lo cual se obtuvieron secciones de 3 micras de grosor, que fueron tratadas con solución Yodo-yodurada de Lugol, para evitar precipitados de cloruro mercurico componente del líquido de Zenker. Los cortes se tiñeron por los métodos de Hematoxilina y Eosina, reacción de Schiff y método de Gomori para fibras reticulares (56).

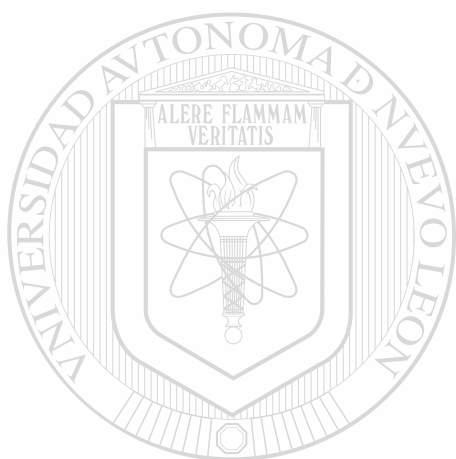
El último de éstos métodos, se utilizó en vista de que demuestra en forma rápida y exacta información sobre la organización del túbulo seminífero y asociaciones celulares, características de cada etapa del ciclo del epitelio seminífero.

Se estudiaron 3 laminillas con secciones seriadas del tejido de cada ratón, es decir 9 laminillas por grupo y un total de 72 en los dos experimentos.

Por otra parte del tejido incluido en LX112 se hicieron cortes de .25 micras de grosor, que se tiñeron con Azul de Toluidina y cortes de 900 amstrongs

obtenidos con cuchilla de diamante, en el ultramicrotomo Sorvall MT-1, que se tiñeron con citrato de plomo y acetato de uranilo (35).

Los cortes del tejido incluido en Parafina, así como los de .25 micras - de grosor se estudiaron en Microscopio Zeiss K7. El estudio de Microscopía -- Electrónica se llevó a cabo con microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 109; de las áreas más representativas se tomaron fotografías con película Agfa-Pan Profesional que se ampliaron e imprimieron en papel Kodabromide. F3.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

IV.- RESULTADOS.

A.- Inducción de alteraciones en la forma del espermatozoide de ratón por Etil metanosulfonato. (EMS).

En una etapa preliminar a nuestro estudio, se establecieron los porcentajes de formas anormales de espermatozoides y el tipo de anomalías para la cepa de ratones utilizada en éste estudio y las cepas progenitoras.

En la cepa C57BL/6n se presentaron 10.65% de espermatozoides de forma anormal; en C3H el porcentaje fué de 11.6 y para la cepa híbrida (C57BL X C3H) F₁ fué de 1.65. Esta notable disminución en el porcentaje de espermatozoides de forma anormal, resultó muy propicia para la detección del efecto del EMS a éste nivel.

Las alteraciones morfológicas encontradas se clasificaron en cuatro grupos, que se ilustran en la figura 38, y corresponden a defectos del gancho, formas filamentosas, formas con doble cabeza ó doble cola y espermatozoides amorfos. Hubo diferencias en cuanto al tipo de alteración morfológica preva-
ciente, siendo para C57BL más frecuente el tipo amorfo, para C3H la forma filamentosa y para el híbrido (C57BL X C3H)F₁, el tipo amorfo y los defectos del gancho. Los porcentajes correspondientes se presentan en la figura 39.

No se observaron efectos tóxicos en los ratones a consecuencia de la administración del EMS a las dosis indicadas, ya que siguieron comiendo y bebiendo normalmente, aunque se vió disminución de la actividad física en los días siguientes al tratamiento e irritación en el sitio de la inyección. No se registró muerte de los animales en ninguno de los experimentos.

Se produjo en general una elevación en el porcentaje de formas anormales en los ratones tratados con el agente mutagénico, que no se observó en los ratones del grupo control a los que solo se les administró agua tridestilada.

Se presentaron diferencias en los incrementos detectados a 3,4 y 5 sema-

Fig. 38 Formas anormales de espermatozoides inducidas por EMS en el ratón.



NORMAL



DEFECTO DEL GANCHO



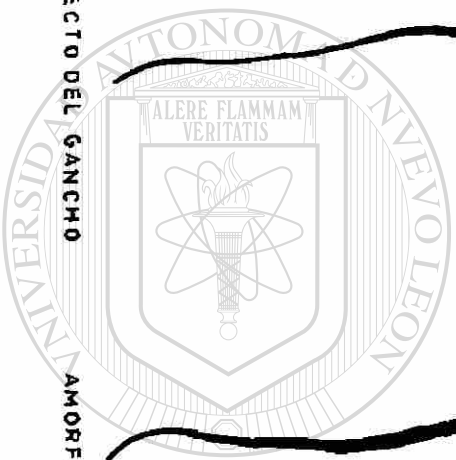
AMORFO



FILAMENTOSO



BICEFALO



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

FIG. 39 INDUCCION DE ALTERACIONES EN LA FORMA DE ESPERMATOCITOS DE RATON POR EMS.

	% DE FORMAS NORMALES		% DE FORMAS ANORMALES		DEFECTOS DEL GANCHO O MINIMOS		FORMAS AMORFOS		FORMAS FILAMENTOSAS		FORMAS CON DOBLE CABEZA O DOBLE COLA	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
C ₃					2.5		3.25		4.2			1.65
C57 BL-NORMAL	89.35		10.65		4.3		5.65		0			0.7
(C57BL X C ₃ H) F1 NORMAL	98.35		1.65		0.7		0.85		0			.1
(C57 BL X C ₃ H) F1 I	96.85	95.71	3.15	4.29	.5	1	1	1.04	1.6	2.87	0.05	.09
(C57 BL X C ₃ H) F1 II	87.65	85.34	12.35	14.66	2.2	2.5	3.25	4.2	4.75	5.46	2.15	2.5
(C57 BL X C ₃ H) F1 III	95.35	92.08	4.65	7.92	1.65	2.76	1.7	2.05	1.25	2.35	0.05	0.76
(C57 BL X C ₃ H) F1 CONTROL	99	98.2	1	1.8	0.25	0.6	0.45	0.9	0	0	.3	0.3

nas del tratamiento, lo mismo que en el tipo de alteraciones más frecuentes. La máxima elevación en el porcentaje de formas anormales se observó a las cuatro semanas del tratamiento, encontrándose 12.35% de formas anormales de espermatozoides y fueron más comunes las formas filamentosas y los espermatozoides amorfos tanto a las 3 como a las 4 semanas, mientras que a las 5 se vieron más los defectos del gancho. Los porcentajes correspondientes se presentan en la figura 40, en el que puede apreciarse que los resultados del segundo experimento son consistentes con los del primero. La prueba estadística aplicada indica que existe un 95% de grado de confiabilidad para los resultados de éste ensayo (figura 40).

B.- Alteraciones presentadas en el epitelio seminífero de ratones tratados con EMS.

El estudio morfológico de las alteraciones producidas en el epitelio seminífero de ratones tratados con el agente mutagénico, fué realizado sobre todo en cortes histológicos de 3 micras de grosor en los que un gran número de túbulos seminíferos pudo ser estudiado comparativamente. Aunque los cortes de .25 micras de grosor del tejido incluido en resina LX112, ofrecen una mejor resolución, su desventaja fué que sólo unos pocos túbulos pudieran analizarse comparativamente en un corte; sin embargo fueron de utilidad para corroborar y detallar los hallazgos hechos en cortes de 3 micras, para la localización de espermátides anormales y en la selección de áreas con daño mínimo para el estudio ultraestructural.

OBSERVACIONES GENERALES.-

Aunque el tamaño y el peso testicular no fueron precisados en éste estudio, no se apreciaron hipotrofia ó atrofia testicular en las secciones histológicas. La albugínea apareció íntegra, así como los tabiques de tejido conec

Fig. 40 Determinación estadística del grado de confiabilidad de los resultados.

$$N = \frac{t^2 P Q}{L^2} \quad (\text{donde})$$

$t = \text{cte.} = 1.96 \times 2$

$P = \% \text{ de formas normales}$

$Q = \% \text{ de formas anormales}$

$L = \% \text{ de significación}$

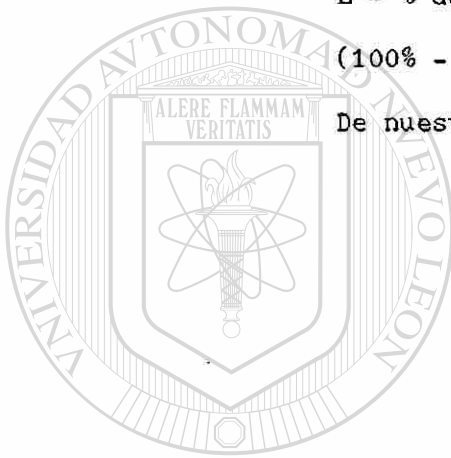
(100% - % de Significación = Grado de Confiabilidad).

De nuestros datos:

$$N = \frac{(22) (\bar{P}) (\bar{Q})}{(5)^2}$$

$$N = \frac{(4) (94.5) (6.2)}{25}$$

$N = 93.7$ (número de células que deben contarse para obtener un grado de confiabilidad de 95% en nuestros resultados).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Fig. 41 Porcentaje de túbulos alterados por el EMS

Tiempo de sacrificio	% de túbulos con daño leve.	% de Túbulos con daño moderado	% de túbulos con daño severo	Total de túbulos lesionados.
3 semanas	23	30	5	= 58%
4 semanas	32	40	9	= 81%
5 semanas	28	14	12	= 54%

tivo intersticial, vasos sanguíneos y células de Leydig. Comparados con los controles, los túbulos seminíferos mostraron mayor fragilidad apareciendo con frecuencia distorsionados a causa del efecto mecánico del procesamiento.

El daño tubular fué muy evidente aunque no uniforme, encontrándose túbulos de apariencia normal y otros con diferente grado de lesión. Para facilitar ésta descripción los túbulos lesionados se clasificaron de la siguiente manera:

a) Lesión tubular leve.- En túbulos con membrana basal íntegra, y en los que faltan células en pequeñas áreas y la organización es de aspecto normal, así como la tinción general del túbulo.

b) Lesión tubular moderada.- Cuando la membrana basal aparece íntegra pero el epitelio se ve afectado con disminución de la celularidad y pérdida del ordenamiento normal de las células; la tinción general del túbulo se ve disminuída y la fragilidad del epitelio es mayor. (Figs. 43,45 y 46).

c) Lesión tubular severa.- La membrana basal sigue siendo normal aunque por la mayor fragilidad de los túbulos con frecuencia se observan rupturas en ella; el túbulo se ve francamente alterado, el epitelio se reduce a una ó dos capas de células ó bien falta por completo, por lo que la tinción general es pálida. (Fig. 47).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

PORCENTAJE DE TUBULOS LESIONADOS.

Un recuento de los túbulos dañados nos permitió determinar que el grado de lesión varió según el diferente tiempo transcurrido después de la administración del EMS. A las tres semanas el 58% de los túbulos presentaron daño, la mayor parte de ellos moderado a leve y sólo el 5% mostró daño marcado; a las cuatro semanas el daño fué más extenso, el 81% de los túbulos presentaron lesión, 40% daño moderado y 9% mostraron daño marcado; a las cinco semanas 44% de los túbulos presentaron lesión, 28% con daño leve y 12% con lesión marcada. Estos datos se presentaron en la Fig. 41. Los cambios producidos a nivel de -

cada tipo celular en el túbulo seminífero, se describirán a continuación, señalando a la vez las observaciones hechas con microscopía electrónica.

ALTERACIONES EN ESPERMATOGONIAS.

Los cambios producidos en espermatogonias fueron mínimos y éste parece ser el tipo celular menos afectado de las células espermatogénicas.

a) Número.- Hubo disminución en el número de espermatogonias ostensible sobre todo en túbulos de daño moderado a severo en éstos últimos algunas zonas aparecían desprovistas de espermatogonias (Fig. 43). En los ratones sacrificados a las tres semanas, la disminución fué poco marcada y visible en las primeras etapas del ciclo del epitelio seminífero. A las cuatro semanas la falta de espermatogonias se observó por igual en las primeras y las últimas etapas del ciclo, mientras que a las cinco semanas la disminución de espermatogonias se notó más en las últimas etapas del ciclo del epitelio seminífero.

