



SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POST-GRADO

**ESTUDIO CITOGENETICO EN CELULAS ESPERMATOCENICAS DE
RATON (C57BL \times CD1) F_1 TRATADO CON ETILMETANOSULFONATO**

T E S I S

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

P R E S E N T A

BIOLOGA LAURA ERNESTINA RODRIGUEZ F.

MONTERREY, N. L. SEPTIEMBRE DE 1988

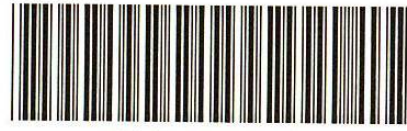
TM

26658

FM

1988

R6



1020091085



DIRECCION GENERAL DE
ESTUDIOS DE POSTGRADO

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POST-GRADO



ESTUDIO CITOGENETICO EN CELULAS ESPERMATOGENICAS DE
RATON (C57BL x CD1) F_1 TRATADO CON ETILMETANOSULFONATO.

T E S I S

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

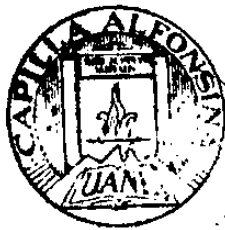
P R E S E N T A

BIOLOGA LAURA ERNESTINA RODRIGUEZ FLORES

MONTERREY, N.L.

SEPTIEMBRE DE 1988

TM
Z6658
FM
1988
R6



FONDO TESIS

6310j

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POST-GRADO

ESTUDIO CITOGENETICO EN CELULAS ESPERMATOGENICAS
DE RATON (C57BL x CD1) F_1 TRATADO CON ETILMETANOSULFONATO.

T E S I S

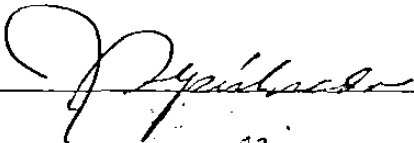
QUE EN OPCION AL TITULO DE MAESTRO EN
CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MORFOLOGIA

P R E S E N T A

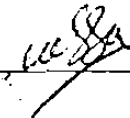
BIOLOGA LAURA ERNESTINA RODRIGUEZ FLORES

COMISION DE TESIS:

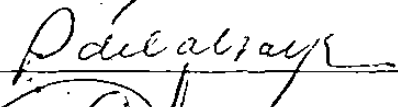
DR. JULIO SEPULVEDA SAAVEDRA
PRESIDENTE



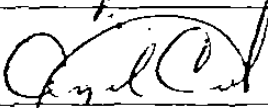
DRA. GUADALUPE GALLEGOS DE LERMA
ASESOR



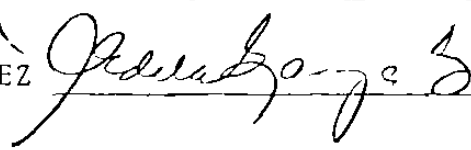
DR. SERGIO DE LA GARZA GALVAN



DR. ANGEL N. CID GARCIA



DR. CARLOS E. DE LA GARZA GONZALEZ



La presente investigación fué realizada en los laboratorios de Genética Humana y de Biología Celular del Depto. de Patología de la Fac. de - Medicina, U.A.N.L. con el apoyo económico de la Subsecretaría de Educación Superior e Investigación Científica de la Secretaría de Educación Pública (SESIC-SEP) bajo el convenio 87-01-0249-210-01.

A G R A D E C I M I E N T O S

En este momento de mi desarrollo académico deseo manifestar mi mas sincero y profundo agradecimiento al Doctor Sergio de la Garza Galván, jefe del Depto. de Patología ya que gracias a su apoyo incondicional ha sido posible llevar a cabo mis estudios de post-grado.

Al Dr. Julio Sepúlveda Saavedra, coordinador de la Maestría en Ciencias con especialidad en Morfología, por la revisión del presente escrito y su invaluable asesoría en todo momento.

