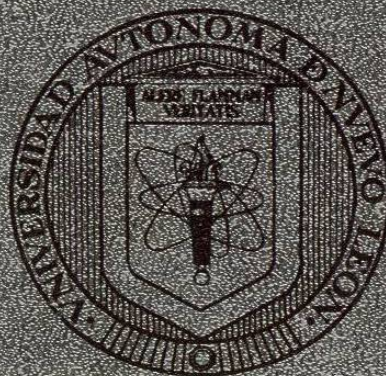


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



CAMBIOS EN LA ULTRAESTRUCTURA ESPERMATICA EN RATONES  
HIBRIDOS (C57BL X CDI)<sub>F1</sub>, TRATADOS CON ETILMETANOSULFONATO

TESIS

QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON  
ESPECIALIDAD EN MORFOLOGIA

PRESENTA

BIOLOGA BERTHA CONCEPCION RIOS CANTU

MONTERREY, NUEVO LEON

14 DE FEBRERO DE 1992

TM

Z66

FM

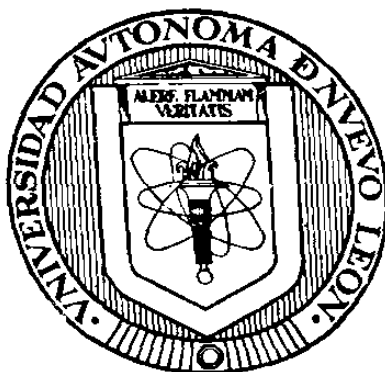
199

R5



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**CAMBIOS EN LA ULTRAESTRUCTURA ESPERMATICA EN RATONES  
HIBRIDOS (C57BL X CDI)<sub>F1</sub> TRATADOS CON ETILMETANOSULFONATO**

**T E S I S**

**QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON  
ESPECIALIDAD EN MORFOLOGIA**

**PRESENTA**

**BIOLOGA BERTHA CONCEPCION RIOS CANTU**

**MONTERREY, NUEVO LEON**

**14 DE FEBRERO DE 1992**

TM  
Z6658  
FM  
1992  
KS



FONDO TESIS

165568

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

CAMBIOS EN LA ULTRAESTRUCTURA ESPERMATICA EN RATONES  
HIBRIDOS (C57BL X CDI)<sub>F1</sub> TRATADOS CON ETILMETANOSULFONATO

TESIS

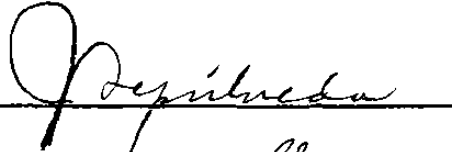
QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON  
ESPECIALIDAD EN MORFOLOGIA

PRESENTA

BIOLOGA BERTHA CONCEPCION RIOS CANTU

APROBADA POR LA SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO DE LA  
FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO  
LEON

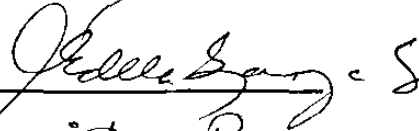
Dr. Julio Sepúlveda Saavedra  
PRESIDENTE



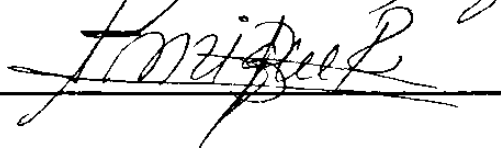
Dra. Guadalupe Gallegos de Lerma  
1<sup>er</sup> VOCAL



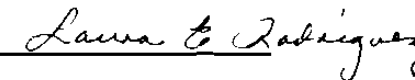
Dr. Carlos Enrique de la Garza González  
2<sup>o</sup> VOCAL



Q.F.B. Enrique Ramírez Bon  
3<sup>er</sup> VOCAL



Biól. M.C. Laura Ernestina Rodríguez Flores  
SECRETARIO



MONTERREY, N.L. FEBRERO DE 1992.

## INDICE

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
<b>I.- Introducción. . . . .</b>	<b>1</b>
<b>II.- Antecedentes. . . . .</b>	<b>3</b>
<b>A.- La Espermatogénesis como Modelo Experimental . . . . .</b>	<b>3</b>
<b>B.- La Acción de Mutágenos y Carcinógenos sobre         la Espermatogénesis . . . . .</b>	<b>5</b>
<b>C.- El Etil Metano Sulfonato (EMS) como         Mutágeno Experimental . . . . .</b>	<b>7</b>
<b>D.- El estudio de los Espermatozoides como prueba         de mutagenicidad . . . . .</b>	<b>10</b>
<b>E.- Morfología Normal del Espermatozoide         de Mamífero . . . . .</b>	<b>12</b>
<b>III.- Material y Método . . . . .</b>	<b>17</b>
<b>IV.- Resultados. . . . .</b>	<b>22</b>
<b>A.- Microscopía de Luz . . . . .</b>	<b>22</b>
<b>1) Determinación del Porcentaje de Formas             Anormales . . . . .</b>	<b>22</b>
<b>2) Número de Espermatozoides por ml . . . . .</b>	<b>23</b>
<b>3) Motilidad Espermática . . . . .</b>	<b>24</b>
<b>B.- Microscopía Electrónica . . . . .</b>	<b>29</b>

<b>V.- Discusión y Conclusiones . . . . .</b>	<b>54</b>
<b>VI.- Resumen . . . . .</b>	<b>60</b>
<b>VII.- Bibliografía . . . . .</b>	<b>62</b>



**La presente investigación fue realizada en el Laboratorio de Biología Celular, Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L con apoyo de la Facultad de Ciencias Biológicas de la misma Universidad.**

**ASESORA: MCP y M.C. Guadalupe Gallegos de L.**

**CO-ASESOR: Q.F.B. Enrique Ramírez Bon.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al haber llegado a este momento de mi desarrollo profesional deseo hacer patente un profundo y sincero agradecimiento a la Dra. M.C. Guadalupe Gallegos de L., Jefe del Laboratorio de Biología Celular, Departamento de Patología, quien siempre estuvo atenta en la dirección para la elaboración de este trabajo, así como también por su gran apoyo y consejos brindados para poder llegar a la terminación del mismo.**

**Al Dr. Julio Sepúlveda Saavedra, coordinador de la Maestría en Ciencias con especialidad en Morfología, por el interés brindado en las correcciones hechas en este trabajo y su importante asesoría en la revisión del presente escrito.**

**Al Q.F.B. Enrique Ramírez Bon por su valiosa colaboración en las observaciones hechas al Microscopio Electrónico así como también en el procesamiento del material fotográfico.**

**Al Dr. Carlos E. de la Garza González por su valiosa y desinteresada colaboración en la traducción de varios artículos en idioma alemán, y su invaluable asesoría en la realización de este escrito.**

**A la BIól. Laura E. Rodríguez Flores por sus comentarios basados en su experiencia en cuestiones metodológicas en el Laboratorio, y su buena disposición en la revisión del presente escrito.**

**A la Técnica de Laboratorio Srta. Petra Montoya Coronado muy especialmente por su amable y valiosa cooperación en la parte técnica de este trabajo.**

**Al Q.B.P. José Ruiz Ordoñez, por su atenta colaboración al hacer las observaciones en el microscopio electrónico en la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L.**

**A la Técnica de Laboratorio Sra. Ma. de la Luz Elizondo Cisneros, por su desinteresada colaboración en el procesamiento de material fotográfico.**

**A la Dra. Ruth Alvarez Cantú e Irma D. de Virgen, encargadas del Bioterio, por el mantenimiento de la línea de ratones utilizados en este trabajo.**

**Al Lic. Roberto Mercado Hernández por su amable disposición para colaborar en la elaboración de gráficas por computadora.**

**Al Biól. Gerardo Guajardo Martínez por su apoyo brindado durante la realización de este trabajo, lo cual me permitió continuar con el mismo en los momentos de desaliento.**

**A todas aquellas personas que de una u otra forma me apoyaron para continuar con el desarrollo de esta investigación.**

## **DEDICATORIA**

**El esfuerzo realizado en este trabajo lo dedico:**

**A mi hijo Jacob Hiram con mucho amor**

**A mi Madre y mi hermana Blanca por su gran apoyo**

**A mi Padre con cariño**

## INTRODUCCION

En las últimas dos décadas, los estudios sobre el efecto de agentes químicos en el epitelio seminífero y las células germinales masculinas, han sido relevantes en consideración a la acción esterilizante de algunos agentes (McLeod, 1974; Steber y Adamson, 1975), y al potencial teratogénico y mutagénico de otros (Wyrobeck y Bruce, 1975).

Además de interferir con la fertilidad, la producción de espermatozoides con alteraciones morfológicas, se ha utilizado como parámetro que indica la posible acción mutagénica de agentes físicos y químicos. Este modelo fue propuesto por A. J. Wyrobeck en 1975, sustentando que la detección de un aumento en el número de formas anormales de espermatozoides era indicativa de daño al material genético de las células espermátogénicas expuestas.

La prueba de la morfología espermática no profundiza en la investigación de los mecanismos implicados en la producción de espermatozoides de forma anormal; de entre ellos nosotros consideramos que el conocimiento de la acción de esos agentes a nivel subcelular, se encuentra en primer plano. Bajo éste punto de vista, se ha desarrollado una línea de investigación en éste laboratorio, para analizar primeramente el -

proceso de morfogénesis del espermatozoide bajo la acción de un mutágeno conocido (el etil metano sulfonato: EMS).

Se caracterizaron las alteraciones ultraestructurales que tienen lugar principalmente en espermátides y son relativas a la formación anormal del núcleo y acrosoma, y a falla del proceso de citocinesis, pero para correlacionar estos hallazgos con el tipo de anomalías morfológicas que se detectan con microscopio de luz a nivel de los espermatozoides, falta aún evidencia ultraestructural.

Ante esta situación nos propusimos llevar a cabo este trabajo con el **OBJETIVO de: CARACTERIZAR ULTRAESTRUCTURALMENTE LOS ESPERMATOZOIDES ANORMALES DE RATONES TRATADOS CON EL AGENTE MUTAGENICO ETIL METANO SULFATO**, suponiendo que los cambios en la forma de los espermatozoides obtenidos de los ratones tratados con el etil metano sulfonato (EMS) corresponden a alteraciones en la ultraestructura del núcleo y acrosoma principalmente, que pueden ser demostrados al microscopio electrónico.

## **ANTECEDENTES**

### **A) LA ESPERMATOGÉNESIS COMO MODELO EXPERIMENTAL**

**Bruce y Meistrich, en 1972, describieron la espermatogénesis como un sistema particularmente favorable para el estudio de los eventos de diferenciación celular, destacando que este proceso conduce a un solo tipo celular, es altamente sincrónico y está localizado en un órgano específico, además de que comprende notables cambios en la estructura y composición química de las células implicadas. El proceso de espermatogénesis como cualquier otra secuencia de diferenciación celular, está bajo control genético y comprende una multitud de modificaciones en el metabolismo celular, lo cual obviamente ocasiona una susceptibilidad variable a agentes tóxicos.**

**Debido a que la síntesis de DNA ocurre durante la espermatogénesis solo a nivel de espermatogonias, y en espermatocitos preleptoténicos, son estas células las más sensibles a influencias tóxicas de agentes físicos y químicos (Parvinen et al., 1984), aunque el daño puede llegar a ser evidente solo en estadíos posteriores.**

**Cualquiera que sea el mecanismo por el que se produzcan los trastornos de la espermatogénesis, pueden traducirse como la disminución en la formación de células germinales, aumento de muerte de las células o malformaciones de las mismas; estas últimas se presentan como**



**espermatozoides morfológicamente anormales en el eyaculado. Las malformaciones de las células germinales pueden poseer detalles histológicos tan finos, que no sean observables con microscopía de luz. Estas malformaciones en los espermatozoides, podrían ser detectadas únicamente con microscopía electrónica (Holstein y Shirren, 1977).**

**En la valoración del efecto de tóxicos sobre la espermatogénesis, debe considerarse además que pueden existir células germinales aisladas en degeneración, inclusive en los testículos de cualquier hombre fértil. A esta situación, que ocurre en aproximadamente 35 % de las células durante el desarrollo de la espermatogonia hasta espermatíde, se le conoce como pérdida fisiológica de células germinales (Holstein, 1986).**

**En cada uno de los estadios de la espermatogénesis, pueden aparecer células germinales malformadas. Las malformaciones en las espermatogonias se manifiestan como múltiples vesículas marginales de la membrana nuclear, núcleos aumentados de volumen e inclusive un aumento en el número de núcleos. Los espermatoцитos anormales muestran la formación de un núcleo gigantesco, tal vez poliploide, edema nuclear, grumosidad del carioplasma, además de núcleos en degeneración (Holstein, 1978).**

En las espermátides se encuentran una gran variedad de malformaciones, siendo las más frecuentes los defectos en el acrosoma. Se han descrito: engrosamiento, depósito de vesículas, elevación del acrosoma, desarrollo de plegamientos, grumosidades, uniones nucleares múltiples de espermátides debido a vesículas acrosómicas en la parte media etc. Existen también modificaciones nucleares: formación de vacuolas, depósito de membranas y masas globulares amorfas asociadas a trastornos en la condensación nuclear. Las malformaciones del flagelo son extremadamente complejas, pudiendo estar afectados el cuello, la pieza media o la pieza principal. Pueden encontrarse ausencia de la vaina mitocondrial, engrosamiento de la vaina fibrosa, separación de la estructura tubular del axonema, formación doble de la cola o falta de alguno de los túbulos en la estructura 9 + 2 del flagelo (Holstein y Schirren, 1977; Holstein, 1978).