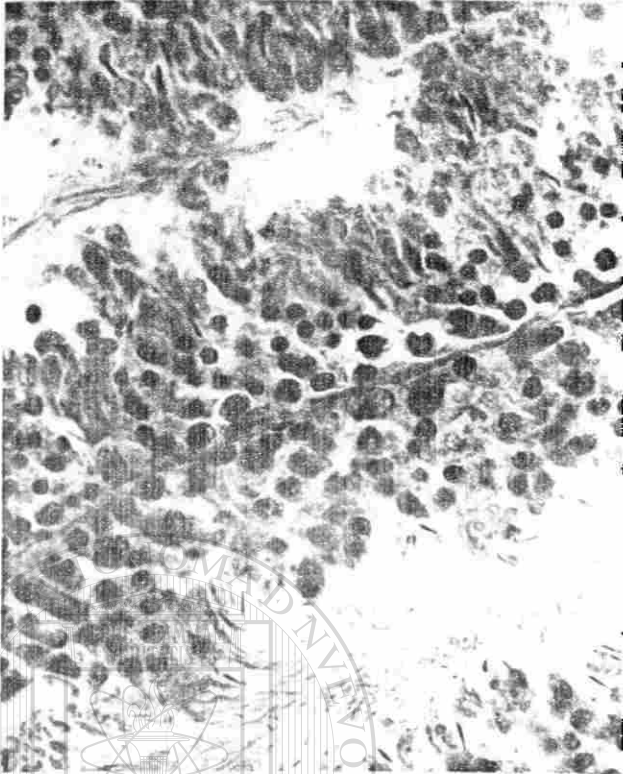
b) Mitosis.- Salvo en las etapas IX a XII, se vieron pocas espermatogonias en división. Sólo ocasionalmente se vieron células de éste tipo en degeneración, y específicamente en túbulos con daño leve.

c) Localización.- En éste aspecto no se observaron cambios, ya que las espermatogonias permanecieron siempre en el compartimiento basal del epitelio seminífero.

d) Morfología.- No se detectaron cambios morfológicos a nivel de microscopía de luz y electrónica.

CAMBIOS EN ESPERMATOCITOS.

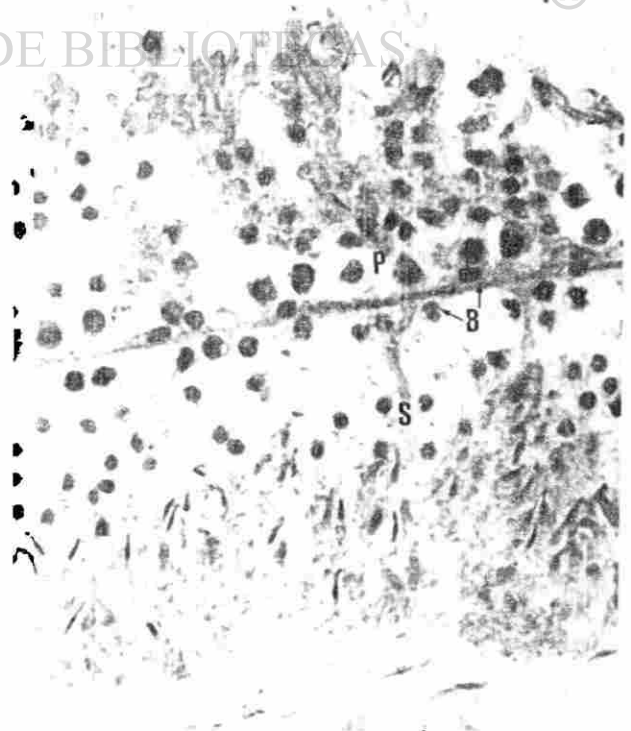
Este fué uno de los tipos celulares más dañados, encontrándose cambios sobre todo en espermatoцитos paquitenicos medianos y tardíos. No se observaron cambios en zigoteno, y se vieron pocos espermatoцитos primarios en diploteno y diacinesis así como espermatoцитos secundarios. Los cambios observados en es-



Túbulos seminíferos normales del grupo control. El túbulo superior muestra una asociación celular correspondiente a la etapa III del ciclo del epitelio seminífero. La pared del túbulo muestra espermatogonias B, células de Sertoli, espermatocitos paquí ténicos, espermatídes redondos y espermatídes 13. El túbulo inferior presenta una asociación celular compatible con la etapa V del ciclo del epitelio seminífero. Objetivo 40 X.

F i g u r a No. 42

Dos túbulos seminíferos de las etapas III y IV que presentan lesiones de grado moderado a consecuencia de la administración de EMS. En ambos túbulos se observa una notable disminución de la población celular a expensas de las células espermatorónicas. La disminución es marcada en cuanto a espermatogonias y espermatocitos primarios. El número de espermatídes tempranos es también mucho menor. (compárese con la fotografía anterior). Objetivo 40 X.



F i g u r a No. 43

permatocitos paquiténicos fueron los siguientes:

a) Número.- Se observó una disminución de éstas células en todas las etapas del ciclo del epitelio seminífero, aún en túbulos con daño leve, donde faltaban espermatoцитos en pequeños segmentos, dejando huecos en los sitios correspondientes. Las áreas afectadas por éste cambio fueron mayores en túbulos de daño moderado, y en los de lesión severa, en los que llegaron a desaparecer por completo en grandes áreas.

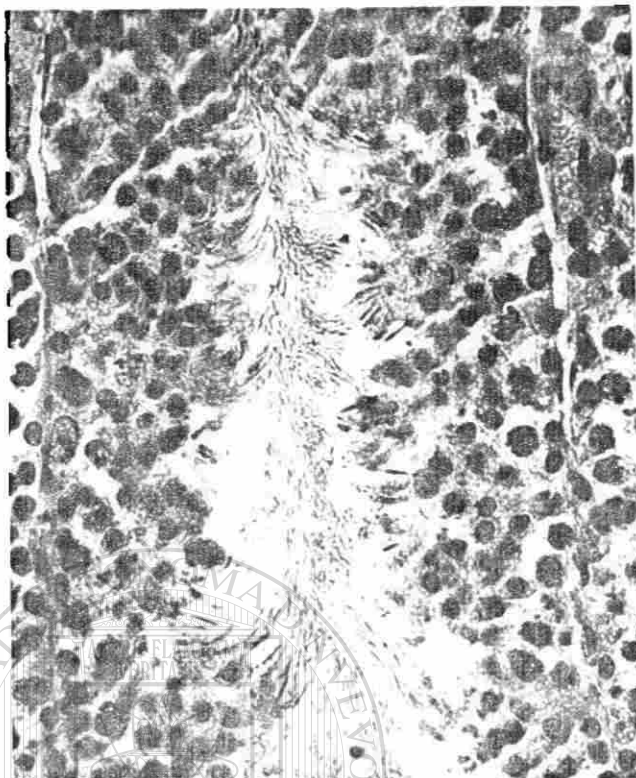
b) Localización.- En túbulos con lesión leve no se observaron cambios en el acomodo normal de las células, que se presentaron acompañando a los defectos en el número de las células, encontrándose espermatoцитos aún en la luz del túbulo seminífero.

c) Morfología.- Se presentaron cambios nucleares y citoplasmáticos que indican lesión celular severa que culminó con muerte y desaparición de muchos espermatoцитos. Estos cambios se observaron aún en túbulos con daño leve, y en todas las etapas del ciclo del epitelio seminífero, y no se observaron diferencias a intervalos distintos de exposición al EMS.

Con microscopía de luz el citoplasma presentó un aspecto filamentososo y disgregado; que en secciones de .25 micras fué más evidente, apreciándose además pérdida de las granulaciones propias del citoplasma así como desaparición de la membrana nuclear y plasmática. (Fig. 47).

En túbulos con daño leve éstos cambios fueron segmentarios observándose espermatoцитos con diverso grado de lesión alternando con espermatoцитos de aspecto normal. En túbulos con lesión moderada a marcada el daño fué más extenso y la totalidad de los espermatoцитos mostraron éstos cambios.

Con microscopía electrónica se vieron espermatoцитos con francos signos de muerte celular: desaparición de organelos y membranas; otros espermatoцитos no mostraron ningún cambio ultraestructural. En el núcleo, coincidiendo con éstos cambios citoplásmicos, se observó cariólisis; apareciendo con microscopía de luz mal delimitados. Se observó disolución de la cromatina hasta desa-



Túbulo seminífero normal, del grupo control, correspondiente a la etapa V ó VI de ciclo del epitelio seminífero. La pared del túbulo aparece - constituida por espermatogonias, espermátocitos paquiténicos, espermátides poligonales y una generación más avanzada de espermátides del estadio 15 de la espermiogénesis. Obsérvese la gran cantidad de colas que ocupan la luz del túbulo seminífero. Objeto 40 X.

Figura No. 44

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Microfotografía que muestra varios túbulos seminíferos en los que el daño producido por el EMS es evidente. El túbulo señalado (flecha), aparece en sección longitudinal, lo que permite observar la extensión del daño. La disminución de espermatogonias y espermátocitos es muy marcada; pocas colas de espermátides avanzados se ven en la luz de éste túbulo. (Compárese con la Fig. anterior). Objeto 25 X.

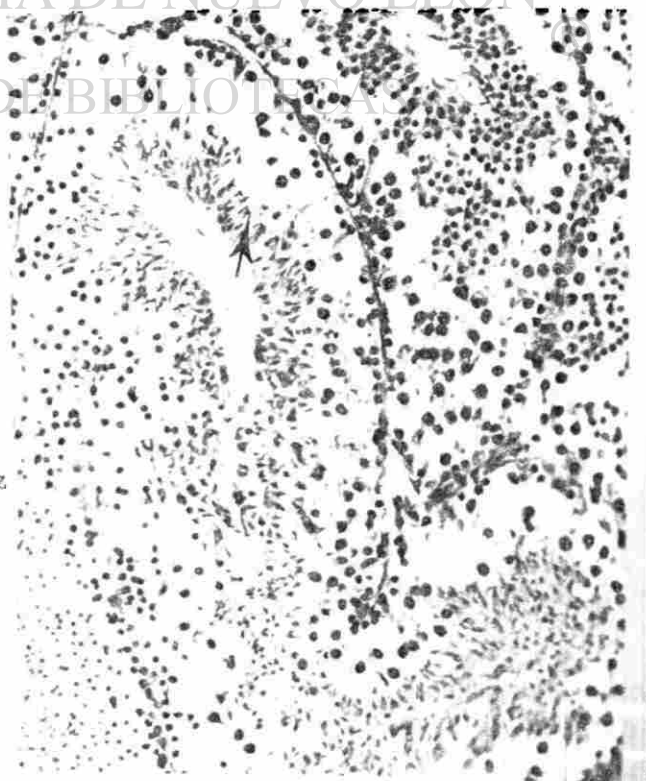


Figura No. 45

parecer por completo. La desaparición de la envoltura nuclear fué confirmada con microscopía electrónica.

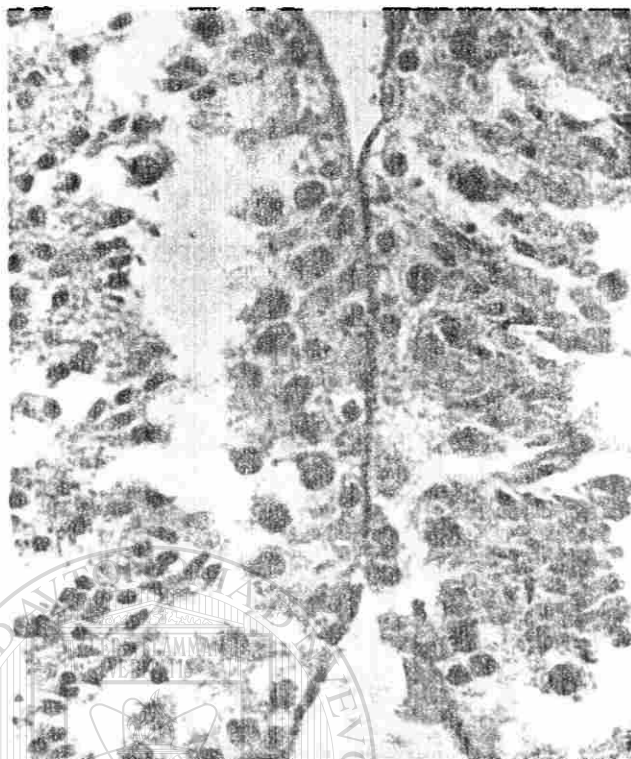
CAMBIOS ESPERMATIDES.

Con microscopía de luz se detectaron fácilmente cambios en espermátides tempranos y algunas formas anormales de espermátides avanzados pudieron observarse en cortes de .25 micras.

a) Número.- Se observó claramente disminución en el número de espermátides en todas las etapas del ciclo del epitelio seminífero poco notable en túbulos de daño leve, pero francamente evidente en túbulos de lesión moderada a severa, en algunos de los cuales los espermátides desaparecieron por completo. Los espermátides faltantes correspondieron en su mayor parte a la Fase de Golgi y de Casquete; la falta de éstas células dió un aspecto desorganizado al epitelio seminífero. Estos cambios numéricos fueron más evidentes a las 4 y 5 semanas después de la administración del EMS, cuando se observó aún en túbulos con daño leve.