A la Dra. M. en C. Guadalupe Gallegos de Lerma, su orientación y estímulo durante el desarrollo del trabajo experimental, así como al Dr. M. en C. Angel N. Cid García, a quien debo valiosos conocimientos.

Al Dr. Carlos de la Garza González por su amable disposición y asesoramiento en la preparación de esta tesis.

Al Q.F.B. Enrique Ramírez Bon, La Srita. Q.F.B. Carmen Quezada Espinoza y el Biólogo Humberto Sifuentes, su desinteresada colaboración en el procesamiento y selección de material fotográfico.

Al Lic. Roberto Mercado, la asesoría en los métodos estadísticos utilizados en el presente trabajo.

A todas aquellas personas, que me apoyaron desinteresadamente y me estimularon a seguir adelante durante el desarrollo experimental.

A las autoridades de la Fac. de Medicina en reconocimiento a la labor que desempeñan en pro del mejoramiento académico de nuestro centro de estudios y por consiguiente de nuestra universidad.

Con ellos a la Dra. Irma D. de Virgen, encargada de la Sección de Bioterios por la preparación y mantenimiento de la línea de ratones utilizados en este trabajo.

A la Lic. Georgina Arteaga, jefe del depto. CRIDS, por la oportuna consecución del material bibliográfico.

Dedico este escrito:

A mi esposo, Jose Antonio. . . con amor.
A mis hermanos, por su apoyo.
A mi madre, por su ejemplo.

Bienaventurado el hombre que halla la
sabiduría y que obtiene la inteligencia,
porque su ganancia es mejor que la plata
y sus frutos mas que el oro fino.
Mas preciosa es que las piedras mas pre
ciosas y todo lo que puede desear no se
puede comparar a ella.

Proverbios 3:13-15.

I N D I C E

C A P I T U L O	P A G I N A
INTRODUCCION	1
Hipótesis	2
Objetivos	2
ANTECEDENTES	3
Espermatogenesis en el ratón	3
Síntesis de biomoléculas durante la esper- matogénesis	12
Técnicas de Estudio	14
Análisis cromosómico en el ratón	16
Mutagénesis	19
MATERIALES Y METODOS	24
Procesamiento de las muestras por el méto- de de Evans y colaboradores	24
Preparación de frotis de espermatozoides	26
RESULTADOS	27
Preparación de cromosomas meióticos por secado al aire	27
Alteraciones cromosómicas identificadas después del tratamiento mutagénico	29
Otros hallazgos	35
Análisis estadístico	38
Inducción de alteraciones en la morfolo- gía del espermatozoide	41
DISCUSION	43
CONCLUSIONES	47
PERSPECTIVAS	48
RESUMEN	49
LITERATURA CITADA	50

INTRODUCCION

La necesidad de evaluar el riesgo mutagénico de agentes químicos para la población humana, estimuló la elaboración de metodologías apropiadas para la investigación práctica. Como los esfuerzos iniciales en mutagénesis se dirigieron a la aplicación de técnicas que se desarrollaron para estudiar el efecto genético de la radiación, posteriormente se hizo necesario estimar la validez de los mismos en organismos expuestos a mutágenos químicos, ya que la información obtenida en estudios de radiación no podía ser aplicado directamente en la evaluación del riesgo mutagénico de estos agentes.

Entre las primeras sustancias probadas experimentalmente con resultados positivos en la inducción de mutaciones se encontraban las mas comunmente usadas en la terapéutica médica.

Los modelos biológicos utilizados han sido muy diversos: bacterias, hongos, virus, insectos y algunas plantas. Solo después de probar estos niveles taxonómicos, se vió la necesidad de incluir la observación "In Vivo" de células germinales de mamífero, ya que la evaluación de la mutagenicidad y el conocimiento de como y bajo que condiciones una sustancia pone en peligro al ser humano, solo es posible en sistemas experimentales en mamífero (1,2).