#### **B) LA ACCION DE MUTAGENOS Y CARCINOGENOS SOBRE LA ESPERMATOGENESIS.**

Como ya se mencionó, la espermatogénesis comprende una serie de eventos bioquímicos que la hacen extremadamente susceptible a la acción tóxica de agentes químicos y físicos. Entre ellos son de particular importancia los agentes genotóxicos, ya que no solo tienen efecto mutagénico sino también carcinogénico (Working y Butterworth, 1982).

Los agentes alquilantes de acción carcinogénica, favorecen los rompimientos cromosómicos por la alquilación de átomos de oxígeno nucleofílicos, relativamente débiles en el DNA particularmente el O<sub>6</sub> de la guanina (Newbold et al, 1980).

Aunque se mencionan una amplia variedad de agentes que producen estas mismas modificaciones químicas, su potencia genotóxica variará de una especie a otra de mamíferos y aún entre individuos de la misma especie, pero con campos ambientales o genéticos diferentes. Además, se observan grandes diferencias en la susceptibilidad que los diferentes tipos de células espermatogénicas tienen, para un mismo agente y los patrones de susceptibilidad varían de un agente a otro (Roberts y Warwick, 1958; Cumming y Walton, 1979).

Por otra parte, en la extrapolación de datos obtenidos de sistemas de ensayos de mutagenicidad in vitro al hombre debe recordarse, que hay una barrera hematotesticular (BHT) que comprende un sistema multicelular complejo formado por membranas que rodean a los túbulos seminíferos y las varias capas de células espermatogénicas organizadas en dichos túbulos, los cuales restringen la permeabilidad hacia las células germinales de varios compuestos (Okumara et al., 1975).

La barrera hematotesticular es impermeable a grandes moléculas e inclusive a algunas pequeñas, pero admite libremente otras, incluyendo agua, urea y etanol. Por lo tanto la accesibilidad de químicos a las células germinales depende de su capacidad para cruzar dicha barrera. Entre las pequeñas moléculas que no cruzan la barrera se encuentran la insulina, la sacarosa y varios esteroides. La solubilidad en lípidos, más que el tamaño molecular, determina la capacidad de barbituratos y sulfonamidas para penetrar la barrera hematotesticular. Entre los mutágenos, el EMS, el metil metano sulfonato y la dimetilnitrosamida son conocidos por pasar dicha barrera, por lo tanto pueden actuar en períodos postmeióticos (Okumara et al., 1975; Zeeland et al., 1983).

### C) EL EMS COMO MUTAGENO EXPERIMENTAL

El EMS se conoce desde 1958 (Roberts y Warwick) cuando se introdujo como droga antineoplásica, pero por su alta toxicidad actualmente se utiliza solo como mutágeno experimental.

Cumming y Walton (1979) estudiaron el metabolismo del EMS, para lo cual inyectaron EMS marcado con C<sup>14</sup> intraperitonealmente a ratones macho, y posteriormente cuantificaron la radioactividad presente en diferentes tejidos homogenizados; estos autores encontraron que el EMS se distribuye rápidamente en el organismo, ya que a los 15 minutos después de la -

Inyección se detecta radioactividad a nivel de los tejidos estudiados. Sin embargo, en las primeras 4 horas el movimiento es relativamente lento, después se acelera notablemente hasta alcanzar los testículos, el epidídimo y el bazo en forma uniforme y activa, proporcionalmente a la dosis administrada, e hidrolizándose después rápidamente. En los tejidos activos para detoxificación y eliminación (Hígado, Riñón y Pulmón) se observa una mayor concentración de radioactividad que se conserva por períodos más largos. Un factor probablemente importante en la capacidad alquilante de estos compuestos (EMS y MMS) "in vivo", es el grado al cual ellos son hidrolizados bajo esas condiciones antes de que tengan la oportunidad de alquilar moléculas de importancia biológica. Puesto que la hidrólisis compete con la reacción de alquilación, este es uno de los factores que la limita.

Entre los efectos producidos por el EMS que se conocen, están: Mutaciones letales dominantes, aberraciones cromosómicas y mutaciones de punto en células espermatogénicas, específicamente en espermátides y espermatozoides, lo cual parece estar relacionado con la falta de sistemas reparadores del daño genético en estos estadios (Cumming y Walton, 1979; Lyon, 1981).

Generoso et al., (1974) midieron el daño genético causado por el etil metano sulfonato en ratones macho a dosis que variaron de 50 a 300 mg/Kg

de peso, observando translocaciones heredables y mutaciones letales dominantes, para ello se determinó la fertilidad de los machos expuestos al mutágeno por medio de la cruce con hembras normales a las que se les cuantificó la presencia de embriones muertos. Estos autores encontraron que la frecuencia de mutaciones letales dominantes, fue comparable a cada una de las dosis empleadas, con una reducción significativa en el número de embriones vivos y un incremento en la frecuencia de embriones muertos. La dosis más baja que indujo un incremento detectable de mutaciones letales dominantes, fue de 150 mg/Kg, y a dosis más altas del mutágeno (250-300 mg/Kg), se presentó un incremento notable de las mismas; sin embargo a una dosis de 50 mg/Kg puede detectarse daño genético, como aumento en el porcentaje de translocaciones heredables.

Los resultados del análisis citogénético en meiosis (Prueba de espermatocitos en células germinales de ratón C57BL X CDI), muestran alteraciones que se relacionan con rompimientos cromosómicos y corresponden a anillos y cadenas multivalentes, así como fragmentos cromosómicos en espermatocitos de los animales tratados con el mutágeno químico EMS (Rodríguez et al, 1989).

Estudios bioquímicos han revelado que el DNA en la mayoría de los espermatozoides de vertebrados, está asociado con un solo tipo de

proteínas, las protaminas. Estas proteínas son extremadamente básicas; entre 55 y 70 % de los aminoácidos en las protaminas son arginina. Además, todas las protaminas de mamíferos contienen numerosos residuos cisteína y estos aminoácidos son usados para generar uniones disulfuro entre moléculas de protamina adyacentes durante las etapas finales de maduración de la cromatina, cuando los espermatozoides dejan el testículo y atraviesan el epidídimo (Palhorn, 1982).

En 1978, Sega y Owens determinaron que las protaminas son etiladas por mutágenos diversos, entre ellos el EMS, inhibiendo la condensación normal de la cromatina al etilar los grupos sulfhidrilos de los aminoácidos que los contienen. Se impide así la formación de los enlaces disulfuro, produciéndose una gran presión del filamento de cromatina, lo cual posteriormente puede provocar rompimiento cromosómico. En el mismo trabajo se determinó que la dosis promedio de EMS, necesaria para producir éste daño celular, es de 200 mg/Kg, observándose el efecto a las dos semanas de aplicación.

#### **D) EL ESTUDIO DE LOS ESPERMATOZOIDEOS COMO PRUEBA DE MUTAGENICIDAD**

El reporte de Bruce y cols, (1974) sobre la inducción de la elevación en la fracción de espermatozoides de forma anormal a consecuencia de la

exposición de animales de experimentación a radiaciones ionizantes, dió lugar a estudios posteriores que señalaron el mismo efecto para una gama de sustancias químicas reconocidas por su efecto mutagénico, teratogénico o carcinogénico. Este efecto generalmente no se presenta para otras drogas sin acción mutagénica. Con esta base Wyrobeck, Heddle y Bruce propusieron en 1975 el estudio de la morfología del espermatozoide como prueba que indica el potencial genotóxico de drogas y agentes físicos.

Posteriormente en 1978, Wyrobeck y Bruce señalaron que en ensayos para inducción de teratozoospermia con drogas genotóxicas, es conveniente empezar con un tratamiento subagudo en el cual los animales son inyectados diariamente por 5 días consecutivos, con dosis idénticas cada vez. Este tratamiento parece dar resultados ligeramente más reproducibles que cuando se suministra en una gran dosis única.

Además, se menciona que la exposición celular a mutágenos durante la espermiogénesis tardía (desarrollo de la espermátide), no parece producir algún incremento sustancial de anomalías en los espermatozoides. En contraste, la exposición de las células en las fases espermatogoniales más tempranas, frecuentemente lleva a incrementar las anomalías en los espermatozoides, aunque la sensibilidad difiere de compuesto a compuesto (Wyrobeck y Bruce, 1978).



En la utilización de este ensayo de mutagenicidad, deben considerarse algunos factores como son: temperatura ambiental elevada, deficiencia extrema de la dieta y ciertas enfermedades que pueden afectar la producción de espermatozoides en los ratones (Wyrobeck y Bruce, 1978).

Otras características fenotípicas del espermatozoide, han sido consideradas por diferentes autores como índice de daño genético, entre las cuales están la Reacción Proteolítica acrosomal (Ginsberg et al., 1981 y Propping et al., 1978) un examen para la integridad de las membranas plasmática y acrosomal; en ella no se observaría actividad lítica si el acrosoma fuera completamente anormal o no existiera. Además de esta prueba, se han utilizado como rasgos indicativos de daño genético, la disminución en la concentración de espermatozoides, la proporción de espermatozoides vivos y la disminución en la motilidad (Ficsor y Ginsberg, 1980; Escalier, 1984).

#### **E) MORFOLOGIA NORMAL DEL ESPERMATOZOIDE DE MAMIFERO.**

Las descripciones detalladas de Fawcett (1975) acerca del espermatozoide de mamífero, fueron una base importante para el análisis hecho en este trabajo de la ultraestructura del espermatozoide de ratón.

Por considerarlo de utilidad para el análisis de nuestros resultados,

haremos una descripción, de la morfología normal de los espermatozoides de ratón (Figura No. 1). En esta especie la cabeza tiene forma de hoz, está ocupada casi totalmente por el núcleo (Nu) alargado, con cromatina condensada y limitado por su envoltura nuclear, adelgazado en su porción anterior y ligeramente ensanchado en su extremo posterior.

El núcleo queda cubierto en una gran extensión por el Acrosoma (Ac), estructura membranosa ocupada interiormente por un material de baja densidad electrónica. En la porción anterior apical del espermatozoide, el acrosoma se extiende aún más allá del núcleo, para darle la forma característica a la cabeza de estos espermatozoides.

Como es ya sabido con respecto al flagelo del espermatozoide de mamífero, éste presenta una estructura compleja, se inicia con una región sumamente estrecha que comprende la pieza de conexión, formada por una región articular, el capitulum, adjunto a la placa basal, material electrodens que limita la fosa de implantación que es propiamente el sitio de unión de la cola con la cabeza. Hacia atrás del capitulum se encuentran las 9 columnas estriadas que en su extremo caudal se superponen a las 9 fibras densas del flagelo. A excepción del centríolo y una o dos mitocondrias, esta región está desprovista de organelos.