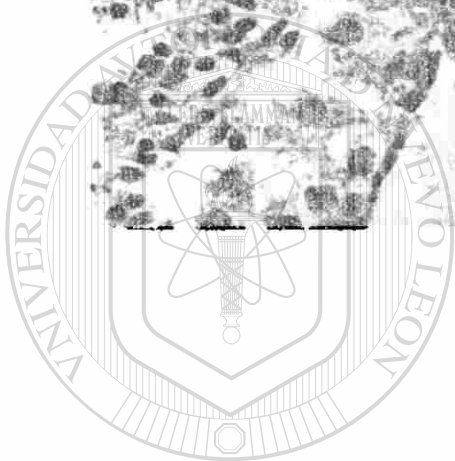
b) Localización.- En túbulos de daño moderado la falta de espermátocitos ocasionó una separación aparente entre los compartimientos basal y adluminal; se observaron espermátides tempranos en sitios anormales, como la luz del tubo seminífero, y ramilletes de espermátides se observaron desprendidos del epitelio. Estos cambios se presentaron siempre acompañando a la disminución de la población de espermátides y espermátocitos.

c) Morfología.- En espermátide en Fase de Golgi y de Casquete (redondos y poligonales), se observaron cambios concordantes con muerte de las células, semejantes a los vistos en espermátocitos paquiténicos: el citoplasma mostró un aspecto filamentososo y disgregado, con pérdida de los límites celulares y de las granulaciones propias del citoplasma, como se pudo observar en cortes de .25 micras (Figs. 45 y 46). Algunas células mostraron franca acidofilia citoplásmica.



Microfotografía en la que se observan tubulillos seminíferos de las etapas IX y X del ciclo del epitelio seminífero. A este aumento resulta evidente la disolución y disgregación del citoplasma de los espermátocitos primarios y la resistencia de los espermátides avanzados al efecto tóxico del EMS. Objetivo 40 X.

Figura No. 46

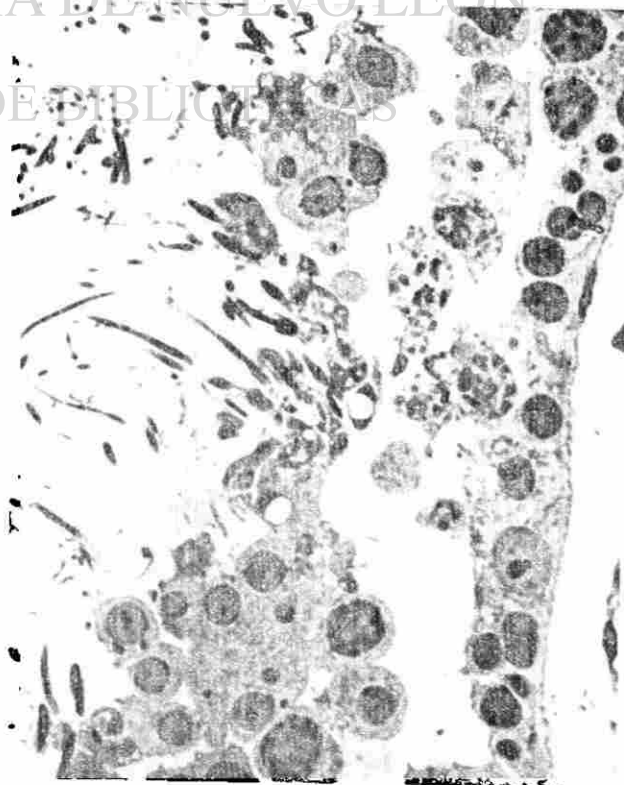


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Corte semifino del tejido testicular incluido en resina LX11. Se observan espermátogonias A y B sin alteraciones aparentes. La porción basal de la célula de Sertoli no muestra alteraciones, pero su citoplasma medio y apical ha desaparecido. Varios espermátocitos paquítonicos muestran disolución citoplásmica y cariólisis. No se observa vacuolización citoplásmica ni picnosis nuclear. Objetivo 100 X.

Figura No. 47



Cambios en la morfología nuclear acompañaron a las alteraciones citoplásmicas en éstas células. Los finos grumos de cromatina desaparecieron dando lugar a la retracción y condensación de la cromatina (picnosis nuclear). Con frecuencia se observaron grupos de espermátocitos con éstos cambios, en la luz del túbulo seminífero. Con microscopía electrónica se pudieron comprobar los cambios necróticos en las células lesionadas.

Pocas células presentaron éstos cambios morfológicos en túbulos con daño leve, y fueron más difusos y marcados en túbulos con daño moderado-severo y sobre todo a las 4 y 5 semanas de la administración del EMS.

No se observaron cambios morfológicos en espermátides en elongación y avanzados, a nivel de microscopía de luz. En algunos casos se observó picnosis, pero por las características normales de éstas células, éste cambio fué difícil de evaluar (Fig. 46).

En cortes semifinos se pudieron observar espermátides en maduración de forma anormal, frecuentes a las tres semanas del tratamiento. Estos túbulos fueron seleccionados para el estudio ultraestructural de espermátides avanzados con la finalidad de indagar los cambios conducentes a la aparición de espermátides de forma anormal.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAMBIOS EN LA CELULA DE SERTOLI

Pocos cambios fueron vistos en éstas células que estuvieron presentes en todas las etapas del ciclo del epitelio seminífero y a las 3, 4 y 5 semanas de la administración del EMS. No se apreciaron cambios en su número ni en su localización.

No se observaron cambios morfológicos en su porción basal donde el núcleo típico y el citoplasma perinuclear fueron de aspecto normal. En las porciones media y apical se observó pérdida del citoplasma en relación con las células espermátogénicas en disolución; ésto fué más notable en el citoplasma apical en relación con grupos de espermátides que se vieron libres en la luz del tú-

bulo (Fig. 47). No se observaron cambios ultraestructurales en éstas células en túbulos de aspecto normal, excepto la presencia de material electrodensó - filamentoso y radiado en relación al acrosoma de espermátides tardíos.

Otros cambios.- Masas acidófilas conteniendo múltiples núcleos picnóticos se vieron en la luz del túbulo seminífero con daño moderado a marcado, y sobre todo a las 4 y 5 semanas de la exposición al agente mutagénico. Estas masas se observaron en relación con áreas donde se observaron espermátides que mostraban picnosis nuclear.

C.- Alteraciones ultraestructurales en la espermatogénesis inducidas por EMS.

Se hizo un análisis con microscopía electrónica del tejido testicular - de los ratones tratados con EMS, para indagar sobre los cambios morfológicos conducentes a la aparición de espermatozoides de forma anormal.

Para éste efecto, se seleccionaron por examen del tejido con microscopio de luz, en cortes de .25 micras, los túbulos en los que no había daño aparente y aquellos en los que fué posible identificar espermátides avanzados de -- forma anormal.

En el examen con microscopio electrónico de los túbulos seleccionados, - las células espermatogénicas que mostraron cambios morfológicos correspondieron a espermátides avanzados.

No se detectaron cambios a nivel de espermatogonias, espermatocitos primarios y secundarios; tampoco hubo cambios morfológicos durante la espermiogénesis temprana; las Fases de Golgi y de Casquete no presentaron alteraciones; al igual que en la fase acrosomal temprana no hubo diferencias entre el tejido tubular de los animales de control y los tratados.

Los cambios morfológicos vistos durante la espermiogénesis fueron referentes a la modelación del acrosoma, la condensación de la cromatina, la modelación del núcleo; la organización de los microtúbulos y la implantación del flagelo. También se observaron fenómenos de duplicación a diversos niveles.



Microfotografía electrónica que muestra espermátides anormales del estadio 9. Al centro aparece uno en sección longitudinal; su núcleo es pequeño. A la izquierda, otro espermátide anormal presenta defecto en la elongación de la cabeza; el acrosoma se ve asociado a un material electrodensode aspecto filamentososo y radiado. (7, 200 X)

F i g u r a No.48



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Espermátides anormales del estadio 9. El núcleo está aplanado en su polo anterior y el acrosoma se limita a éste extremo sin desplazarse caudalmente. Los microtúbulos del manchete no presentan su organización típica. La posición de la fosa de implantación también es anormal. (Compárese con las Figs. 24, 25 y 26). (24, 000 X).

F i g u r a No. 49



A continuación se describirán las formas de espermátides observados, en los túbulos seminíferos seleccionados para estudio ultraestructural.

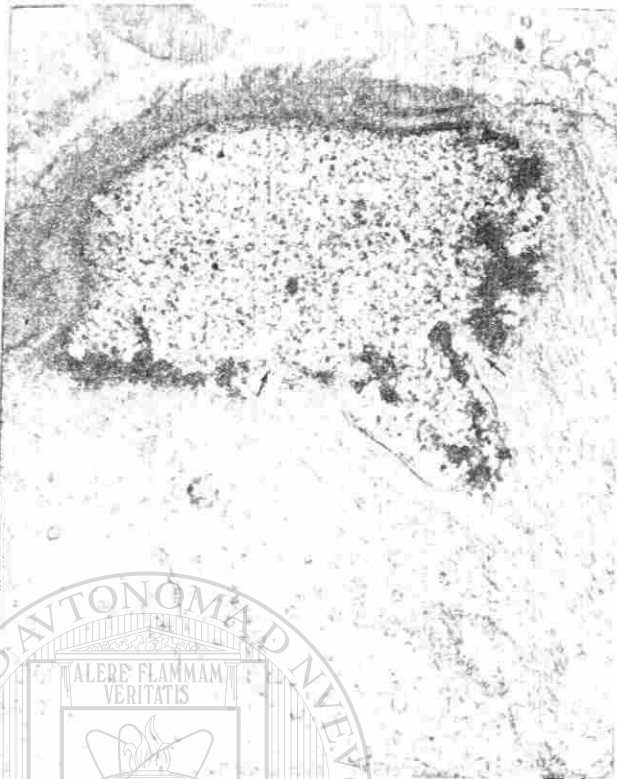
Espermátides de los estadios 9 y 10: Fueron identificados por el tipo de asociación del que forman parte. En muchos de ellos el defecto principal correspondió al aplanamiento del polo anterior del núcleo y a la falta de -- elongación nuclear, que normalmente se presenta en ésta etapa (Figs. 48,49 y 50). También se presentaron en éstos estadios, alteraciones acrosomales; en muchos casos el acrosoma se limitó a cubrir el extremo anterior aplanado del núcleo (Figs. 49 y 50), conservando su aspecto estratificado normal. Con frecuencia se observó la asociación del material acrosomal a gruesas estriaciones electrodensas de disposición radiada, (Figs. 49 y 51), que parecen estar localizadas en el citoplasma de la célula de Sertoli.

En la Fig. 48 uno de los espermátides aparece en sección longitudinal; el núcleo es pequeño y la condensación de la cromatina es ligeramente mayor que en los espermátides de la derecha, de aspecto normal. Tal vez debido al plano de sección en la región de la cabeza no se observa acrosoma, y los microtúbulos presentan un trayecto oblicuo, aunque en el extremo caudal no presentan el arreglo longitudinal característico del Manchette. Se observa la formación del cuello y la pieza intermedia del flagelo, de aspecto normal.

En el cuello es posible observar a los centriolos proximal y distal, -- así como el ánulo. El flagelo se observa en gran parte de su longitud, incluido en el canal flagelar. El citoplasma es muy abundante y presenta gran cantidad de mitocondrias vesiculosas típicas.

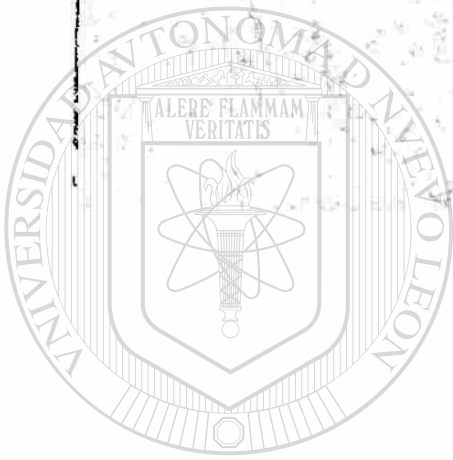
Arriba y a la izquierda en ésta misma fotografía se observa un espermátide también anormal, en el que la elongación del núcleo ha fallado y el acrosoma localizado al rostrum, se asocia a un material filamentosos y electrodensos que se irradia hacia el citoplasma de la célula de Sertoli del que parece formar parte.

En algunos espermátides como el que se muestra en la figura 50, se ob--



Espermátide anormal del estadio 9. El extremo anterior de la cabeza aparece aplanado en sentido perpendicular al eje del espermatozoide. El alargamiento nuclear es defectuoso. La cromatina periférica se presenta en agregados irregulares. En algunos sitios la envoltura nuclear no se observa y los microtúbulos del manchette parecen ponerse en contacto directamente con la cromatina (flechas). (20, 800 X)

Figura No. 50



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Espermátide anormal del estadio 10. La sección corresponde al polo caudal del núcleo, en el cual se observan dos escotaduras. En una de ellas se observan los centriolos y el flagelo, y corresponde a la teca de implantación - que es más profunda y asimétrica. En la otra excavación se observa una gran vesícula que podría corresponder a la envoltura nuclear redundante (flechas). El resto de la célula no presenta alteraciones. (26, 000 X)



Figura No. 51

servó fragmentación de la cromatina periférica. En éste caso la envoltura parece haber desaparecido en algunos tramos en los que la cromatina nuclear -- queda expuesta directamente a los microtúbulos del citoplasma.