Por otro lado, el desarrollo de las células germinales de mamífero se caracteriza por cambios bioquímicos que se correlacionan con la diferenciación morfológica durante la espermatogénesis (3), y cuando se utiliza este modelo en estudios de mutagénesis se observa cierta variación en la sensibilidad de los diversos estadios de diferenciación.

Debido a que muchos químicos inducen aberraciones cromosómicas, cualquier programa de investigación en mutagénesis debe incluir ensayos que determinen la capacidad de una

sustancia para inducir efectos deletéreos a nivel cromosómico.

Los cambios producidos por agentes químicos en cromosomas mitóticos han sido estudiados en buen número de modelos "In Vivo" e "In Vitro" (4,5,6,7,8,9). Sin embargo, los estudios en meiosis, aunque laboriosos y difíciles, son de suma importancia, ya que el daño cromosómico detectado es potencialmente heredable de manera directa. Tienen -- valor pronóstico en un 2 a 20% de las enfermedades cromosómicas transmisibles y son de utilidad como elemento diagnóstico en el 2% de los casos de infertilidad masculina que no presentan cariotipo somático anormal ni otras manifestaciones clínicas (10).

H I P O T E S I S:

El etilmetanosulfonato induce cambios en el material genético, que pueden manifestarse como alteraciones cromosómicas en espermatocitos de ratón.

O B J E T I V O S:

- 1.- Analizar las fases de la meiosis adecuadas para estudio citogenético en células germinales masculinas de ratón.
- 2.- Identificar las alteraciones cromosómicas producidas por el etilmetanosulfonato en espermatocitos.
- 3.- Comparar los resultados obtenidos con las frecuencias de alteraciones cromosómicas espontáneas encontradas - en el grupo testigo y con los datos informados en la bibliografía disponible.

A N T E C E D E N T E S

Dos investigaciones importantes facilitaron especialmente el estudio citogenético de células germinales en el área de mutagénesis, la primera de Oakberg (11), donde estudió la espermatogénesis del ratón, determinando su duración en cortes de túbulos seminíferos irradiados y teñidos con la técnica de PA-Schiff. La segunda fué la técnica de Evans y colaboradores (12) para la preparación de cromosomas meióticos de ratón.

En la presente sección describiremos lo pertinente a cada una de estas áreas que contribuyeron notablemente con los estudios de mutagénesis, así como los fenómenos que ocurren durante la división celular de los espermatoцитos y por último revisaremos los aspectos mas notables del mutágeno que nos ocupa.

ESPERMATOGENESIS EN EL RATON.

Los diferentes estadios del ciclo del epitelio seminífero del ratón fueron estudiados por Oakberg en 1956 (11), usando la técnica del ácido peryódico de Schiff, contrastada con hematoxilina de Ehrlich, en cortes de testículo de animales irradiados, encontrando que las células espermatogénicas no se encuentran diseminadas al azar, sino que se distribuyen en una serie de asociaciones celulares bien definidas que al sucederse en determinadas áreas del túbulo constituyen lo que se conoce como el ciclo del epitelio seminífero. Se describen doce asociaciones celulares distintas en el ratón que corresponden a las doce etapas del ciclo del túbulo seminífero (Fig.1).

Aunque se han acumulado muchos datos de la espermatogonia en diferenciación, los modelos propuestos para la reno-

vación de las células madre permanecen en discusión(13).

Según Roosen-Runge (14) las espermatogonias de ratón muestran la misma apariencia que en la rata y se distinguen básicamente tres tipos diferentes: las espermatogonias tipo A, las intermedias (I) y las tipo B.

Las espermatogonias A pueden dividirse hasta cinco veces, pero después de la segunda división algunas se mantienen como tipo A y permanecen en reposo hasta el siguiente ciclo. La mayoría se transforma en intermedias y después en el tipo B.