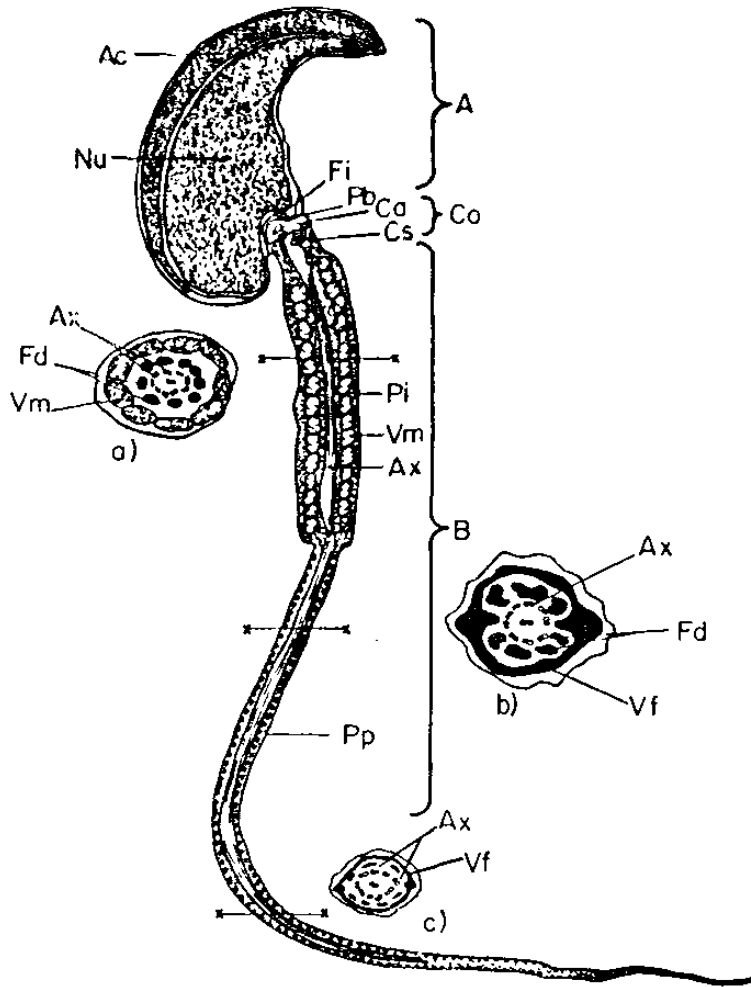
La pieza Intermedia (Pi), está caracterizada por una vaina de mitocondrias (Vm), colocadas extremo a extremo formando una hélice apretada; la estructura interna de éstas no difiere significativamente de mitocondrias en otros tipos celulares. En el centro de la hélice mitocondrial se encuentra el axonema (Ax), consistente en microtúbulos centrales y una hilera de 9 dobletes de microtúbulos periféricos, rodeados por 9 fibras densas (Fd), (patrón seccional 9 + 2).

La Pieza Principal (Pp) está constituida por el axonema (Ax), las 9 fibras densas externas y la vaina fibrosa. Este último componente estructural es característico de la pieza principal para espermatozoides de mamífero y consiste de una serie de costillas orientadas circunferencialmente alrededor de la cola para terminar en dos columnas longitudinales, las cuales corren a lo largo de los lados opuestos de la vaina en toda su extensión. Tanto las costillas como las columnas aparecen constituidas por pequeños agregados electrodensos.

Como la cola disminuye en grosor a lo largo de su longitud las columnas longitudinales llegan a ser más pequeñas y las costillas más delgadas. A varios micrones del extremo de la cola, la vaina fibrosa al igual que las fibras densas terminan abruptamente, marcando la unión de la pieza principal y la pieza terminal. La vaina fibrosa no ha sido aún aislada ni -

caracterizada químicamente, pero al igual que las fibras densas externas de la cola, parecen constar de proteínas que son altamente resistentes a la solubilización.

La porción terminal del flagelo, es de diámetro muy pequeño ya que está constituido únicamente por el axonema, cuyos elementos desaparecen a distintos niveles, y una escasa cantidad de citoplasma rodeada por la membrana celular.



**FIGURA No. 1**

**MORFOLOGIA DEL ESPERMATOZOIDE NORMAL DE RATON**

**A) Cabeza (Forma de hoz); B) cola**

**(Ac) Acrosoma, (Nu) Núcleo, (Fi) Fosa de implantación;**

**(Pb) Placa basal; (Ca) Capitulum; (Cs) Columnas estriadas; (Co) Cuello; (Pi)**

**Pieza intermedia; (Vm) Vaina mitocondrial; (Ax) Axonema; (Fd) Fibras densas;**

**(Vf) Vaina fibrosa;**

**a) Corte Transversal de la Pieza intermedia.**

**b) y c) Corte transversal de la Pieza principal.**

## **MATERIAL Y METODO**

**Para alcanzar los objetivos, llevamos a cabo un estudio experimental, prospectivo y transversal en el que se utilizaron como material biológico, 12 ratones de la línea híbrida C57BL X CDI, de 8 a 12 semanas de edad.**

**Para inducir anomalías morfológicas en los espermatozoides se empleó, el Etilmetanosulfonato (EMS), (obtenido de Sigma Chem. Co.).**

**Se formaron cuatro grupos de tres ratones cada uno; tres de ellos fueron tratados con el Etilmetanosulfonato por vía intraperitoneal, a dosis de 200 mg/Kg de peso, diariamente por 5 días consecutivos. El cuarto grupo fue manejado como control, aplicándole 0.2 ml de agua tridestilada (vehículo del EMS) por la misma vía en el mismo período de tiempo.**

**Después de aplicar la última dosis de tratamiento, los ratones se mantuvieron a temperatura de 25 °C, con períodos luz-oscuridad de 12 horas cada uno, y alimentación y suministro de agua "ad libitum".**

**Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical a las tres, cuatro y cinco semanas de terminado el tratamiento (grupos 1, 2 y 3 respectivamente). El grupo control se sacrificó a las cuatro semanas.**

Posteriormente se disecaron epidídimos y conductos deferentes, los cuales se fragmentaron con tijeras y pinzas en 1.5 ml. de solución salina isotónica. La solución se filtró con una malla de cobre para eliminar fragmentos de tejido.

El filtrado se utilizó para lo siguiente:

1).- Elaboración de 10 frotis por ratón para la determinación del porcentaje de espermatozoides anormales, por observación directa, a través del siguiente procedimiento:

- a) Secado al aire.
- b) Fijación en una solución de: 85 % Metanol Absoluto, 10 % Formaldehído y 5 % ácido acético durante una hora.
- c) Lavado en agua.
- d) Tinción con Eosina "Y" acuosa al 5 % por una hora.
- e) Lavado en agua.
- f) Secado al aire.

Las laminillas se observaron al microscopio de luz (Zeiss K7) a 40X, y en cada una de ellas se contaron 100 células (1000 células en total por cada ratón) para establecer el porcentaje de espermatozoides con anomalías morfológicas.

2).- **Conteo de espermatozoides por ml. de filtrado en la cámara de Neubauer de la manera convencional. Del filtrado epididimario se tomó una muestra con la pipeta de Thoma (pipeta de dilución para glóbulos blancos), y se diluyó (1:20) y homogeneizó en una solución de Bicarbonato de sodio, Formalina neutra y agua destilada; se desecharon las primeras 3 gotas y la siguiente gota se colocó en un extremo de la cámara de Neubauer; se dejó reposar unos minutos con el cubreobjetos encima y se observó al microscopio de luz a 40X, procediendo a realizar el conteo espermático en las regiones correspondientes de la cuadrícula de la cámara de Neubauer.**

3).- **Análisis de la motilidad de los espermatozoides en un portaobjeto, mezclando lo más rápidamente posible después de sacrificar al animal, una gota de la muestra con una gota de solución de cloruro de sodio al 0.9 %. Se contaron 100 células en cada muestra y se clasificó la motilidad por grados en: Móviles, Torpes e Inmóviles.**

4).- **El resto de la muestra se procesó para microscopía electrónica por el método de Hayat (M. A. Hayat, 1972) para el procesamiento de espermatozoides, con algunas modificaciones. El método consiste en lo siguiente:**



- Fijación con una mezcla de Paraformaldehído 3 %, Glutaraldehído 2.5% y ácido pícrico 0.002 mg, por una a dos horas a temperatura ambiente.
- Centrifugación a 1000 rpm por 7 a 10 minutos. (Se decanta el sobrenadante).
- Lavado en la solución fijadora, centrifugación y decantación del sobrenadante.
- Lavado en buffer de fosfatos 0.1 M (pH 7.2) y centrifugación a 1000 rpm por 10 minutos (se repite 3 veces).
- Post-fijación con tetróxido de osmio al 1 %, 0.1 M (pH 7.2) por 15 minutos.
- Lavado con Buffer de fosfatos 0.1 M (pH 7.2), dos cambios.
- Deshidratación con etanol a diferentes concentraciones. Alcohol 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 15 minutos c/u y en alcohol 100 %, dos cambios de 15 minutos cada uno.
- Oxido de propileno - tres cambios de 15 minutos cada uno.
- Infiltración en una mezcla de óxido de Propileno-Resina Epóxica (MEDCAST), en una proporción de 2:1, (1-3 horas); 1:1, (toda la noche); 1:3, (1-3 horas); a temperatura ambiente.
- Preinclusión con Resina Epóxica (MEDCAST), efectuándose 2 cambios de una hora a 60° C.
- Inclusión en Resina Epóxica (MEDCAST) de 18 a 72 horas a 60° C.

Una vez obtenidos los bloques con la muestra, se realizaron cortes semifinos de 0.5 a 1 micra de grosor, que se tiñeron con azul de toluidina al 1 % en una solución de bórax al 5 %; estas secciones se observaron al microscopio de luz (Zeiss K7) a 100X para localizar los espermatozoides de forma alterada. Una vez encontrados, se tomaron fotografías y se procedió enseguida a la obtención de cortes finos de 90 nm de grosor en el ultramicrotomo Sorval MT-1. Estos cortes fueron montados en rejillas de cobre y contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo, para la observación y análisis al microscopio electrónico.

## **RESULTADOS.**

### **A) MICROSCOPICA DE LUZ**

Los parámetros evaluados a Microscopía de luz para corroborar el efecto dañino del EMS sobre la Espermatogénesis fueron:

- 1) **Determinación del Porcentaje de Formas Anormales.**
- 2) **Número de espermatozoides por ml.**
- 3) **Motilidad espermática.**

#### **DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE FORMAS ANORMALES:**

En esta prueba se presentó en general, una elevación en el porcentaje de formas anormales en los 3 grupos de ratones tratados con el agente mutagénico, siendo éste de un 7 % en promedio, mientras que en el grupo control fue de un 2.63 %. (Tabla No. 1).

Se identificaron las siguientes formas anormales de espermatozoides: Amorfo, Filamentoso, Sin gancho, con Defecto del gancho, con Doble cola, con Flagelo anormalmente implantado, Microcéfalo y Macrocéfalo (Figura No. 2).

Hubo diferencias en cuanto a la frecuencia de presentación de cada una de las formas anormales ya mencionadas en los 3 grupos de ratones tratados. Siendo las formas más abundantes, el tipo amorfo (Grupo II, 2.5%)

sin gancho (Grupo I, 2.3%), y las de defecto de gancho (Grupo III, 1.96%), el resto de las formas fueron menos frecuentes (Tabla No. 2).

En los frotis de espermatozoides, además de detectar la cantidad y tipo de anomalías (% de espermatozoides anormales), se pudieron distinguir alteraciones no cuantificadas en esta prueba como son: un cuello largo en algunos casos, pieza intermedia engrosada y colas plegadas o enrolladas.

En el grupo control, no se observó ningún espermatozoide filamentososo, bicéfalo y macrocéfalo, el resto de las formas anormales fueron escasas (Tabla No. 2).

#### RECuento TOTAL DE ESPERMATOZOIDES:

En el conteo espermático, se presentó una gran variabilidad dentro de los grupos. El número de espermatozoides fue bajo ( $23.67 \times 10^6$  en promedio) en los 3 grupos de ratones tratados, comparados con el control ( $41.4 \times 10^6$ ); en el grupo I (3 semanas de tratamiento), se presentó el número de espermatozoides más bajo, ( $16.73 \times 10^6$  en promedio), mientras que en el grupo II (4 semanas de tratamiento) y III (5 semanas de tratamiento) el número de espermatozoides/cc entre ellos fue semejante ( $26.77$  y  $27.53 \times 10^6$ , respectivamente).