Otra observación hecha en éstos espermátides, es la desorganización de los microtúbulos del manchette. En algunos casos, como en la figura 49, mostraron un trayecto oblicuo anormal. En ésta misma micrografía la posición de la fosa de implantación parece ser anormal.

En muchos casos la dirección del plano de sección es difícil de establecer; sin embargo espermátides como los que se observan en las Figs. 51 y 52, no se observaron en el grupo control. El grado de condensación cromatínica y el tipo de asociación de la que forman parte indican que corresponden al estadio 10 de la espermiogénesis. En la Fig. 51 no se observa el acrosoma, el núcleo tiende a ser de forma elíptica, y presenta en uno de sus lados una doble excavación, separadas entre sí por una proyección estrecha. En una de las excavaciones se observan unas estructuras que parecen corresponder al par de centriolos y al flagelo. En la otra excavación se observa una formación vesicular membranosa que contiene un material de escasa electrodensidad y que recuerda a la envoltura nuclear redundante (ver Fig.27). Los microtúbulos aparecen en secciones oblicuas y transversas; el citoplasma vecino es muy abundante y presenta algunas mitocondrias vesiculares típicas.

En la Fig. 52, se presenta una espermátide que en ésta sección muestra una forma elíptica, en el que la envoltura nuclear no puede ser precisada. En uno de los extremos se observa un centriolo en sección transversa, que podría señalar el extremo caudal de la célula, sin embargo, los microtúbulos del manchette parecen tener una dirección opuesta. El acrosoma y la fosa de implantación no se observan, lo que puede ser explicado quizá por el plano de sección.

Espermátides del estadio 12: Se observaron numerosas espermátides del estadio 12 con gran variedad de alteraciones, como los que se muestran en la figura 53. En muchos de ellos se observó de nuevo falta de elongación nuclear,



Espermátide anormal del estadio 10. El núcleo es pequeño y elíptico, presenta disgregación de los agregados densos de cromatina periférica. La envoltura nuclear no se observa. Un centriolo aparece cortado transversalmente en uno de los extremos del núcleo, pero los microtúbulos que aparecen en sección oblicua, se dirigen hacia el extremo opuesto.

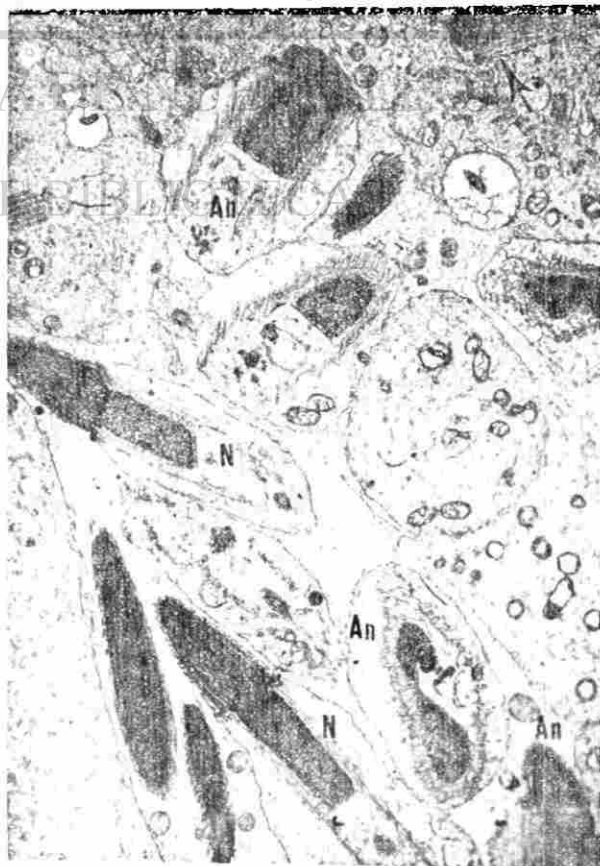
(26, 000 X)

Figura No. 52

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA

Espermátides del estadio 12 normales (N) y anormales (An), algunos de ellos se presentan a mayor aumento en las siguientes figuras. Una forma extremadamente anormal se observa en la parte superior de la microfotografía (flecha) (6, 000 X)

Figura N. 53



aunque la condensación de la cromatina fué de aspecto normal en algunos y en otros fué defectuosa. Estas células mostraban también aplanamiento del extremo anterior (rostrum) de la cabeza, como se observa en el espermátide de la figura 54. El acrosoma permaneció cubriendo sólo el extremo anterior aplanado del núcleo sin extenderse caudalmente como sucede normalmente; ésta alteración se vió asociada a una posición muy anterior por falta de desplazamiento caudal, del anillo nuclear. En éstas formas de espermátides anormales, los microtúbulos del manchete parten en dirección posterior desde el anillo nuclear pero su trayecto es oblicuo y no recto; además en el extremo caudal de la célula con frecuencia no es posible observar la fosa de implantación, aunque el flagelo aparece cortado transversalmente y a cierta distancia de él se observa un agregado de material electrodensó que pudiera corresponder al cuerpo cromatoide.

Otros espermátides del mismo estadio 12 presentaron cambios mucho más severos. El espermátide presentado en la figura 55, que corresponde a una amplificación de la zona indicada en la figura 53, la sección parece ser longitudinal, y el núcleo muestra una profunda escotadura que en su extremo caudal aloja a los elementos propios de la fosa de implantación. Comparándolo con espermátides del estadio 12 normales, resulta evidente que la condensación de la cromatina es defectuosa, por lo que el núcleo aparece menos electrodensó.

Los microtúbulos presentan un patrón desorganizado y trayecto oblicuo por lo que parecen tener una dirección perpendicular al eje longitudinal de la célula.

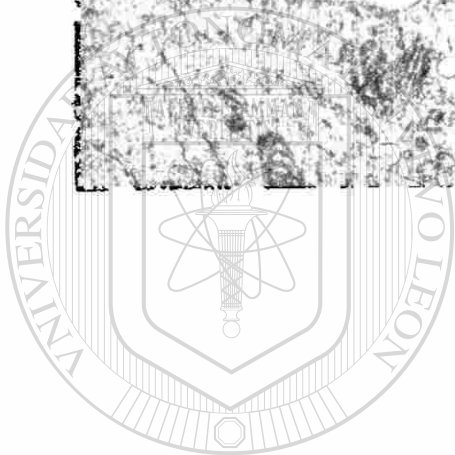
Por el contrario en algunas otras formas anormales de éste estadio la cromatina presentó condensación extrema, asociada a otros defectos como el ya mencionado aplanamiento anterior de la cabeza (Fig.56) ó bien deformidades graves como la observada en el espermátide de la figura 57, en el que de nuevo se observa el material filamentosó electrodensó que en éste caso rodea casi por completo al espermátide, y parece localizarse en el citoplasma vecino



Espermátide anormal del estadio 12. Los defectos son múltiples; el núcleo es muy corto, el acrosoma se limita al extremo anterior del núcleo y su forma es irregular; el anillo nuclear permanece en posición muy anterior. Los microtúbulos presentan un trayecto oblicuo. No se observa la fosa de implantación; el cuerpo cromatoide se ve en el extremo caudal de la célula en relación a estructuras vesiculares.

(13, 500 X)

Figura No. 54



U A N L

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA

Espermátide anormal del estadio 12.

El núcleo presenta una profunda escotadura, en cuyo extremo caudal se identifica la fosa de implantación, la posición anormal. El citoplasma es abundante.

(22, 800 X)

Figura No. 55





Espermátide anormal del estadio 12. El núcleo es muy corto y la cromatina está muy condensada. El acrosoma cubre sólo el extremo anterior del núcleo y en sus extremos se asocia a material electrodenso y filamentosos irradiado hacia la célula de Sertoli. El anillo nuclear aparece en posición muy anterior; los microtúbulos presentan un trayecto anormal.
(15, 000 X)

Figura No. 56



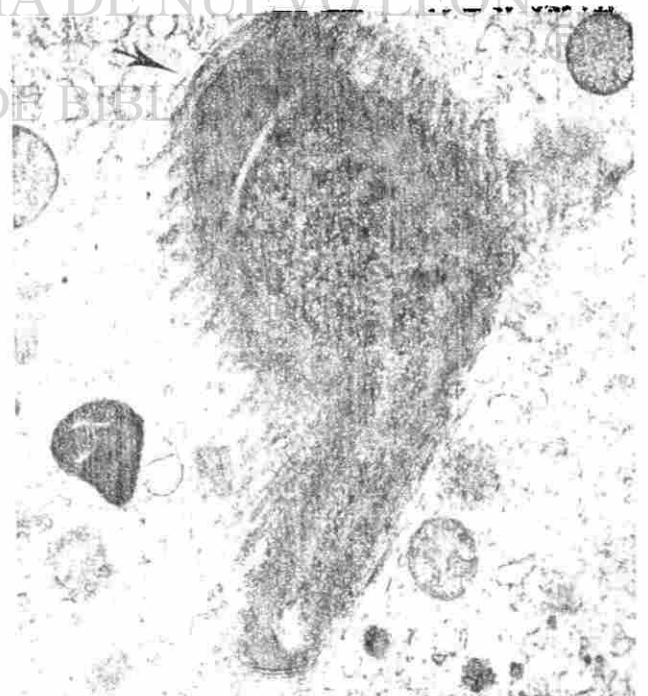
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Espermátide anormal del estadio 12. El extremo anterior se señala con una flecha, donde se observa que el acrosoma y el núcleo están aplastados. Se aprecia de nuevo el material filamentosos descrito anteriormente en relación con el acrosoma. Una proyección lateral que parece corresponder únicamente al material acrosomal es simplemente anormal.

(23, 000 X)

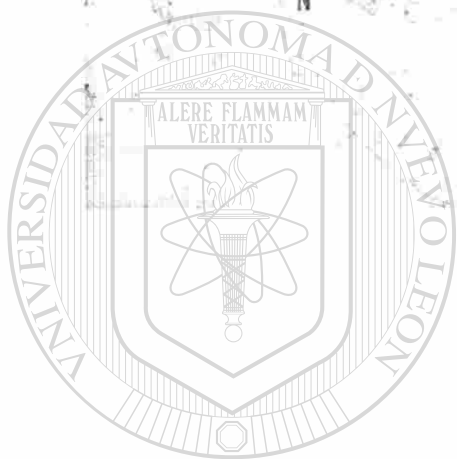
Figura No. 57





Espermátides del estadio 13. Uno de ellos normal (N) y otro anormal (An). En éste último se observan alteraciones ya descritas como lo son el aplastamiento del polo anterior y la falta de desplazamiento del acrosoma y del anillo nuclear. Se observa también un estrechamiento del núcleo en su parte media. Los microtúbulos del manchete presentan un trayecto oblicuo anormal (6, 600 X).

Figura No. 58



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Espermátide anormal del estadio 13. El núcleo es muy largo; un pequeño fragmento nuclear aparece separado de la parte principal del núcleo. Material electrodens del citoplasma de la célula de Sertoli se ve en relación con el extremo anterior del acrosoma (flecha). (17, 000 X)

Figura No. 59



de la célula de Sertoli.

Espermátides del estadio 13: En muchas células de éste estadio, pudo observarse que el aplanamiento rostral descrito en etapas anteriores persiste y el acrosoma sigue limitado al extremo anterior del núcleo; sin embargo, la elongación del resto del núcleo pudo llevarse a cabo. Esto se observa en la figura 58 donde pueden compararse dos espermátides de éste estadio, uno de apariencia normal y otro francamente anormal. El espermátide anormal presenta además, un estrechamiento ó escotadura longitudinal hacia la parte media del núcleo, asociada a microtúbulos de dirección anormal. En otras formas del mismo estadio (Fig.59) el núcleo apareció dividido en dos segmentos: un pequeño fragmento anterior rodeado de material acrosomal y un fragmento mayor alargado de posición caudal, separado del primero por un fino filamento constituido por el material acrosomal y el escaso citoplasma perinuclear. Al parecer éstos espermátides alargados podrían ser precursores de las formas filamentosas de espermatozoides vistas al microscopio de luz.

Otro tipo de defecto acrosomal se observó en espermátides del estadio 13: una larga proyección del acrosoma con aparición de una gran zona central vacía, lo cual se observa en la figura 60, y se ve asociada al material electrodensó; que forma grumos ó filamentos irradiados hacia la célula de Sertoli. La pared de ésta proyección acrosomal es muy densa. Por su aspecto la proyección descrita señala el extremo anterior de la célula, y la posición de los espermátides vecinos indica que ésta célula está invertida.

Espermátides de los estadios 14, 15 y 16: Aunque en los espermátides de éstos estadios ya no se observan microtúbulos, las deformaciones acrosomales y nucleares siguieron observándose. Algunos espermátides presentaron una cabeza corta de polo anterior aplanado, en los que el acrosoma se vió también alterado por su forma irregular y de localización rostral. Estos cambios pueden verse en uno de los espermátides de la figura 61, el cual presenta además una gran vacuola intranuclear que aunque pudiera resultar de la sección en un

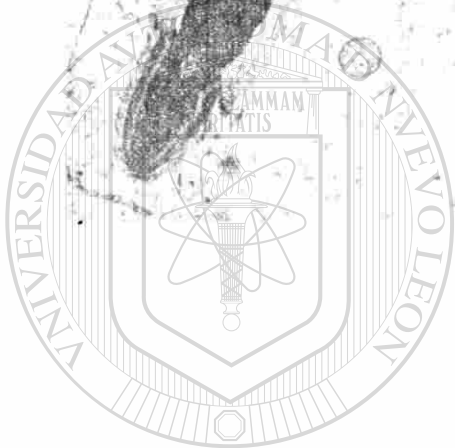


Espermátides del estadio 12 ó 13.

Uno de ellos es anormal (An), por presentar en uno de sus extremos una larga proyección acrosomal que además es vacuolada, y se ve también asociada - el material electrodensó de la célula de Sertoli, descrito en otros defectos acrosomales.

(10, 000 X)

Figura No. 60



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Espermátides del estadio 15, uno normal (N) y otro anormal (An). En éste último el núcleo es corto y aplanado en su extremo anterior. Se observa también una estructura vesicular de contenido amorfo, localizada en el núcleo, que pudiera corresponder a un sitio de flexión extrema que no se observa en espermátides normales. El acrosoma está limitado al extremo anterior del núcleo y es de forma anormal.

(6, 000 X)



Figura No. 61

sitio de flexión nuclear extrema, en ésta especie no se observa normalmente.

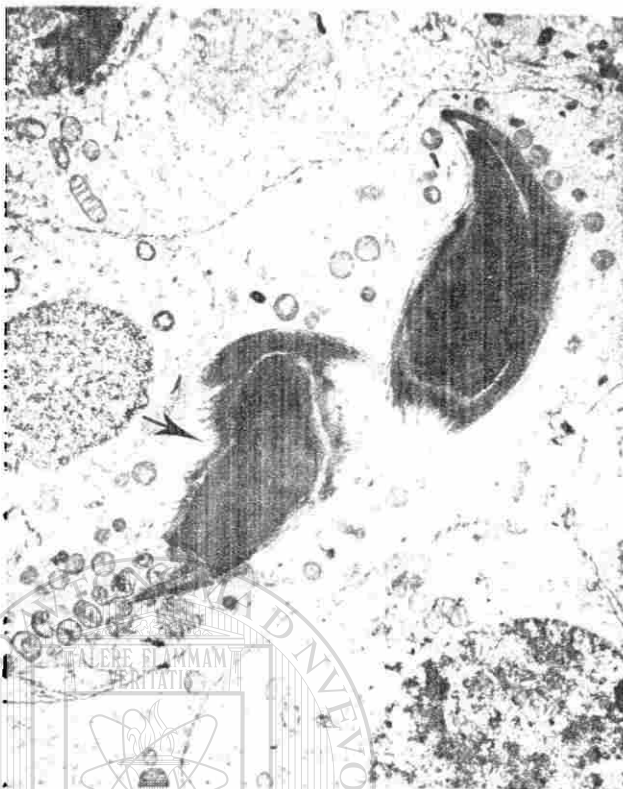
En otros espermátides los defectos fueron menos marcados, localizándose sobre todo a nivel del acrosoma, el cual presentó proyecciones anormales que casi siempre acompañaron a modificaciones leves en la forma del núcleo; alteraciones de éste tipo pueden observarse en la figura 62, en la que uno de los espermátides muestra una excavación nuclear en el dorso y una implantación - del flagelo de situación anormal.

Con frecuencia se observó también el material acrosomal de aspecto estratificado normal asociado a finas proyecciones radiadas del citoplasma vecino de la célula de Sertoli. Esto es evidente en los espermátides observados en la figura 64.

La falta de formación del gancho ó cuerno anterior, fué otro de los defectos mínimos observados en espermátides muy avanzados en su desarrollo (estadios 15 y 16). Generalmente fué acompañado de defectos en la modelación de la forma del acrosoma, observándose en ocasiones proyecciones del material - acrosomal de posición anormal. En la figura 63 se observa un espermátide del estadio 15 que muestra una prolongación ventral completamente anormal. En - éstos espermátides con defectos acrosomales y nucleares mínimos la formación del cuello y pieza intermedia de la cola del espermatozoide, fueron aparentemente normales, como puede verse en la figura 64. Pero los defectos graves - del acrosoma y núcleo se acompañaron de defectos en la implantación y dirección del flagelo.

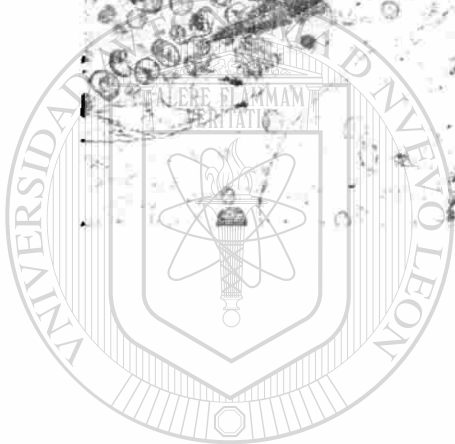
Fenómenos de duplicación: Estos fueron observados en espermátides de - diferentes estadios y fueron mucho más frecuentes que en los del grupo control donde no se observaron éste tipo de fenómenos.

En la figura 65, se muestra una espermátide del estadio 9 que posee 2 núcleos, los cuales aparecen fusionados por su lado dorsal, mediante el material acrosomal que se encuentran compartiendo. El extremo anterior de ambos



Espermátide anormal del estadio 15 (An), que presenta una flexión dorsal anormal (flecha). El acrosoma se asocia al material electrodensso ya descrito. En el extremo caudal del núcleo la implantación del flagelo y dirección del mismo es anormal. (4, 600 X)

Figura No. 62



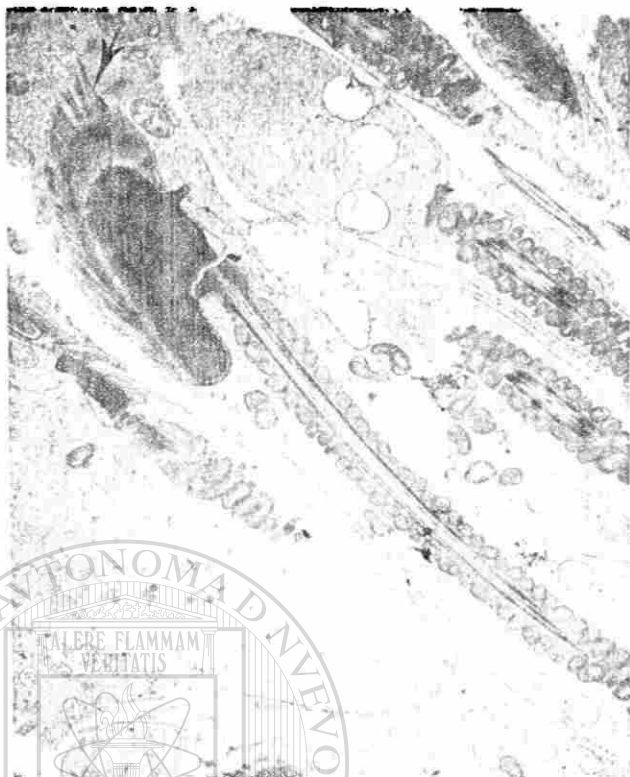
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Espermátide anormal del estadio 15 que presenta defectos acrosomales. La proyección dorsal está muy acentuada, y presenta una proyección ventral que es completamente anormal (flecha). Se observan también microfilamentos del citoplasma de la célula de Sertoli asociados a algunas de éstas malformaciones. Compárese con la Fig. 32. (15, 000 X)

Figura No. 63





Espermátide anormal del estadio 16 en sección longitudinal. El material acrosomal estratificado se ve asociado a los filamentos electrodensos que se irradian al citoplasma de la célula de Sertoli, descrito para formas anormales de estadios anteriores (flecha). El polo caudal del núcleo es muy pronunciado y la fosa de implantación es muy profunda. Se observa un puente citoplásmico entre el espermátide descrito y uno vecino. (11,200 X).

Figura No. 64



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Espermátide anormal del estadio 9, en el que se observan dos núcleos fusionados por uno de sus lados mediante el material acrosomal. El extremo anterior del núcleo es alargado. La cromatina nuclear muestra agregados densos en el interior y en la periferia. El extremo caudal de cada núcleo presenta una excavación, y juntos constituyen la fosa de implantación; en el citoplasma abundante se observan mitocondrias y estructuras vesiculares limitadas por una unidad de membrana. (9,000 X).

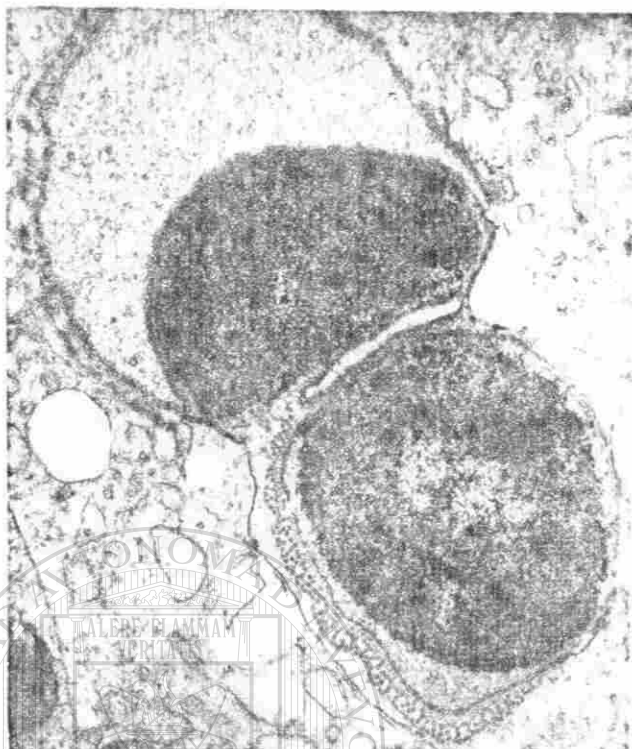


Figura No 65

núcleos está aplanado y en uno de ellos el acrosoma se limita al rostro del núcleo. En el extremo caudal se observa una sola fosa de implantación que es compartida por los dos núcleos.

En etapas más avanzadas se vieron espermátides del estadio 14 ó 15, consideradas así según el grado de condensación de su cromatina, que presentaban también dos núcleos. En el que se observa en la figura 66, los núcleos aparecen fusionados por uno de sus lados; asociados a la duplicación nuclear se observan en éste espermátide defectos de elongación y acrosomales. El material acrosomal es muy poco denso y en uno de ellos se puede observar una gran dilatación del acrosoma, cuyo aspecto recuerda las primeras etapas de formación acrosomal.

En la figura 67 se observa otra forma de espermátide anormal correspondiente al estadio 16. El espermátide es bicéfalo, y las dos cabezas aparecen fusionadas por su extremo caudal. El acrosoma no parece estar bien desarrollado y el citoplasma perinuclear es muy abundante. La formación del flagelo, que aparece en sección transversa, es también aparentemente defectuosa ya que carece de vaina mitocondrial; la mayor parte del citoplasma ocupa la región caudal y en él pueden identificarse un grupo de microtúbulos, algunas estructuras vesiculares y un agregado de material electrodenso, pero no se observan mitocondrias.



Espermátide anormal en el que se observan dos masas nucleares que aparecen fusionadas lateralmente. El acrosoma tiene aspecto vacuolar de contenido flocular de poca electrodensidad y semeja la vesícula acrosomal de estadios tempranos del espermiogénesis. En el citoplasma vecino se observan microtúbulos en corte transversal. (24, 700 X)

Figura No. 66



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Espermátides anormales del estadio 16 que presentan dos núcleos en un sólo - flagelo cortado transversalmente que carece de vaina fibrosa y mitocondrial. El citoplasma es muy abundante. Los - microtúbulos del manchete, el cuerpo cromatoide y algunas estructuras membranosas vesiculares se localizan en el extremo caudal. (26, 000 X).

Figura No. 67



V. D I S C U S I O N .

La cepa híbrida utilizada en éste estudio resultó de mucha utilidad por presentar un porcentaje sumamente bajo de espermatozoides de forma anormal. Así, observamos el efecto que la cruce de las cepas endogámicas produce sobre el porcentaje de formas anormales; coincidiendo con lo descrito por Kra_zanowska (1968 y 1976) en sus estudios de heterosis, y de acuerdo a lo propuesto por Wyrobeck (1979), el porcentaje de formas anormales de espermatozoides resultó ser en éste experimento, menor que en los genotipos paternos.