**ANALISIS DE LA MOTILIDAD ESPERMATICA:**

Al hacer la observación de los espermatozoides en fresco, se clasificaron según el grado de motilidad en: Móviles, Torpes e Inmóviles. Encontrándose un número elevado de espermatozoides inmóviles en los 3 grupos de ratones tratados con el EMS (De 900 células contadas 600 fueron inmóviles), mientras que el número de espermatozoides móviles (130) y torpes (170) fue bajo. Los tres ratones que fueron tratados con agua bidestilada presentaron cifras bajas de espermatozoides inmóviles (155) y torpes (55), en comparación con los tratados, y un número relativamente mayor de espermatozoides móviles (90) en las 300 células contadas. Tabla No. 3.

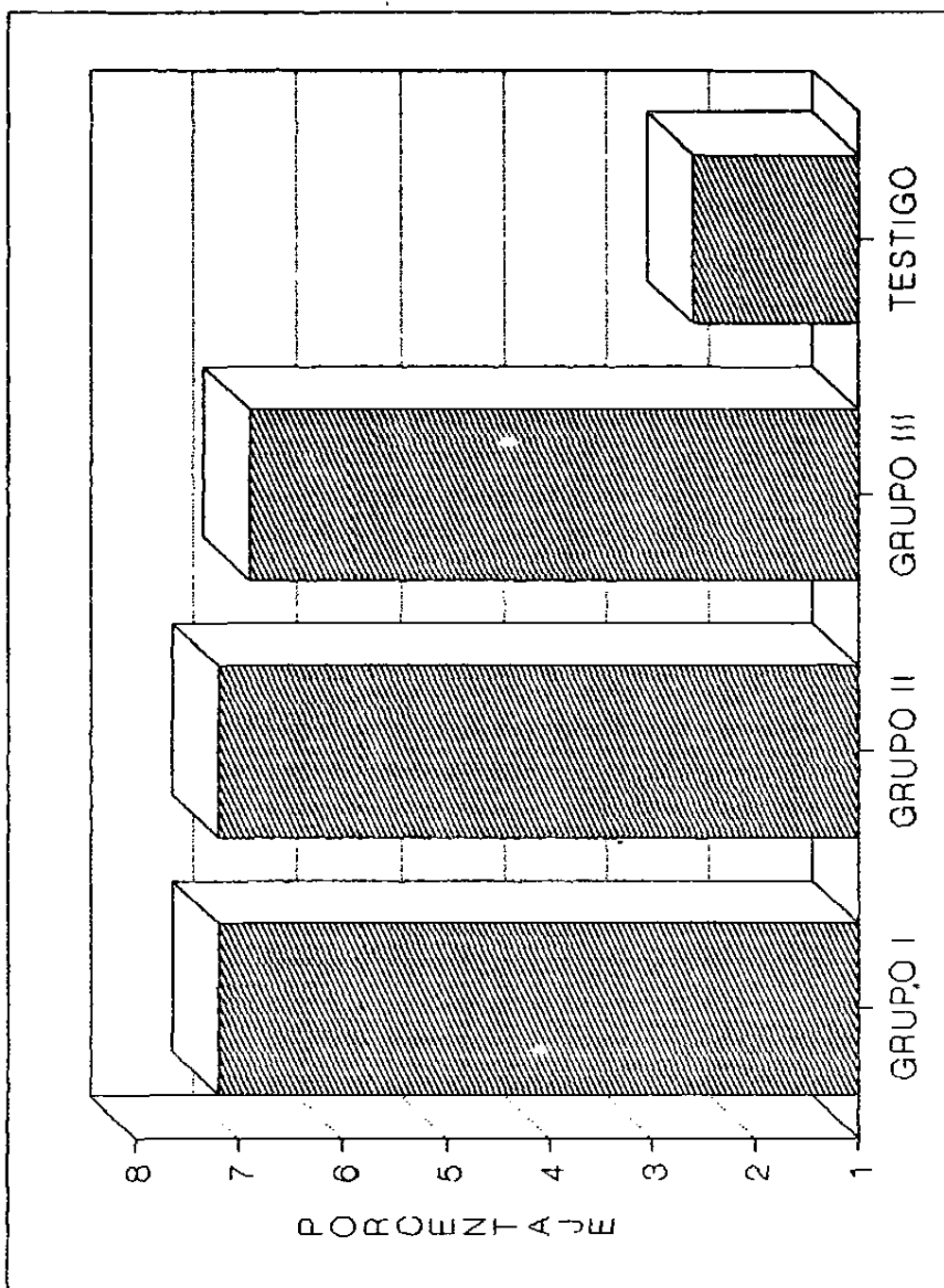
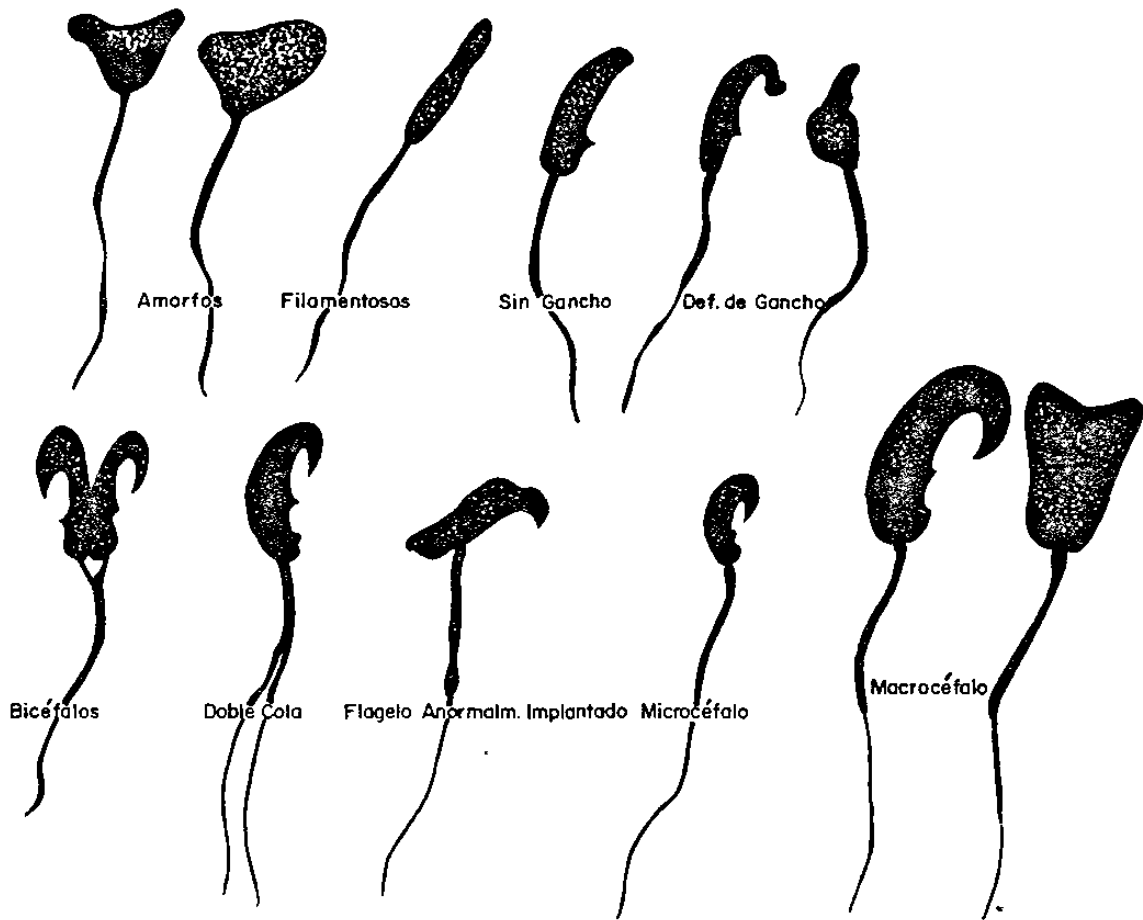
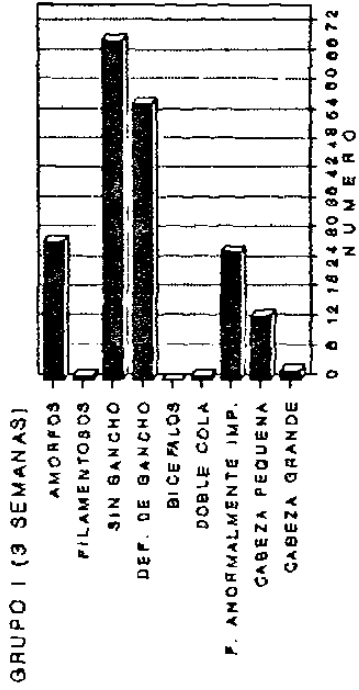


TABLA No 1.- Porcentajes de formas anormales de espermatozoides en ratones tratados con EMS (Grupos I, II y III) y agua destilada (testigo).

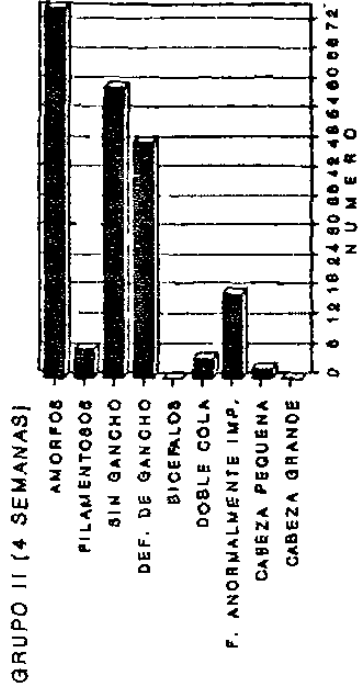


**FIGURA No. 2** Formas anormales de espermatozoides de ratones tratados con EMS.

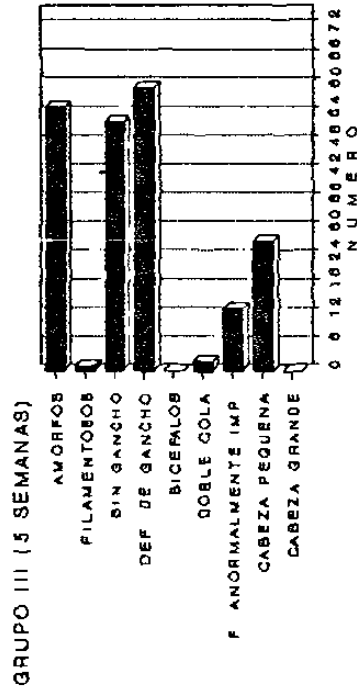
**TOTAL DE ESPERMATOZOIDES ANORMALES  
POR 3,000 CELULAS**



**TOTAL DE ESPERMATOZOIDES ANORMALES  
POR 3,000 CELULAS**



**TOTAL DE ESPERMATOZOIDES ANORMALES  
POR 3,000 CELULAS**



**TOTAL DE ESPERMATOZOIDES ANORMALES  
POR 3,000 CELULAS**

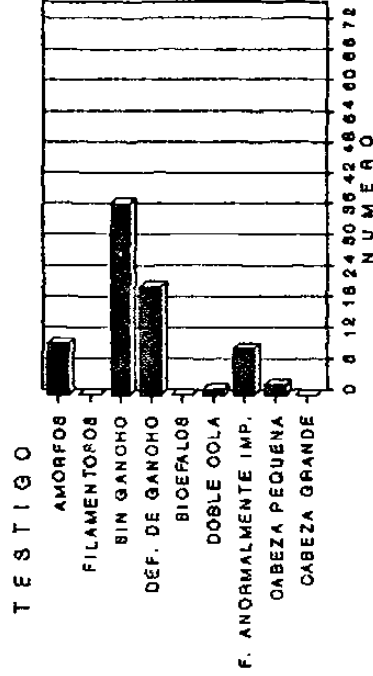


TABLA No.2 - Comparación de la frecuencia de presentación de anomalías morfológicas de los espermatozoides de ratón a diferentes tiempos después del tratamiento con EMS y con el grupo testigo.