El efecto del EMS, sobre la espermatogénesis, fué fácilmente detectado por las elevaciones producidas en el número de espermatozoides anormales. A éste respecto las observaciones hechas en éste experimento concuerdan con lo reportado por Wyrobeck (1975); aunque las elevaciones en el porcentaje de formas anormales fueron en nuestro estudio menores (12%) que las reportadas por Wyrobeck, a dosis y tiempo de exposición comparable (más del 20%); la elevación máxima se produjo a las cuatro semanas. Por otra parte, los tipos

de alteraciones morfológicas vistas correspondieron en general a los descritos por otros autores (8,9) pero la forma filamentosa descrita en éste estudio no había sido reportada.

El intervalo entre el tratamiento y el tiempo de muestreo de los espermatozoides indican cuales etapas han sido afectadas con base a la vida media de las células espermatogénicas (12,69,98). Considerando lo anterior, a las tres semanas de tratamiento estaremos observando los cambios producidos en espermátides tempranos; a las cuatro semanas se observará el efecto del tratamiento sobre espermatocitos y a las cinco semanas sobre espermatogonias.

Las formas anormales de espermatozoides inducidas a las cuatro semanas y los espermátides anormales observados a las tres semanas del tratamiento representarán por lo tanto a células que fueron expuestas al EMS en etapa de espermatocito primario.

El mecanismo de producción de éstas anomalías aún se discute. Se ha sugerido que en general las etapas de espermatogonias tardías a espermátocitos tempranos son los estadios celulares más sensibles a la acción de los agentes químicos, en la producción de espermatozoides anormales (98). Sin embargo el EMS tiene la capacidad de atravesar la barrera hematotesticular, por lo cual puede actuar sobre estadios postmeióticos (73,102). Se ha reportado que éste agente produce mutaciones letales dominantes, aberraciones cromosomales y mutaciones de punto en células espermatogénicas, específicamente en espermátides y espermatozoides. Esto parece estar relacionado con la falta de sistemas reparadores del daño genético en éstos estadios (57).

En cuanto a las alteraciones gruesas producidas por el EMS en el epitelio seminífero del ratón, el principal cambio observado fué la disminución de la población celular. A diferencia de lo reportado para la Mitomicina C y las radiaciones ionizantes por Leonard y Guilliavod (1973), la disminución sucede a expensas de los espermátocitos y no de las espermatogonias.

Aunque se observó disminución en el número de espermatogonias, éste cambio fué discreto y pudiera deberse a la falta de mitosis, ya que éste agente afecta la síntesis de DNA (102) y ya que no se apreciaron cambios indicativos de muerte en éstas células. El efecto citotóxico de la Mitomicina C sobre las espermatogonias no fué visto a consecuencia del EMS; los espermátides avanzados tampoco fueron susceptibles al efecto tóxico de ésta droga. Resultaron ser más susceptibles a éste efecto, los espermátocitos y espermátides tempranos, - en los que se produjo la muerte a la dosis administrada de EMS. También se ha reportado muerte de espermátocitos y espermátides por 5-fluorouracilo, Cis-platinum (63) y por hexafluoroacetona (33).

Los cambios observados más frecuentemente en las células afectadas por el EMS, fueron cariólisis y citólisis. La picnosis nuclear no parece ser un cambio indicador de muerte en los espermátocitos. Tampoco se observó la franca vacuolización del citoplasma, descrita para otros agentes tóxicos en éstas cé

lulas (60).

Un aspecto morfológico importante que influye sobre el efecto de los - agentes mutagénicos sobre las células espermatogénicas, es la presencia de - puentes intercelulares entre espermatogonias y espermatocitos, así como el - englobamiento de espermátides por las células de Sertoli (24); por éste motivo es posible que en cualquiera de éstas etapas el daño producido a una célula pueda transmitirse a todo el grupo, como se ha visto después de la aplicación de radiaciones ionizantes (37). La extensión del daño producido inicialmente en espermatocitos aislados a los de las regiones vecinas, observado en éste experimento, pudiera ser explicado igualmente por la presencia de tales puentes intercelulares.

. Para el estudio ultraestructural de los cambios inducidos en células - espermatogénicas del ratón, a consecuencia del EMS, se descartaron los túbulos en los que el efecto tóxico de éste agente causó graves alteraciones y muerte de las células. La selección de túbulos con daño mínimo ó sin él, tuvo el propósito de detectar cambios sutiles en la morfología de las células espermatogénicas, que pudieran dar información relacionada con los mecanismos que condujeron a las formas anormales de espermatozoides.

Los resultados de éste estudio indican que el daño causado por el EMS, sea cual fuere su índole se manifiesta en la espermiogénesis avanzada.

En la literatura se encontraron pocos estudios ultraestructurales sobre los cambios inducidos en la espermatogénesis a consecuencia de diferentes tipos de drogas. Parvinen (1979a), reporta alteraciones en espermatocitos zigoténicos y paquiténicos medios, así como en espermátides redondos, a consecuencia de la administración de Procarbazina. En nuestro estudio no se detectaron cambios en ninguna etapa previa a los estadíos 9 y 10 de la espermiogénesis.

Nuestros hallazgos concuerdan con las alteraciones reportadas en ratones mutantes estériles, que presentan un porcentaje elevado de formas anormales de espermatozoides (17,18,38,40). Alteraciones en el arreglo de los micro

túbulos, indentaciones nucleares anormales y fallas en la elongación nuclear, semejantes a las observadas en éste experimento para el EMS, se han reportado en un ratón estéril, homocigoto para el alelo T (17,18).

Igualmente se han descrito malformaciones acrosomales y defectos de la citocinesis que conducen a la formación de espermatozoides bicéfalos, en ratones estériles con un gen mutante que ocasiona además marcha a saltos, polidactilia y esterilidad (38).

Otro ratón mutante, con esterilidad y ojo rosa, también presenta espermiogénesis alterada, encontrándose en éste caso defectos en el proacrosoma - de espermátides tempranos y formación de colas múltiples (40).

Según los cambios observados en espermiogénesis avanzada en nuestro experimento, podríamos deducir que los espermatozoides amorfos vistos con elevada frecuencia a las cuatro semanas del tratamiento con EMS, son producidos por falla principalmente en los mecanismos de elongación en espermátides de los estadios 9 y 10; la falta de desplazamiento del anillo nuclear puede ser el cambio inicial aunado a defectos de condensación de la cromatina. Se ha sugerido que en el caso del EMS, la alquilación de la cisteína podría evitar la formación de puentes disulfuro e interferir con la condensación de la cromatina (citado por Lyon 1981).

La formación de los microtúbulos del manchete parece iniciarse normalmente, pero en algunos casos se vió desorganización en relación a defectos de la envoltura nuclear. Se ha propuesto que ésta falla en el mantenimiento en el arreglo de los microtúbulos podría reflejar una anomalía subyacente en las características estructurales y bioquímicas de las membranas con las que se asocian (17). El papel de los microtúbulos en la morfogénesis de espermatozoides anormales se ha evidenciado también con la aplicación de colchicina - (34).

Las formas filamentosas observadas con microscopía de luz; podrían originarse por las segmentaciones nucleares que se presentaron en espermátides -

avanzadas. En éstos casos de nuevo se observa una estrecha relación con la presencia de microtúbulos de dirección anormal, que parecen ser los causantes de ésta malformación.

Las alteraciones mínimas del gancho de los espermatozoides detectadas con el microscopio de luz, corresponden ultraestructuralmente a malformaciones en el acrosoma y en el polo anterior del núcleo, que se ven en espermátides por lo demás de aspecto normal. Otros cambios que al igual éstas alteraciones parecen ser independientes del patrón microtubular alterado, son las vacuolas acrosomales y nucleares y los defectos en la implantación del flagelo. Las formas bicéfalas y fenómenos de duplicación nuclear vistas al microscopio electrónico, podrían originarse en falla en la citocinesis.

Desde hace tiempo se ha sugerido que la morfogénesis del espermatozoide se encuentra bajo un estricto control genético (48,65). La complejidad del proceso de espermiogénesis y la multiplicidad de organelos involucrados sugieren que la forma del espermatozoide era controlada por varios genes diferentes (98). Estudios genéticos han identificado cerca de 10 regiones génicas que afectan la morfología del espermatozoide, y están distribuidos en los cromosomas X y Y, así como en los autosomas (8,17,38,40,48). Estos genes representan sin duda un gran blanco para los agentes mutagénicos.

Los factores genéticos que controlan el nivel y tipo de formas anormales de espermatozoides, tienen un patrón de herencia recesiva, aunque efectos aditivos parecen estar involucrados en la determinación del nivel de formas anormales (98).

Las anomalías morfológicas inducidas por agentes químicos ó físicos sobre los espermatozoides pueden ser transmitidas como una mutación genética dominante que puede ó no afectar la fertilidad ó asociarse con aberraciones cromosomales gruesas (10,95). Sin embargo las alteraciones en la morfología del espermatozoide no parecen estar ligadas a la integridad de los cromosomas ni al contenido de DNA (98).

Algunos autores han señalado que las mutaciones letales dominantes producidas por el EMS, se presentan por daño al DNA en la etapa de transición - de histonas a protaminas (citado por Lyon 1981). Segal (1978) señala que el EMS produce etilación del DNA y de las protaminas (87); sin embargo no parecen ser éstos los cambios que originan las alteraciones morfológicas que conducen a espermatozoides anormales.

Se ha postulado que errores en la producción, modificación ó degradación de las proteínas nucleares, puedan conducir a alteraciones en la cabeza del espermatozoide (10,90).

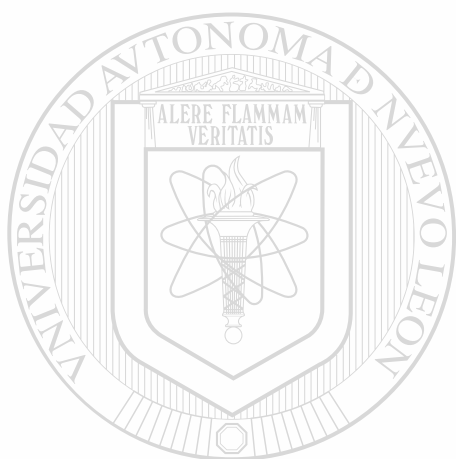
Los resultados de ésta investigación parecen indicar que siendo los cambios morfológicos evidentes en espermátides de los estadios 9, 10 y estadios posteriores, el daño producido por el EMS, tendrá lugar en estadios previos. Dado que la elevación producida en el nivel de espermatozoides anormales ha sido mayor a las cuatro semanas, parece ser que las alteraciones morfológicas tendrían su origen en el daño ocasionado a nivel de espermatoцитos primarios y espermatogonias diferenciadas, independientemente de que el daño sea ó no de naturaleza genética.

En vista de que los cambios ultraestructurales en la espermiogénesis, son muy semejantes a los reportados para mutaciones genéticas que causan esterilidad en ratones, las alteraciones morfológicas producidas por el EMS, podrían ser originadas en el daño al DNA y no a las proteínas nucleares.

Al margen de todo ésto debemos considerar aquí, que la célula de Sertoli posiblemente juegue un papel importante en la génesis, de al menos, algunas de las alteraciones observadas. Desde hace tiempo se reconoce la importancia de la célula de Sertoli en el proceso de espermiogénesis (25).

La consistente observación de la relación entre malformaciones acrosomales y la presencia de material electrodensó filamentoso de aspecto radiado, en el citoplasma vecino, sugiere que tales defectos acrosomales podrían ser

consecuencia de alteraciones producidas en la célula de Sertoli.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES.

Se administró un agente mutagénico: Etilmetanosulfonato, a dosis de 200 mg/Kg de peso, a ratones de la cepa (C57BL X C3H)F1, diariamente durante 5 días consecutivos, por vía intraperitoneal; a consecuencia de este tratamiento, se presentó en los ratones una elevación en el porcentaje de formas anormales de espermatozoides que fué mayor a las 4 semanas del tratamiento - (de 1.8 hasta 14.6); entre éstas formas anormales de espermatozoides se encontraron formas sin gancho, espermatozoides amorfos, bicéfalos y filamentosos. Este último tipo de espermatozoide anormal no había sido reportado en la literatura a consecuencia de la administración de agentes químicos ó de radiaciones ionizantes.

Para indagar sobre la forma de producción de éstas alteraciones se hizo un estudio morfológico con microscopía de luz y electrónica de los túbulos seminíferos de los ratones tratados con EMS.

El estudio con microscopía de luz demostró diversos grados de lesión tubular, observándose mayor número de túbulos lesionados a las 4 semanas después del tratamiento. Se produjeron notables cambios en la morfología del epitelio seminífero; la población celular disminuyó considerablemente a consecuencia del efecto citotóxico del EMS sobre todo a nivel de espermatoцитos y espermátides tempranos, que mostraron cariólisis y citólisis. Se observó también una disminución discreta sobre el número de espermatoгонias y su índice mitótico, lo cual refleja la falta de síntesis de DNA producida por el agente mutagénico. Por el contrario, pocas alteraciones se observaron en espermátides avanzados (localización anormal) y en células de Sertoli (disrupción del citoplasma) y fueron consecutivas a la desorganización del epitelio seminífero, por la falta de otros tipos celulares.

A nivel ultraestructural, los cambios que conducen a la producción de espermatozoides anormales, si bien pudieran tener su origen en alteraciones genéticas tempranas, se manifiestan sólo tardíamente en la espermatogénesis observándose en nuestro estudio solamente cambios en los espermátides de los estadios 9 a 16.

Estos cambios en la espermiogénesis implican una gran cantidad de estructuras. Se observaron cambios nucleares referentes a la condensación cromatínica que fué mayor de lo normal en algunas formas de espermátides anormales. Otros cambios cromatínicos vistos, fueron la formación de agregados densos e irregulares en la periferia, así como modificaciones en la forma del núcleo, que con frecuencia se observó muy corto y aplanado en su extremo anterior. Por lo general éstos defectos nucleares se presentaron acompañados de cambios del acrosoma, que en éstas formas permanecía cubriendo solamente el extremo anterior del núcleo.

Sin embargo se observaron otros defectos acrosomales independientes de las alteraciones nucleares y relacionadas en cambio con alteraciones en el citoplasma de la célula de Sertoli. Los defectos acrosomales más graves (formas vacuoladas), parecen corresponder a fallas en estadios tempranos del desarrollo de éstas estructuras.

Los defectos en la elongación nuclear parecen ser los determinantes de la producción de espermatozoides amorfos; la falta de desplazamiento caudal del anillo nuclear podría ser uno de los mecanismos implicados en esta malformación.

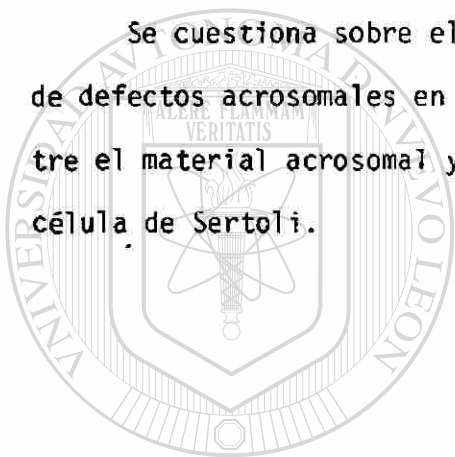
Los microtúbulos del manchete, son importantes en la producción de espermátides sumamente largos; el trayecto oblicuo en algunos casos, es responsable además de segmentación nuclear; éstos cambios fueron vistos en espermátides del estadio 13 y son seguramente antecesores de las formas filamentosas de espermatozoides.

Las formas de espermatozoides con defectos mínimos, observados con mi

microscopía de luz, corresponden a espermátides con alteraciones leves, sobre todo defectos en la formación del gancho y modelación del acrosoma ó defectos leves en la forma del núcleo.

Finalmente observamos espermátides con dos núcleos que presentaron diversos grados de fusión ó separación. Generalmente éstos fenómenos de duplicación nuclear se acompañaron de alteraciones en el desarrollo de otras estructuras.

Se cuestiona sobre el papel de la célula de Sertoli en la producción de defectos acrosomales en los que se vió constantemente la asociación entre el material acrosomal y material electrodensó de aspecto anormal de la célula de Sertoli.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



VII. PERSPECTIVAS.

A pesar de que en la presente investigación no se hayan detectado, es posible que los cambios morfológicos que culminan con la producción de espermatozoides de forma anormal se inicien tempranamente en la espermiogénesis y sean evidentes aún en fase de Golgi. Un estudio ultraestructural de los túbulos seminíferos dos semanas después del tratamiento con EMS, pudiera permitir la detección de dichas alteraciones.

De acuerdo con los resultados de éste estudio y con otros reportes (42, 62), los microtúbulos constituyen un factor muy importante en la producción de alteraciones en la espermiogénesis. Un estudio más minucioso con métodos que permiten una observación más detallada de los microtúbulos, en espermátides expuestos al EMS, podría proporcionar mayor información sobre la formación, número, dirección y distribución de éstas estructuras.

El modelo experimental utilizado podría servir también para estudios ultraestructurales enfocados al análisis de la evolución de las alteraciones acrosomales, de la envoltura nuclear ó de la heterocromatina señaladas en éste estudio como elementos que intervienen en la producción de espermatozoides anormales morfológicamente. Un estudio del comportamiento del retículo endoplásmico, recientemente señalado como uno de los elementos responsables de la diferenciación sincrónica en éstas células (13), podría indicar su papel en la producción de espermatozoides anormales, producidos por el EMS.

Igualmente el estudio con microscopía electrónica enfocado a la célula de Sertoli, sobre todo en lo referente al citoesqueleto, permitiría establecer su importancia en la inducción de espermatozoides de forma anormal.

Los mecanismos implicados en la producción de espermatozoides anormales, por diferentes tipos de drogas podrían ser semejantes ó diferentes entre sí. Un estudio morfológico comparativo, con microscopía de luz y electrónica de túbulos seminíferos de ratones tratados con distintos agentes quí-

micos, reportados como inductores de espermatozoides anormales (92,95,103), podría proporcionar información sobre éstos mecanismos.

En el campo de la aplicación clínica, los hallazgos de nuestra investigación, podrían servir como punto de comparación en el estudio con microscopía electrónica de biopsias testiculares en:

- a) Pacientes sometidos a tratamiento con drogas oncolíticas ó fármacos en los que se sospecha la inducción de daño en las células espermatozógenas, sobre todo en individuos en edad reproductora.
- b) Personas expuestas a agentes contaminantes del ambiente ó del lugar de trabajo (50,51,84,91), en los que la potencia genotóxica de tales agentes podría ser establecida por éste tipo de estudios.
- c) Pacientes con infertilidad (21) ó bien en:
- d) La investigación del factor masculino en los casos de aborto habitual -- (39). En éstos dos últimos casos, las alteraciones ultraestructurales en la espermiogénesis, podrían ser factores determinantes de tales problemas, y semejantes a los producidos por agentes mutagénicos en otros mamíferos.

B I B L I O G R A F I A .

- 1.- Adler, I.D. (1974). Comparative cytogenetic study after treatment of mouse spermatogonia with Mitomycin C.
Mut. Res. 23:369-379
- 2.- Ames, B.N.; W.E. Durston; E. Yamasaki y F.D. Lee (1973). Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for - activation and bacteria for detection.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70:2281-2285
- 3.- Ashby, J. y I.F.A. Purchase (1977). The selection of apropiatte chemical class controls for use with short-term tests for potential carcinogenicity.
Ann. Occup. Hyg. 20:297-301
- 4.- Bellvé, A.R.; J.C. Cavicchia; C.F. Milette, D.A. O'Brien; Y.M. Bhatnagar y M. Dym. (1977). Spermatogenic Cells of the prepuberal mouse. Isolation.
Int. J. of Cell Biol. 74:68-85
- 5.- Bloom, W. y D. Fawcett (1978). Tratado de Histología. 7a. Ed. Ed. Labor.
- 6.- Bratmanska, J. y Y. Clermont (1983). Renewal of type A Spermatogonia in adult rats.
Cell. Tissue Kinet. 16:135-143
- 7.- Bruce, W.R. y M.L. Meistrich (1972). Spermatogenesis in the mouse. Proc. 1st. Internat. Conf. on cell differentiation. Copenhagen Munksgaard: 295-299

- 8.- Bruce, W.R.; R. Furrer y A.J. Wyrobeck (1974). Abnormalities in the shape of murine sperm after acute testicular irradiation.
Mut. Res. 385-386
- 9.- Bruce, W.R. y Heddle (1979). The mutagenic activity of 61 agents as determined by the micronucleus, Salmonella and sperm abnormality -- assays.
Can. J. Genet. Cytol. 21:319-333
- 10.- Brusick, D.J. (1978). Alterations of germ cells leading to mutagenesis and their detection.
Envirom. Health Persp. 24:105-112
- 11.- Cassidy, S.L.; K.M. Dix; T. Jenkins (1983). Evaluation of a testicular sperm head counting technique using rats exposed to dimethoxyethyl phthalate (DMEP), glycerol Alfa-monochlorohydrin (GMCH), Epichlorohydrin (ECH), Formaldehyde (CFA), or methyl methanesulphonate (MMS).
Arch. Toxicol. 53:71-78

- 12.- Clermont, Y. y M. Trott (1969). Duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the mouse and hamster determined by means of ^3H - thymidine and radioautography. *Fert and Steril.* 20:805-817
- 13.- Clermont, Y. y A. Rambourg (1978). Evolution of the Endoplasmic Reticulum during rat Spermiogenesis. *The Am. J. of Anat.* 151:191-211
- 14.- Cooper, J.A.; R. Saracci and P. Cole (1979). Describing the validity of carcinogen screening tests. *Br. J. Cancer* 39:87-89
- 15.- Challice, C. 1953. Electron microscopic studies of spermiogenesis. *J. Roy. Micros. Soc.* 73:115-127
- 16.- Dixon, R.L. y I.P. Lee (1973). Possible role of the blood testicular barrier in dominant lethal testing. *Environ. Health testing.* 59-63
- 17.- Doohar, G.B.; y D. Bennett (1974). Abnormal microtubular systems in mouse spermatides associated with a mutant gene and the T-locus. *J. Embryol. Exp. Morph.* 32:749-761
- 18.- Doohar, G.B.; y D. Bennett (1977). Spermiogenesis and spermatozoa in sterile mice carrying different lethal T/t locus haplotypes: A transmission and scanning electron microscopic study. *Biol. of Reproduc.* 17:269-288
- 19.- Dunn, G.R. y H.I. Kohn (1981). Some comparisons between induced and spontaneous mutation rates in mouse sperms and spermatogonia. *Mut. Res.* 80:159-164
- 20.- Dym, M. (1973). The fine structure of the monkey (Macaca) Sertoli cells and its role in maintaining the blood-testis barrier. *Anat. Rec.* 175:639-656
- 21.- Escalier, D. (1983). Human spermatozoa with large heads and multiple flagella: A quantitative ultrastructural study of 6 cases. *Biol. Cell.* 48:65-74
- 22.- Flak, H.L. (1981). Extrapolating carcinogenesis data from animals to humans. *Fed. Proc.* 39:76-79
- 23.- Farber, E. (1981). Chemical carcinogenesis. *New. Engl. J. of Med.* 305: 1379-1389
- 24.- Fawcett, D.; D. Slautterback y S. Ito (1959). The occurrence of intercellular bridges in groups of cells exhibiting synchronous differentiation. *J. Biophys. Biochem Cytol.* 5:453-460
- 25.- Fawcett, D.W.; W.A. Anderson; y D.M. Phillips (1971). Morphogenetic factors, influencing the shape of the sperm head. *Dev. Biol.* 26:220-251
- 26.- Ficsor, G.; y L.C. Ginsberg (1980). The effect of hydroxyures and mitomycin C on sperm motility in mice. *Mut. Res.* 70:383-387

- 27.- Ficsor, G.: N.M. Salama; K.K. Block; C.L. McIntire; y L.C. Ginsberg - (1982). Germ cell-specific decrease of acrosomal proteolytic activity sperm motility and number in mitomycin C treated mice. *Teratog. Carcinogen. and Mutag.* 2:13-18
- 28.- Flikinge, C., y Fawcett, D.W. (1967). The Junctional specializations of Sertoli cells in the seminiferous epithelium. *Anat. Rec.* 158:207-222
- 29.- Gardner, P.J. y E.A. Holyoke (1964). Fine structure of the seminiferous tubule of the Swiss mouse. I. The limiting membrane, Sertoli cell, spermatogonia and spermatocytes. *Anat. Rec.* 150:391-404
- 30.- Gardner, P.J. (1966). Fine structure of the seminiferous tubule of the swiss mouse. The spermatid. *Anat. Rec.* 155:235-250
- 31.- Guillivod, N. y A. Leonard (1971). Test for mutagenic effects of chemicals in mice. I. Effects of mitomycin C on spermatogonia. *Mot. Res.* 13:274-275
- 32.- Gilula, N.B.; D.W. Fawcett y A. Aoki (1976). The Sertoli cell occluding junctions and Gap Junctions in mature an developing, mammalian testis. *Dev. Biol.* 50:142-168
- 33.- Guillies, P.J. y Ki P. Lee (1983). Effects of Hexafluoroacetone on Testicular Morphology and Lipid Metabolism in the Rat. *Toxicol. and Appl. Pharmacol.* 68:188-197
- 34.- Handel, M.A. (1979). Effects of colchicine on spermiogenesis in the mouse. *J. Embryol. exp. Morph.* 51:73-83
-
- 35.- Hayat, M.A. (1972). Basic electron microscopic techniques. Van Nostrand Reinhold Co.
- 36.- Huckins, C. (1971). The spermatogonial stem cell pipulation in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. *Anat. Rec.* 169:533-558
- 37.- Hugenholtz, A.P. y W.R. Bruce (1983). Radiation induction of mutations affecting sperm morphology in mice. *Mut. Res.* 107:177-185
- 38.- Hunt, D.M.; and D.R. Johnson (1971). Abnormal spermiogenesis in two pink-eyed sterile mutants in the mouse. *J. Embryol. Exp. Morph.* 26:11-121
- 39.- Joel, C.A. (1966). New etiologic aspects of habitual abortion and infertility, with special refference to the male factor. *Fent. and Steril* 17:373-380
- 40.- Johnson, D.R. y D.M. Hunt (1971). Hop-sterile, a mutant gene affecting sperm tail development in the mouse. *J. Embryol. Exp. Morph.* 25:223-236
- 41.- Kaye, J. (1958). Changes on the fine structure of mitochondria during spermatogenesis. *J. Morph.* 102:347-400