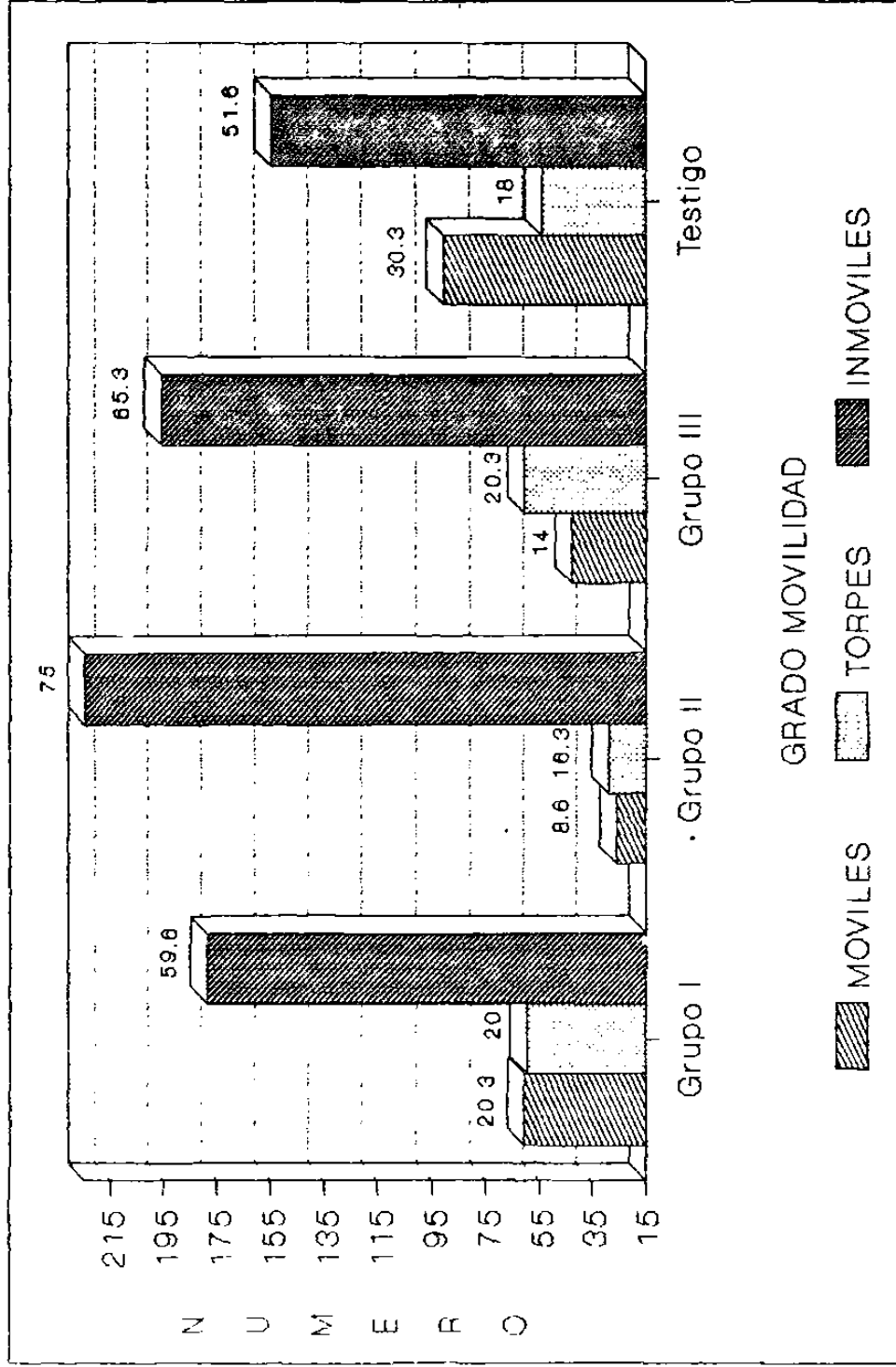


TABLA No 3.- Número de espermatozoides por grupo para cada grado de movilidad en ratones tratados con EMS y testigo. El número de células se da en cifras absolutas. El total de células contadas por grupo fue de 300. El porcentaje correspondiente está anotado sobre cada barra.

## **B) OBSERVACIONES A MICROSCOPIA ELECTRONICA.**

**En los cortes finos de la "Pastilla" de espermatozoides revisados con microscopía electrónica, se analizaron tanto células de forma normal como alterada.**

**Muchas de las formas anormales de espermatozoides, vistas a este nivel, coincidieron con la descripción hecha previamente a microscopía de luz; entre estas formas se encontraron: espermatozoides amorfos, filamentosos y con alteraciones del gancho.**

**Las alteraciones ultraestructurales encontradas en la cabeza de los espermatozoides correspondieron a cambios nucleares y acrosomales.**

**A nivel del núcleo se observaron:**

**1) Modificaciones en la forma del núcleo: por la aparición de pliegues, prominencias o prolongaciones, que originaron una forma muy irregular, incluso de aspecto bilobulado como es el caso de espermatozoides amorfos (Lámina No.1: A, B, C, y D; Lámina 2: A y D).**

**2) Modificaciones en el volumen nuclear; en algunos casos se presentó un incremento y en otros una disminución. Pudo observarse fragmentación**

en los espermatozoides amorfos, filamentosos y macrocéfalos (Lámina 2: A y D; Lámina 3: A y C).

3) Defectos en la condensación cromatínica, dando al núcleo un aspecto grumoso y a veces hasta vacuolado, observado esto en varios de los tipos anormales de espermatozoides analizados (Lámina 1: C; Lámina 2: A).

4) Persistencia de abundante citoplasma perinuclear, conteniendo elementos membranosos y estructuras flagelares, en espermatozoides de tipo amorfo y en células en degeneración (Lámina 1: C; Lámina 2: A).

Respecto a las alteraciones Acrosomales analizadas, se presentaron modificaciones de la forma correspondientes a:

- 1) Alargamiento, como ocurre en espermatozoides de tipo filamentosos (Lámina 3: C).

Aplanamiento o Ensanchamiento y Prolongaciones apicales, observado en espermatozoides sin gancho o con defecto del mismo (Lámina 3: A, B y D); en algunos otros casos, se presentó un incremento del volumen acrosomal el cual pudo apreciarse en espermatozoides amorfos, con defecto de gancho o sin el (Lámina: 2, D; Lámina 4: A y B). En ninguno de los casos se observó ausencia del Acrosoma.

En cuanto a la región del cuello, fue difícil localizar las suficientes imágenes para poder establecer una interpretación clara; pero en las que se analizaron se observó una apariencia normal, salvo en los casos en que la cabeza está totalmente doblada sobre la cola, en donde probablemente los elementos de la pieza de conexión tienen diferente orientación (Lámina 2: B).

En lo referente a la cola del espermatozoide, se analizaron piezas intermedias y principales. En la mayoría de las observaciones de la pieza intermedia, se apreció la estructura típica, encontrándose el axonema rodeado por las 9 fibras densas y las mitocondrias con un patrón conformacional común para este tipo de células, sin embargo en algunos casos se presentó una cantidad relativamente abundante de citoplasma (Lámina 6: A, B, C y D, Figura No. 3), el patrón conformacional de las mitocondrias fue distinto del común para este tipo celular, mostrando en gran parte extracción de la matriz mitocondrial, permaneciendo en algunas áreas como grumos densos, las crestas mitocondriales son más abundantes y los espacios intracrestales más notorios (Lámina 5: B y D).

Las observaciones realizadas a nivel de la cola espermática, fueron principalmente llevadas a cabo en cortes transversales, los cuales permiten una observación clara de todos los elementos que la constituyen (Lámina 9: C): El Axonema, formado por un par de microtúbulos centrales y un -

anillo de 9 dobletes periféricos, las 9 fibras densas a su alrededor y la vaina fibrosa. En los espermatozoides de ratones tratados con EMS, pudieron detectarse alteraciones en el patrón microtubular del axonema a nivel de la pieza intermedia y principal, consistiendo estas en una desorganización microtubular y/o ausencia parcial o completa de los mismos (Lámina 7, 8 y 9, Figura 4 y 5).

Con bastante frecuencia, pudimos apreciar combinaciones de las alteraciones, por ejemplo, defectos nucleares y acrosomales, (Lamina 2: A y D; Lamina 3: A, B, C y D); leves o graves deformidades de la cabeza relacionadas con alteraciones de la cola (Lamina 1: B y 2: C).

En algunas ocasiones, se detectó tanto en los grupos control como en los tratados, porciones faltantes de la vaina fibrosa.

Se encontraron también células malformadas en degeneración, con mayor frecuencia en los grupos tratados, que presentaron disgregación de las membranas con pérdida de los límites celulares, disolución de la matriz citoplásmica con gran cantidad de vesículas membranosas (Lámina 1: C).

**LAMINA No 1      MICROGRAFIAS ELECTRONICAS DE  
ESPERMATOZOIDES ANORMALES.**

**A) Espermatozoide amorfo con la cabeza ligeramente doblada sobre el flagelo, el núcleo (Nu) cuadrado está rodeado por el acrosoma. La Pieza intermedia (Pi) en sección longitudinal es de aspecto normal. Se observan algunas piezas intermedias y principales en sentido transversal. (3000X)**

**B) Espermatozoide anormal en el cual se presenta por un lado una escotadura y por el otro una jiba. En la pieza intermedia (Pi) se aprecia ausencia de microtúbulos (flecha) (9,256X).**

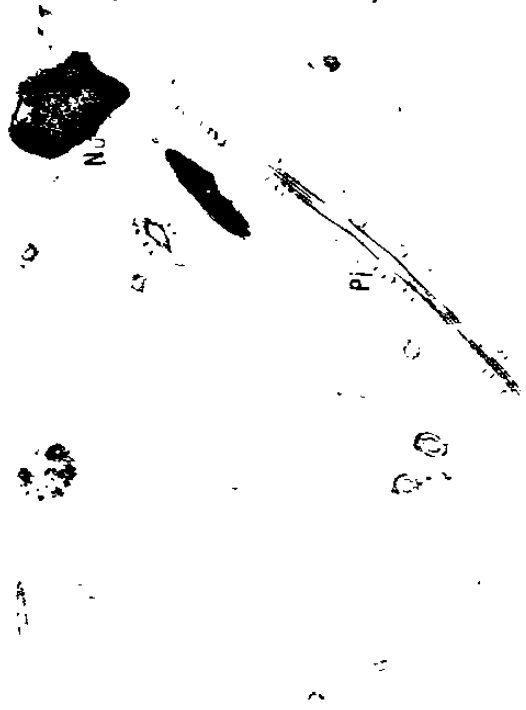
**C) Espermatozoide anormal en degeneración. El núcleo (Nu) con defecto en la condensación cromatínica, presenta una excavación y adelgazamiento en uno de sus extremos, a su alrededor se observa abundante citoplasma en disolución, que contiene estructuras membranosas y flagelares (12,000X).**

**D) Espermatozoide amorfo con dos prolongaciones nucleares muy adelgazadas como ganchos, rodeados por el acrosoma (12,000 X ).**

B



A



D



C



Lamina No.-1

**LAMINA No 2      MICROGRAFIAS ELECTRONICAS DE  
ESPERMATOZOIDES ANORMALES.**

**A) Espermatozoide amorfo que ha perdido por completo la forma característica que presentan los espermatozoides de ratón. Núcleo (Nu) muy grande de aspecto bilobulado o con dos agregados nucleares, uno de mayor tamaño que el otro; defecto en la condensación cromatínica que da aspecto grumoso, la superficie nuclear es irregular. El Acrosoma (Ac) mal definido. Alrededor del núcleo hay una cantidad relativamente abundante de citoplasma, con elementos membranosos (flecha) y flagelares (cabeza de flecha) (12,000X).**

**B) Espermatozoide con la cabeza pequeña, completamente doblada sobre el flagelo; abundante citoplasma. La sección da la apariencia de que son 2 piezas intermedias (Pi), en una de las cuales no se presenta el axonema (flecha) (12,000X).**

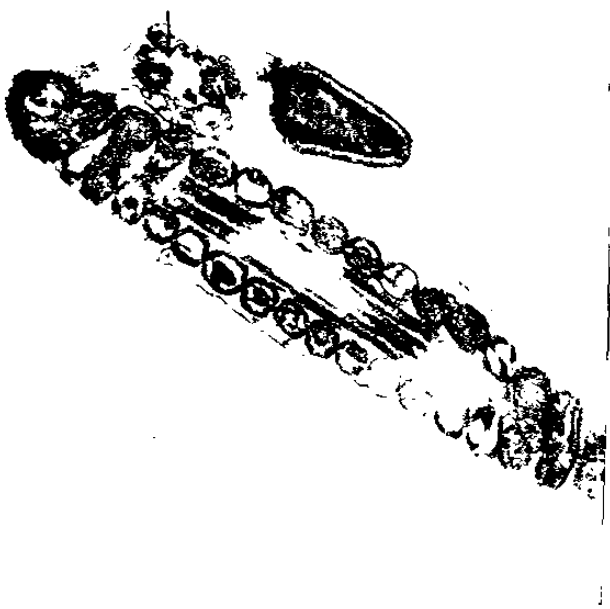
**C) Espermatozoide con cabeza de aspecto normal, con 2 piezas intermedias (posiblemente biflagelado), una con sus elementos internos completos y otra con ausencia de microtúbulos (flecha) (7,000X).**



**LAMINA No. 2 Continuación ....**

**D) Espermatozoide amorfo con un pequeño fragmento nuclear (flecha) separado del núcleo (pudiendo corresponder a una cabeza bifurcada). Entre las dos porciones nucleares se observa un material de electrodensidad variable que semeja al acrosomal (\*) (12,000X).**

B



A



D



C



Lamina No-2

**LAMINA No 3      MICROGRAFIAS ELECTRONICAS DE  
ESPERMATOZOIDES ANORMALES.**

**A) Espermatozoide anormal con Acrosoma aplanado por un extremo (flecha) y por el otro alargado y adelgazado (\*) (9,200X).**

**B) Espermatozoide con extremo anterior engrosado y ligero encorvamiento. El Acrosoma presenta una prolongación apical (flecha) (9,200X).**

**C) Espermatozoide filamentosos, que presenta un núcleo muy alargado (Nu) y un pequeño fragmento nuclear adicional (flecha) en su porción apical. El Acrosoma también presenta un alargamiento (cabeza de flecha) pronunciado hacia la región apical, rodeando al pequeño fragmento nuclear (9,200X).**

**D) Espermatozoide anormal con aplanamiento y ensanchamiento del Acrosoma (Ac). El núcleo presenta una angulación de casi 90° (9,200X).**



Lamina No.- 3

**LAMINA No 4      MICROGRAFIAS ELECTRONICAS DE  
ESPERMATOZOIDES CON ANOMALIAS DEL  
ACROMOSOMA.**

**A) Espermatozoide con Acrosoma apianado y ensanchado (flecha).**

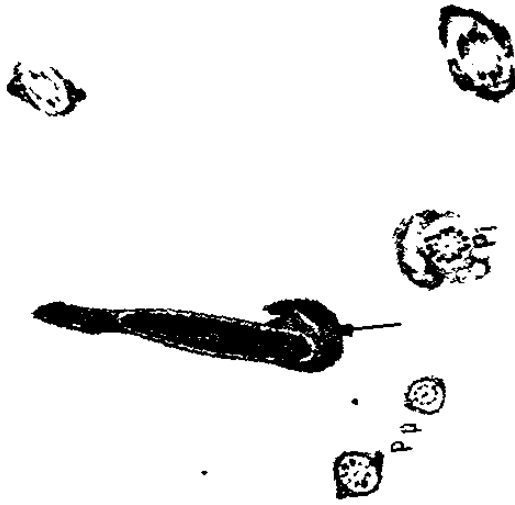
**Se observan también una Pieza intermedia (Pi) y Piezas principales (Pp) en sección transversal (7,000X).**

**B) Espermatozoide con aplanamiento e hiperdesarrollo del Acrosoma (Ac), que aparece además doblado sobre el núcleo. Se observan también alrededor del núcleo ondulaciones del Acrosoma (20,000X).**

B



A



Lamina No-4

**LAMINA No 5      MICROGRAFIAS ELECTRONICAS DE PIEZAS  
INTERMEDIAS NORMALES Y ANORMALES.**

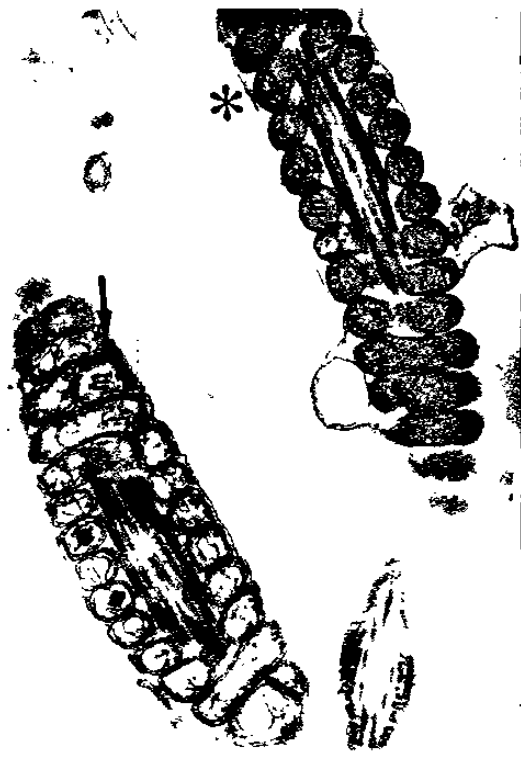
**A) Sección transversal de Pieza intermedia normal, donde se observa el Axonema (Ax), las 9 fibras densas, externas (Fd) y las mitocondrias (m) (20,000X).**

**B) Sección longitudinal de dos flagelos a nivel de la Pieza intermedia. Una de ellas es de aspecto atípico (flecha): donde las mitocondrias (m) muestran extracción de la matriz mitocondrial y en algunas áreas grumos densos, las crestas mitocondriales son abundantes y los espacios intracrestales notorios. La otra es de apariencia "normal" (\*): la matriz mitocondrial es muy electrodensa. Hay pocas crestas mitocondriales, no se observan los espacios intracrestales (12,000X).**

**C) Sección longitudinal de Pieza intermedia (Pi) en continuación con la Pieza principal (Pp), ambas de aspecto normal (12,000X).**

**D) Pieza intermedia en sección longitudinal donde se observa el aspecto de las mitocondrias (m) distinto del patrón común, como se describe en el inciso B (12,000X).**

B

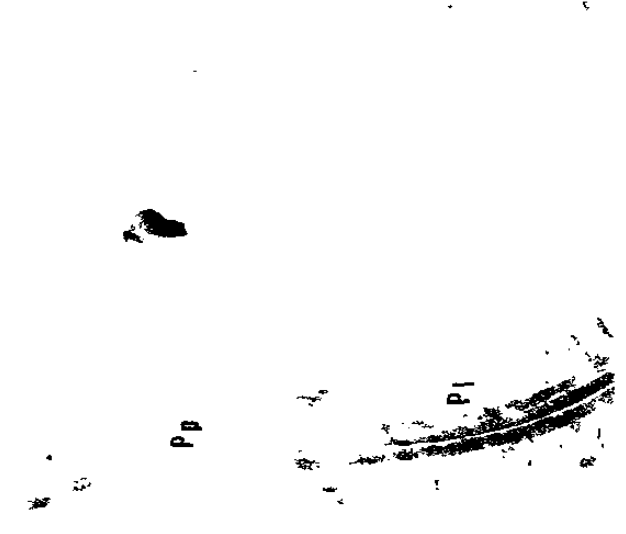


D

A



C





LAMINA No 6      MICROGRAFIAS ELECTRONICAS DE  
PIEZASINTERMEDIAS CON ABUNDANTE CITOPLASMA  
(C).

**Aumentos:**

A) 7,000X B) 12,000X C) 7,000X y D) 12,000X



**LAMINA No 7      MICROGRAFIAS   ELECTRONICAS   DE   PIEZAS  
PRINCIPALES NORMALES Y ANORMALES.**

**A) Sección transversal de piezas principales con ausencia de axonema (flecha) y con ausencia parcial y desorganización de microtúbulos (\*) (12,000X).**

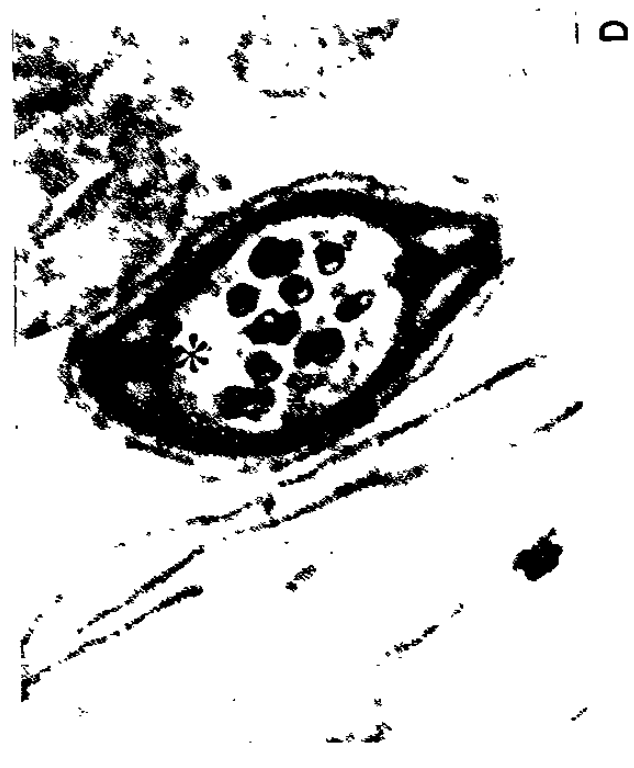
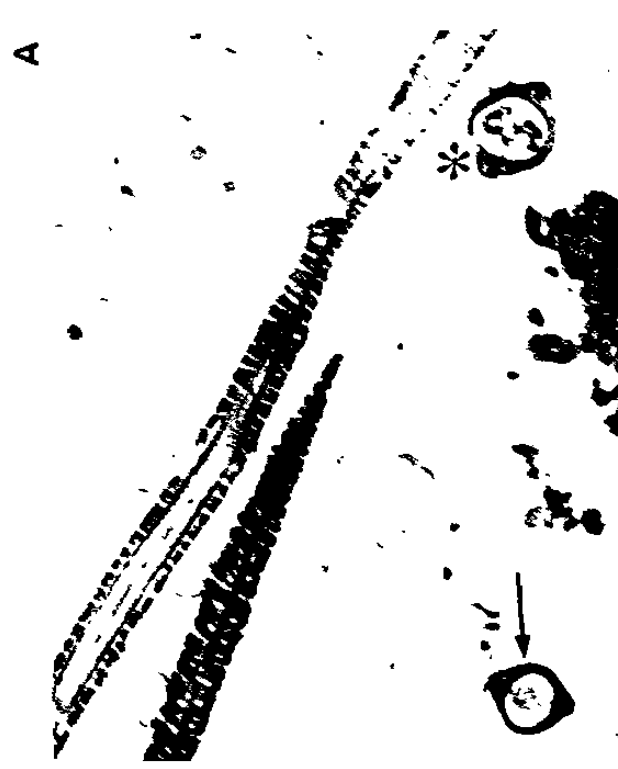
**B) Pieza principal en sección transversal con ausencia completa del axonema (20,000X).**

**C) Sección transversal de piezas principales con axonema completo (flechas) y con ausencia parcial de microtúbulos (\*) (7,000X).**

**D) Pieza principal en sección transversal con una desorganización microtubular (\*) (50,000X).**

**LAMINA No 8      MICROGRAFIAS   ELECTRONICAS   DE   SECCIONES  
TRANSVERSALES   DE   PIEZAS   PRINCIPALES   DE  
ESPERMATOZOIDES.**

**A y B) Piezas principales con axonema completo (cabeza de flecha), e incompleto (ausencia parcial y desorganización de microtúbulos \*) y ausente (flecha). A) 7,000X B) 20,000X.**





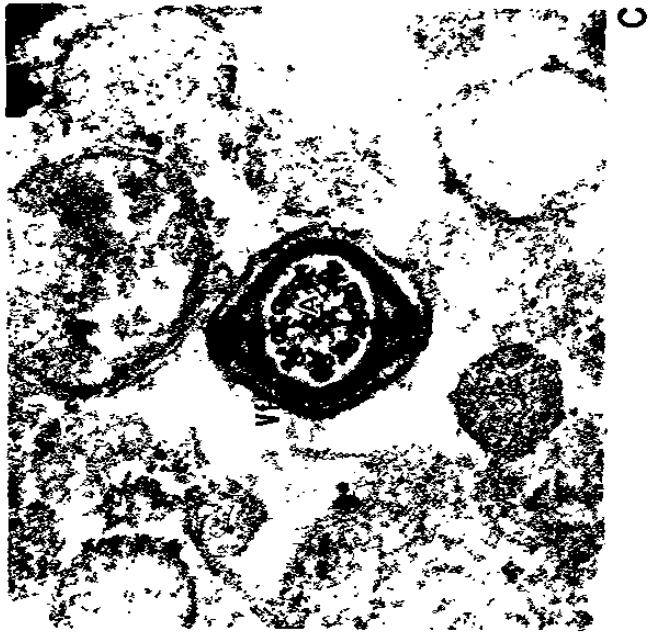
**LAMINA No 9      MICROGRAFIAS ELECTRONICAS DE PIEZAS  
INTERMEDIAS Y PRINCIPALES DE ESPERMATOZOIDES.**