- 42.- Kessel, R.G. (1966). The association between microtubules and nuclei during spermiogenesis in the dragonfly. *J. Ultrastructural Res.* 16:293-304
- 43.- Kessel, R.G. and Spaziani E. (1969). Nuclear morphogenesis in rat - spermatids. *J. Cell Bio.*, (Abstr. 160) 67a.
- 44.- Kierzenbaum, A.L.; y L.L. Tres (1975). Structural and Transcriptional features of the mouse spermatid genome. *J. of Cell. Biol.* 65:258-270
- 45.- Kilbey, B.J.; M. Legator; N. Nichols and C. Ramel (1977). Handbook of mutagenicity test procedures. Elsvier, Sc. Pub. Co.
- 46.- Komatsu, H.; T. Kakizoc; T. Nijima; T. Kawachi y T. Sugimura (1982). Increases sperm abnormalities due to dictary restriction. *Mut. Res.* 93:439-446
- 47.- Krazanowska, H. (1969). Factors responsible for spermatozoan abnormality located on the Y chromosome in mice. *Genet. Res.* 13:17-24
- 48.- Krazanowska, H. (1976). Inheritance of sperm head abnormality types - in mice- the role of the Y chromosome. *Genet. Res. Camb.* 28:189-198
- 49.- Lahdetie, J. (1983). Micronuclei induced during meiosis by ethylmethanesulfonate, cyclophosphamide and dimethybenzantracene in male rats. *Mut. Res.* 120:257-260
- 50.- Lancranjan, I.; H.I. Popescu; O. Gavanescu; I. Klepsch; M. Sarbanescu (1975). Reproductive ability of workmen occupationally exposed to lead. *Arch. Environ Health* 30:396-401
-
- 51.- Land, P.C.; E.L. Owen; and H.W. Linde (1979). Mouse sperm morphology - following exposure to anesthetics during early spermatogenesis. *Anesthesiology* 51:42
- 52.- Langman, J. (1981). Embriología Médica. 4a. Ed. Panamericana; Buenos Aires, Argentina.
- 53.- Leonard, A. y N. Guillivod (1973). Testicular changes in mice after - treatment with Mitomycin C. *Toxicol.* 1:217-223
- 54.- Lu, Ch. C. y M.L. Mesitrich (1979). Cytotoxic effects of chemotherapeutic drugs on mouse testis cells. *Ca. Res.* 39 (9):3575-3582
- 55.- Lufts, J.H. (1961). Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. and Biochem. Cytol.* 9:409-
- 56.- Luna, L.G. (1960). Manual of histologic staining methods, of the Armed Forces. Inst. of Pathology. Third Ed. Mc. Graw Hill Book Co.
- 57.- Lyon, F.M. (1981). Sensitivity of various germ-cell stages to environmental mutagens. *Mut. Res.* 87:323-345
- 58.- Mancini, (1968): El testículo humano. Bases histofisiológicas de la función testicular. Simposio organizado para el fomento de los estudios endocrinológicos y metabólicos de Rosario. Ed. Med. Panamericana, Buenos Aires pp 11-45

- 59.- Maramatsu, S. (1974). Frequency of spontaneous translocations in mouse spermatogonia. *Mut. Res.* 24:81-82
- 60.- Márquez-Orozco, M.C.; A. Márquez-Orozco; A. Samano. Bishop; M. Lorenzana-Jiménez y R. Rodríguez-Carranza (1983). Histological and ultrastructural alterations of the testis of rat induced by chronic inhalation of paint thinner. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 26:81-82
- 61.- Mayer, F.F.; y B.R. Zirkin (1979). Spermatogenesis in the mouse. I. Autoradiographic studies of nuclear incorporation and loss of ^3H -aminoacids. *J. of Cell. Biol.* 81:403-410
- 62.- Mc. Intosh, J.R. y K.Porter (1967). Microtubules in the spermatids of the domestic fowl. *J. of Cell. Biol.* 35:153-173
- 63.- Meistrich, M.L.; M. Finch; M.F. da Cunha; V. Hacker, W.W. Au. (1982). Damaging effects of fourteen chemotherapeutic drugs on mouse testis. *Ca. Res.* 42:122-131
- 64.- Monesi, V. (1962). Autoradiographic study of DNA synthesis and the cell cycle in spermatogonia and spermatocytes of mouse testis; using titiated thymidine. *J. Cell. Biol.* 14:1-19
- 65.- Monesi, V. (1965). Synthetic activities during spermatogenesis in the mouse: RNA and proteins synthesis. *Exp. Cell Res.* 39:197-224
- 66.- Montagna, W. 1967. Anatomía Comparada. 2da. Ed. Editorial Omega, S.A. Barcelona, España
- 67.- Nagano, T. y F. Zuzuki (1976). The postnatal development of the junctional complexes of the mouse Sertolli cells as revealed by freeze fracture. *Anat. Rec.* 185:403-418
- 68.- Oakberg, E.F. (1956). A description of spermatogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am J. Anat.* 99:391-413
- 69.- Oakberg, E.F. (1957). Durations of spermatogenesis in the mouse. *Nature.* 180:1137-1138
- 70.- Oakberg, E.F. (1971). Spermatogonial stem cell renewal in the mouse. *Anat. Rec.* 169:515-532
- 71.- Oakberg, E.F., C.D. Croshwalt y G.D. Rayner (1982). Spermatogenic Stage Sensitivity to 6-mercaptopurine in the mouse. *Mut. Res.* 94:165-178
- 72.- Oakberg, E.F. y C.D. Crosthwalt (1983). The efect of ethyl, methyl and hidroxyethyl-nitroso urea on the mouse testis. *Mut. Res.* 108:337-344.
- 73.- Okumara, K; I.P. Lee and R.L. Dixon (1975). Permeability of selected drugs and chemicals across the blood-testis barrier of the rat. *J. Pharm. and Expltol. Tox.* 194:89-94

- 74.- Pacchierotti, F.; D. Bellicampi and D. Civitareale (1983). Cytogenetic observations, in mouse secondary spermatocytes, on numerical and structural chromosome aberrations induced by cyclophosphamide in various stages of spermatogenesis. *Mut. Res.* 119:177-183
- 75.- Parvinen, L.M. (1979a). Early effects of Procarbazine (N-isopropyl-L-) (z-methylhidrazine)-p-Tpluamide hidroclorehida) on rat Spermatogenesis. *Exp. Mol. Pathol.* 30 (1):1-11
- 76.- Parvinen, M. y L.M. Parvinen (1979b) Active movements of the chromatoid body. A. Possible transport mechanism for haploid gene products. *J. of Cell. Biol.* 80:621-628
- 77.- Philips, D.M. (1972). Substructure of the mammalian acrosome. *J. Ultrastr. Res.* 38:591-604
- 78.- Purchase, I.F.H.; J. Ashby (1977). Short term tests for carcinogenicity *Ann. of Ocup. Hyg.* 20:234.
- 79.- Rathenberg, R.y D. Muller (1972). Comparative cytogenetic studies of the influence of Phenylbutazone and cyclophosphamide on spermatogenesis in the mouse. *Agents and actions.* 2:180-185
- 80.- Rathner, J.B. y B.R. Brinkley (1972). Ultrastructure and morphogenesis of the manchette during rodent spermiogenesis. *S. Ultrastr. Res.* 41:209-218
- 81.- Redi, C.A.; S. Garagna; C. Pellicciari (1982). Cytochemical assessment of chromatin characteristics during sperm cyto-differentiation in mouse. *Bass. Appl. Histochem,* 26, 279-288
-
- 82.- Robertis, E. De, y De Robertis (h). (1981). Fundamentos de Biología Celular y molecular. Primera Edición. Editorial El Ateneo. ®
- 83.- Robbins, S.L. y R.S. Cotran (1980). Patología Estructural y Funcional. 2da. Ed. Nueva Ed. Interamericana
- 84.- Sandifer, S.H.; R.T. Wilkins; C.B. Loadholt, L.G. Lane; and J.C. Eldridge (1979). Spermatogenesis in Agricultural Workers Exposed to Dibromochloropropane (DBCP). *Bull. Envirom Contam. Toxicol.* 23:703-710
- 85.- Sarafis, V., R.W. Lambert and W.G. Breed (1981). Sperm head of the plains mouse *Pseudomys australis.* *J. Reprod. Fert.* 61:399-401
- 86.- Sawada, T. (1957). An electron microscopic study of spermatid differentiation in the mouse; *Okajimas Fol. Anat. Jap.,* 30:73-80.
- 87.- Sega, G.A.; M.R. Kelly; J.C. Owens y V.C. Carricarte (1983). Caffeine pretreatment enhances the unscheduled DNA Synthesis in Spermatids of mice exposed to methylmethane sulfonate. *Mult. Res.* 108 (1983), 345-358

- 88.- Sharma, R.K.; G.T. Roberts; F.M. Johnson y H.V. Malling (1979). Translocation and sperm abnormality assays in mouse spermatogonia treated with Procarbazine. *Mut. Res.* 67:385-388
- 89.- Shindo, Y.; F. Hirano; H. Maeda y V. Takeda (1983). The micronucleus test with mouse sperm spleen cells. *Mut. Res.* 121:53-57
- 90.- Soares, E.R.; W. Sheridan; J.K. Haseman y M. Segall (1979). Increased frequencies of aberrant sperm as indicators of mutagenic in mice. *Mut. Res.* 64:27-35
- 91.- Steinberger, E. (1981). Current status of studies concerned with evaluation of toxic effects of chemicals on the testes. *Environ Health - Persp.* 38:29-33
- 92.- Sterns, L.; K.C. Kleene; B. Gold y N.B. Hecht (1983). Gene expression during mammalian spermatogenesis. III. Changes in populations of mRNA during spermiogenesis. *Exp. Cell. Res.* 143:247-255
- 93.- Streisinger, G. (1983). Extrapolations from species to species and from various cell types in assessing risks from chemical mutagens. *Mut. Res.* 114:93-105
- 94.- Takao, I. (1982). The continuity of Endoplasmic Reticulum in rat spermatides observed by Scanning Electron Microscopy. *J. Electron Microsc.* 31:261-263
- 95.- Topham, J.C. (1980). Chemically-induced transmissible abnormalities in sperm-head shape. *Mut. Res.* 70:109-114
- 96.- Whorton, D.; R.M. Krauss; S. Marshall, T.H. Milby (1977). Infertility in male pesticide workers. *The Lancet*, 17:1259-1261
- 97.- Wyrobeck, A.J. and Bruce, A.J. (1975). Chemical Induction of Sperm abnormalities in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72:4425-
- 98.- Wyrobeck, A.J. (1979). Changes in mammalian sperm morphology after X-ray and chemical exposures. *Genetics.* 92:105-119
- 99.- Wyrobeck, A.J.; G. Watchmaker; L. Gordon; K. Wong; D. Moore II; and D. Whorton (1981). Sperm shape abnormalities in Carbaryl Exposed employees. *Environmental Health Perspectives* 40:255-265
- 100.- Zamboni, L.; R. Zemjanis y M. Stefanini (1971a). The fine structure of monkey and human spermatozoa. *Anat. Res.* 169:129-154
- 101.- Zamboni, L.; and M. Stefanini (1971b). The fine structure of the neck of mammalian spermatozoa. *Anat. Res.* 169:155-172
- 102.- Zeeland, A.A. Van; G.R. Mohn; C.S. Aaron; B.W. Glickman; M. Brendel; F.J. Serres; C.Y. Hong y H.E. Brockman (1983). Molecular dosimetry of the chemical mutagen ethylmethanesulfonate. *Mut. Res.* 119:45-54
- 103.- Zdzienicka, M.; M. Hryniewicz y M. Pienkowska (1982). Thiram induced sperm head abnormalities in mice. *Mut. Res.* 102 (1982). 261-264