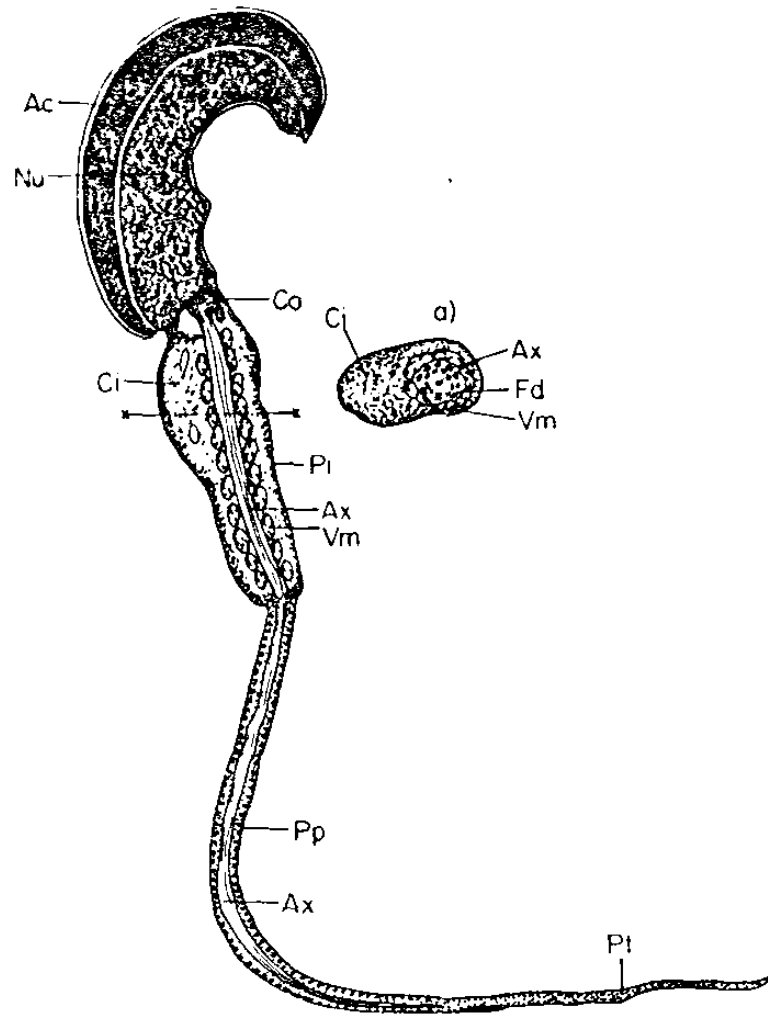
**A) Sección transversal de pieza intermedia (Pi) de aspecto normal y pieza principal con axonema Incompleto y desorganización microtubular (\*) (12,000X).**

**B) Sección longitudinal de pieza intermedia (Pi) de aspecto normal y pieza principal con una desorganización micro tubular (\*) (12,000X).**

**C) Pieza principal en sección transversal con axonema completo, (Ax) Axonema, (Vf) Vaina fibrosa. (12,000X).**

**D) Sección transversal de piezas intermedias (Pi) de aspecto normal y piezas principales completas (cabeza de flecha) y ausencia de axonema (flecha) (9,200X).**





**FIGURA No. 3**

**ESPERMATOZOIDE DE RATON CON UNA CANTIDAD RELATIVAMENTE ABUNDANTE DE CITOPLASMA A NIVEL DE LA PIEZA INTERMEDIA**

**(Ac) Acrosoma, (Nu) Núcleo;**

**(Co) Cuello; (Pi) Pieza intermedia; (Ci) Citoplasma;**

**(Ax) Axonema; (Fd) Fibras densas; (Vm) Vaina mitocondrial; (Pp) Pieza principal; (Pt) Pieza terminal**

**a) Corte Transversal de la Pieza intermedia.**



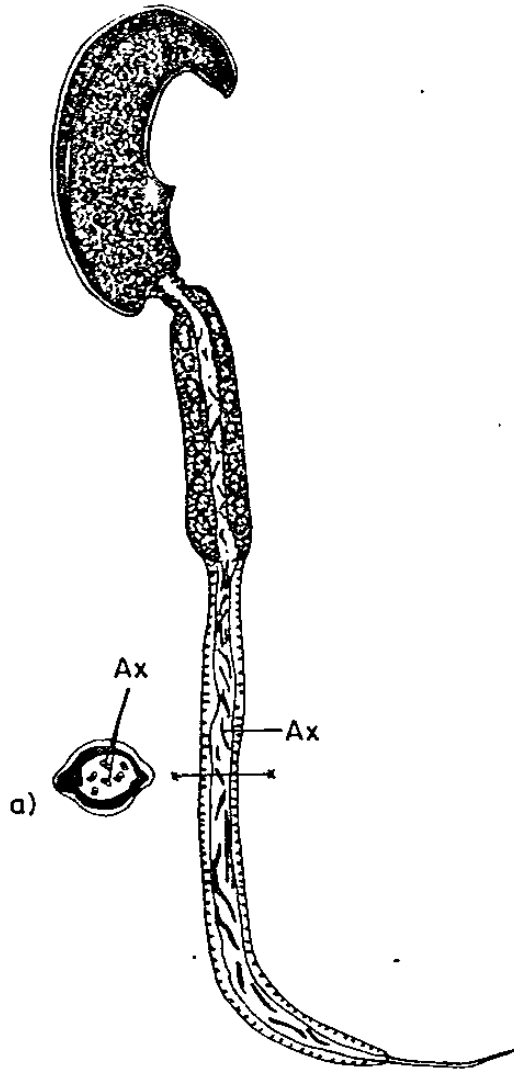
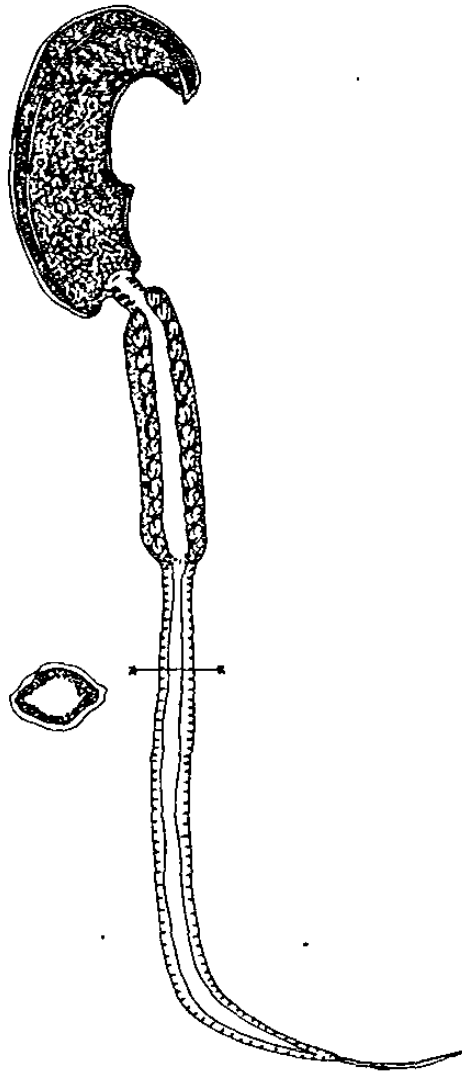


FIGURA No. 4

ESPERMATOZOIDE DE RATON QUE PRESENTA ALTERACION DEL  
AXONEMA (DESORGANIZACION Y FALTA PARCIAL DE  
MICROTUBULOS)

(Ax) Axonema a) Corte transversal de la pieza principal.



**FIGURA No. 5**

**ESPERMATOZOIDE DE RATON QUE PRESENTA AUSENCIA DE  
AXONEMA**

**Aspecto de la cola en sección longitudinal y corte transversal de la pieza  
principal.**

## **DISCUSION Y CONCLUSIONES**

**Se sabe que tanto la forma normal de los espermatozoides como la fracción y tipo de formas anormales presentes, es una característica del genotipo de las células espermatogénicas; si éste de alguna manera se ve modificado, también lo estarán las células finales resultantes del proceso de espermatogénesis (Wyrobeck y Bruce, 1978). La utilización de una línea híbrida de ratones (C57 BL X CDI) en este trabajo, tiene la ventaja de presentar un porcentaje bajo de espermatozoides de forma anormal, como efecto de la cruza de líneas genéticas.**

**En nuestro estudio observamos una disminución en la cuenta total y una elevación en el número de espermatozoides anormales ya esperadas, a consecuencia de la inyección del mutágeno químico, etil-metano-sulfato (EMS). Esta parte de nuestro estudio, tuvo la finalidad de corroborar el efecto dañino de dicha sustancia sobre la espermatogénesis, verificando la eficacia del tratamiento y susceptibilidad de los animales de experimentación (Wyrobeek et al., 1975; Wyrobeek y Bruce, 1978; Casidy et al., 1983).**

**En principio, corroboramos nuestra hipótesis al constatar que la forma anormal de la cabeza del espermatozoide, se asocia consistentemente con cambios nucleares y acrosomales, que seguramente son consecuencia de los**

**defectos que el EMS causa en la espermiogénesis murina.**

**El análisis al ME de los espermatozoides de forma anormal en ratones tratados con EMS, permitió encontrar grandes similitudes entre el tipo de alteración que con anterioridad se observaron en espermátides (Gallegos de L., et al 1987) y las que presentan los gametos maduros.**

**Sin embargo, aunados a las alteraciones nucleares y acrosomales, se observaron otras modificaciones referentes a la implantación del flagelo y a la organización de sus elementos. Estas alteraciones en la ultraestructura flagelar que fueron frecuentemente vistas al ME, pueden estar relacionadas con el alto porcentaje de espermatozoides inmóviles, detectados en el examen en fresco del contenido epididimario de los ratones tratados con EMS. Respecto a esto, resultados similares han sido reportados por diversos autores. Haidl et al (1987), encontraron una correlación altamente significativa entre los hallazgos morfológicos de las piezas intermedias y colas y la motilidad total, así como con la motilidad progresiva de los espermatozoides. Anteriormente se había visto que los espermatozoides morfológicamente normales se desplazan más rápido y derecho, con frecuencias más altas en el número de latigazos del flagelo, que los espermatozoides morfológicamente anormales (Katz et al., 1977).**

Las diversas alteraciones de la estructura axonemal (ausencia de axonema, de brazos ó estructuras centrales), se han asociado también a deficiencias enzimáticas en espermatozoides inmóviles (Baccetti, et al, 1981). Escalier (1984) describió igualmente defectos en la estructura de la cola del espermatozoide a nivel del cuello, axonema y vaina fibrosa y los relacionó con alteraciones en la motilidad, en ratones mutantes estériles.

En su totalidad, todos estos autores se han referido a defectos microtubulares y de las estructuras fibrosas del flagelo, semejantes a los que nosotros observamos en nuestro estudio, pero los cambios mitocondriales que aquí referimos no han sido reportados. La conformación peculiar de las mitocondrias en los espermatozoides, de ratones inyectados con EMS, se puede ver también en espermátides anormales (Gallegos de L. Comunicación personal) y es posible que también se relacione a la motilidad defectuosa de los espermatozoides.

Aunque no se registró el número, se observaron en los frotis de espermatozoides al ML, colas plegadas y engrosadas a nivel de la porción intermedia, que seguramente se relacionan también con los defectos ultraestructurales señalados.

**Todas las malformaciones descritas para los espermatozoides en este trabajo, se presentaron de manera aislada o en combinación, siendo difícil de establecer su interdependencia. Esto coincide con lo que menciona Holsteín (1978), para las espermátides malformadas de túbulos seminíferos del humano bajo condiciones normales; en pacientes con trastornos de la fertilidad y en los ancianos, donde no hay dominio de alguna de las malformaciones de las espermátides, encontrándose involucrados de igual manera todas las estructuras celulares (Holstein 1986).**

**Observamos también, células germinales malformadas en degeneración, con mayor frecuencia en los grupos tratados con el EMS. No sabemos si esto, se encuentra dentro del porcentaje normal de pérdida fisiológica de células germinales, o si tal vez los espermatozoides malformados pudieran ser más susceptibles al efecto tóxico de este tipo de sustancias. Otra posibilidad es que estas células tuvieran un tiempo de vida más corto que células normales, por lo cual se desintegran más rápidamente. Se ha visto que tejido testicular de ancianos con buena actividad espermatogénica y cantidad normal de espermátides, presenta un aumento de cambios degenerativos en éstas y un menor tiempo de vida (Holstein, 1986). Parvinen et al. (1984), mencionan el efecto de drogas anticancerosas, las cuales causaron cambios degenerativos en células que**

son más activas en síntesis de RNA como los espermatoцитos paquiténicos, así también en la división meiótica. Ante esta situación, consideramos conveniente en ensayos posteriores incluir una prueba de viabilidad espermática que permita detectar tiempo de sobrevivencia y distinguir espermatozoides muertos de los vivos inmóviles.

En conclusión podemos afirmar que:

1.- Nuestros resultados confirman la hipótesis propuesta en este trabajo, ya que la forma alterada de la cabeza de los espermatozoides anormales de ratones tratados con EMS, corresponde a cambios presentados en la forma del núcleo y/o acrosoma.

2.- Los cambios morfológicos de los espermatozoides de los ratones a los que se les administró EMS, no son únicamente a nivel de la cabeza. A nivel de microscopía de luz, se detectaron cambios flagelares como la duplicación y plegamiento frecuente de las colas espermáticas. Por el examen al microscopio electrónico, se identificaron modificaciones estructurales tanto en la pieza intermedia como principal: cantidad relativamente abundante de citoplasma en la pieza intermedia; diferencias en el patrón conformacional de las mitocondrias y alteración a nivel de los microtúbulos que componen el axonema (desorganización, ausencia parcial ó completa).

**3.- Además de los cambios en la morfología de los espermatozoides, los ratones tratados con EMS presentaron trastornos de la motilidad espermática que seguramente tienen su base, al menos en parte, en las alteraciones de la ultraestructura flagelar registrados.**

**4.- Se registró un incremento en el número de células en degeneración, lo cual puede ser considerado como evidencia de los trastornos de la espermatogénesis como declara Holstein y Schirren (1977), para el aumento en la tasa de muerte celular.**



## **RESUMEN**

**Se realizó un estudio con microscopía electrónica para describir las alteraciones en la estructura fina de espermatozoides morfológicamente anormales. Se utilizó un modelo experimental consistente en ratones de línea híbrida (C57BL X CDI) sometido a la acción del mutágeno EMS (Etil metano sulfonato) con la finalidad de tener una fracción alta de espermatozoides de forma anormal.**

**En la primera parte de este estudio corroboramos el efecto del EMS sobre la Espermatogénesis de los animales tratados, registrando una disminución del número total de espermatozoides, con aumento del porcentaje de formas anormales y disminución de la motilidad.**

**Las formas anormales de espermatozoides encontradas en este estudio por examen de frotis a Microscopía de luz, fueron las siguientes: Espermatozoides Amorfos, Filamentosos, Sin Gancho, Defecto de gancho, Doble cola, Flagelo anormalmente implantado, Microcéfalos y Macrocéfalos.**

**Para el estudio Ultraestructural de estas formas de espermatozoides se analizaron los cortes finos a ME de transmisión y se observaron tanto espermatozoides de forma normal como anormal, entre estos últimos se**

encontraron **Espermatozoides amorfos, filamentosos y con defecto de gancho. En los espermatozoides de forma alterada se detectaron alteraciones nucleares y/o acrosomales en la cabeza y modificaciones mitocondriales ademas de defectos del axonema y fibras de la cola espermática.**

Los cambios nucleares consistieron en: 1) **Modificaciones en la forma del núcleo, 2) Modificaciones en el volumen nuclear, 3) Defectos en la condensación cromatínica y 4) Persistencia de citoplasma perinuclear abundante, conteniendo elementos membranosos y estructuras flagelares.**

Mientras que el **Acrosoma** presentó: 1) **Alargamiento, 2) Aplanamiento o Ensanchamiento y 3) Prolongaciones apicales, en algunos casos un hiperdesarrollo.**

En la **cola espermática** se presentó una **desorganización y/o ausencia parcial o completa de los microtúbulos, de las fibras densas externas y de la vaina fibrosa.**

Los cambios presentados en los **espermatozoides**, mencionados en este trabajo son similares a lo reportado por diferentes autores en casos de **pacientes infértiles** y además se **correlacionan directamente con las alteraciones en la espermiogénesis** descritas anteriormente, en animales tratados con el mismo **mutágeno.**

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Baccetti, A. G., Burrini, V. Pallini y T. Reineri. Human Dynein and sperm Pathology. *J. Cell. Biol.*, 188: 102-107. (1981).
- 2.- Balhorn, Rod. A Model for the Structure of Chromatin in mammalian Sperm. *J. Cell. Biol.* 93: 298-305. (1982).
- 3.- Bruce, W. R. y M. I. Meistrich. Spermatogenesis in the Mouse. Proc. 1st. Internat Conf. on Cell. differentiation. Copenhagen Munksgaard. 295-299. (1972).
- 4.- Bruce, W. R.; R. Ferrer y A. J. Wyrobeek. Abnormalities in the shape of murine sperm after acute testicular irradiation. *Mut. Res.* 23: 381-386 (1974).
- 5.- Cassidy, S. L.; K. M. Dix, T. Jenkins. Evaluation of a testicular sperm head counting technique using rats exposed to dimethoxyethyl phthalate (DMEP), glycerol Alfa-monochloro hydrin (GMCH), epichloro hydrin (ECH), formaldehyde (CFA), or methyl methane sulphonate (MMS). *Arch. Toxicol.* 53:71-78 (1983).
- 6.- Cumming, R. B. y Marva F. Walton. Fate and Metabolism of some Mutagenic Alkylating Agents in the Mouse. I. Ethyl Methane sulfonate and Methyl Methanes sulfonate at Sublethal Dose in Hybrid Males. *Mut. Res.*, 19: 365-367. (1979).

- 7.- Escaller, D. **Human Spermatozoa with large Heads and Multiple Flagella; a Quantitative Ultrastructural Study of 6 Cases. Biol. Cell. 48: 65-74. (1984).**
- 8.- Fawcett, D. W. **Review Article. The Mammalian Spermatozoon. Dev. Biol. 44: 394-436. (1975).**
- 9.- Ficsor, G., y L. C. Ginsberg. **The effect of hydroxyurea and Mitomicina C on sperm motility in mice. Mut. Res. 70: 383-387. (1980)**
- 10.-Gallegos A. G., E. Ramírez, S. de la Garza y F. Treviño. **Ethyl methane sulfonat induced changes on the morphology of the seminiferous epithelium of mice. Anat. Rec. 218: 47 A. (1987).**
- 11.- Generoso. W. M., W. L. Russell, Sandra W. Huff, Sandra K. Stout y D. G. Gosslee. **Effects of Dose on the Induction of Dominant-Lethal Mutations and Heritable Translocations with Ethyl Methane Sulfonate in male mice. Genetics 77: 741-752. (1974).**
- 12.- Ginsberg, L. C., S. C. Johnson, N. Salma y G. Ficsor. **Acrosomal Proteolytic assay for Detection of Mutagens in Mammalian Mut. Res. 1: 413-418. (1981).**
- 13.- Haidl, G., R. Hartmann und N. Hofmann. **Morphologische Untersuchungen der Spermatozoen bei Storungen der Motilitat. Andrologia 19: 433-447. (1987).**
- 14.- Hayat, M. A. **Basic Electron Microscopy Techniques. Van Nostrand Reinhold Company. (1972).**

- 15.- Holstein, A. F., und C. Schirren. Die Morphologie menschlicher Samenkanälchen bei normaler und gestörter Spermatogenese. *Urologe (B)* 17: 1-14. (1977).
- 16.- Holstein, A. F. Zytomorphologie der Keimzellen in den Tubuli seminiferi des Menschen (unter normalen Bedingungen und bei Patient mit gestörter Fertilität). En: Physiologie und Pathophysiologie der Hoden funktion. Georg Thieme Verlag Stuttgart. pp 1-20 (1978).
- 17.- Holstein, A. F. Spermatogenese im Alter-ein Grenzgebiet zwischen normaler und pathologischer Anatomie. *Urologe (A)* 25: 130-137. (1986).
- 18.- Katz, David F., Leslie DieI y James W. Overstreet. Differences in the Movement of Morphologically Normal and Abnormal Human Seminal Spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 26: 566-570. (1977).
- 19.- Lyon, F. M. Sensitivity of various germ-cell stages to environmental mutagens. *Mut. Res.*, 87: 323-345. (1981)
- 20.- Mc.Leod, J. Male fertility and Sterility. Proceedings of Sereno Symposia, Vol. 5. Effects of environmental factors and antispermatogenesis compounds on the human testis as reflected in seminal cytology. R. E. Mancini and L. Martini eds. Academic Press, New York 123-248. (1974).
- 21.- Newbold, R. F., W. Warren, AS. Medcalf; and J. Amos. Mutagenicity of carcinogenic methylating agents in associated with a specific DNA modification. *Nature*, 283: 596-599. (1980).

- 22.- Okumara, K., I. P. Lee y R. L. Dixon. Permeability of selected drugs and chemicals across the blood-testis barrier of the rat. *J. Pharm. and Exptal. Tox.* 194: 89-94. (1975).
- 23.- Parvinen, M., J. Lahdetie y L. M. Parvian. Toxic and Mutagenic Influences on Spermatogenesis. *Arch. Toxicol., Suppl.* 7: 128-139. (1984).
- 24.- Propping, D., P. F. Tauber, and L. J. D. Zaneveld. An improved Assay Technique for the Proteolytic Activity of Individual Human Spermatozoa. *Int. J. Fertil.*, 23: 45-50. (1978).
- 25.- Rodríguez, F. L., G. Gallegos; A. N. Cid y S. de la Garza. Cytogenetic Analysis of mice spermatocytes treated with Ethyl-Methane Sulphonate (EMS). *The Anat. Rec.* 223:97 A. (1989).
- 26.- Roberts, J. J. y G. P. Warwick. Studies on the mode of Action of Tumour Growth-Inhibiting Alkylating Agents. I. The Fate of Ethyl Methanesulphonate (Half Myleran) in the rat. *Biochemical Pharmacology.* 1: 60-75. (1958).
- 27.- Segal, G. A. y Owens J. G. Ethylation of DNA and protamine by ethylmethane sulphonate in the germ cells of male mice and relevancy of these molecular targets to the inductions of dominant lethals. *Mut. Res.* 52: 87-106. (1978).
- 28.- Sieber, S. M. y R. H. Adamson. Toxicity of antineoplastic agents in man; Chromosomal aberrations, antifertility effects congenital malformations and carcinogenic potential. *Adn. Cancer Res.* 22: 27-155. (1975).

- 29.- Working, P. K. y B. E. Butterworth. An In vivo In vitro assay to detect chemically induced DNA-repair in spermatogenic cells. *J. Cell. Biol.*, **95**: 171. (1982).
- 30.- Wyrobeck, A. J. Changes in mammalian sperm morphology after X-Ray and Chemical Exposures. *Genet.* **92**: 105-119 (1975).
- 31.- Wyrobeck, A. J. y W. R. Bruce. Chemical Induction of Sperm abnormalities in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Vol. **72**: 4425-4429. (1975).
- 32.- Wyrobeck, A. J., J. A. Heddle y W.R. Bruce. Chromosomal Abnormalities and the Morphology of Mouse Sperm Heads. *Can. J. Genet. Cytol.* **17**: 675-681. (1975).
- 33.- Wyrobeck, A. J. y W. Robert Bruce. The Induction of Sperm Shape Abnormalities in Mice and Humans. A. Hollander and F. J. Serres (Eds). *Chemicals Mutagens: Principles and methods for their detection.* Vol.5. Plenum; New York-London. pp 257-285.(1978).
- 34.- Zeeland, A. A. Van., G. R. Mohn, C. S. Aron, B. W. Glickman, M. Brendel, F. J. Serres, C. Y. Hong y H. E. Brockman. Molecular dosimetry of chemical mutagen ethyl methanesulfonate. *Mut. Res.* **119**: 45-54. (1983).