De acuerdo con Clermont y Bustos-Obregón (citados por Léonard, 13) existen cinco clases de espermatogonias tipo A, siendo A_0 la de reserva, normalmente no se divide pero tiene la capacidad de renovar constantemente las espermatogonias de tipo A_1 a A_4 . Las divisiones sucesivas de la A_1 producen espermatogonias intermedias, o bien, hasta un 20% de tipo A nuevamente, para iniciar otro ciclo.

En 1971, Huckins (15) sugiere que las espermatogonias A_0 son las responsables de la renovación y que las de tipo A_1 a A_4 , así como las de tipo I y B son las espermatogonias en diferenciación.

Cualquiera que sea el modelo que se adopte, todos tienen una característica común: la espermatogonia tipo A constituye una población permanente en contraste con la población transitoria formada por los estadios celulares mas diferenciados (13). Además las diferencias morfológicas entre las espermatogonias son mínimas y se dan a nivel del núcleo solamente.

Las espermatogonias tipo B se dividen varias veces antes de dar origen a los espermatocitos primarios, por lo que su apariencia morfológica es muy semejante. Se locali-

zan en la periferia del túbulo y frecuentemente están en contacto con la lámina basal del epitelio. Después de la incorporación de nucleótidos y otras sustancias para la síntesis de DNA, los espermatoцитos pre-leptoténicos migran alejándose de la lámina basal, aumentan su volumen celular y sintetizan DNA para iniciar la división.

La meiosis corresponde a un tipo de división celular característico de las células germinales femeninas y masculinas en los organismos de reproducción sexual y tiene como finalidad reducir el número de cromosomas de los gametos a la condición haploide y permitir la variabilidad genética por medio del intercambio entre cromosomas homólogos durante la división de reducción (16,17).

Se lleva a cabo en dos divisiones nucleares sucesivas con una sola división de los cromosomas y precedida por un período de síntesis de DNA único (18). Este muestra por lo menos tres diferencias con el mismo período S previo a la mitosis: dura más tiempo, debido a que existen menos sitios de iniciación de la síntesis de DNA, ocurren funciones específicas de la meiosis relacionadas con el intercambio de material genético, y el 0.3% del DNA no se replica hasta la profase cuando ocurre la formación del complejo sinaptonémico (CS).

En preparaciones citológicas para observación microscópica, la apariencia de las fases de la meiosis es la siguiente (18):

En la primera división meiótica observamos una profase muy larga que puede ocupar el 90% del total del período de división y se reconocen cinco subestadios (Fig. 2).

Leptoteno .- Se observa una gradual aparición de los cromosomas, no hay ninguna indicación de que se compongan realmente de dos cromátides idénticas. Aparece la estruc-

tura cromomérica debido a condensaciones de la cromatina a lo largo de las cromátides, a lo cual no se le conoce una función definida, pero se ha visto que a medida que los cromosomas se van condensando, adquieren al llegar al paquiteno un patrón específico muy semejante a las bandas de los cromosomas metafásicos, por lo que se han utilizado para mapeo cromosómico (19).

Cigoteno.- Los cromosomas se han condensado en cierta medida y los homólogos se aparean en sinapsis. No se sabe con certeza como éstos se reconocen para unirse y como quedan perfectamente alineados, pero se ha propuesto que las proteínas del eje del complejo sinaptonémico juegan un papel importante en el reconocimiento punto por punto, además de que en interfase, la cromatina no está al azar sino que se ordena en una forma definida en el espacio nuclear.

Considerando la fluidez de la membrana, se sugiere que la membrana nuclear interna también participa en la aproximación de los homólogos, que ocurre en dos etapas: en la primera quedan separados por un espacio de 3000 Å y posteriormente solo los separa el complejo sinaptonémico.

El 0.3% del DNA que no se replica en la fase S lo hace en esta etapa. Esto se ha comprobado porque al agregar un inhibidor de la síntesis de DNA en cigoteno se altera el patrón de apareamiento.

En estudios de microscopía electrónica se ha identificado una estructura electrodensa denominada nódulo de recombinación, en la parte central del complejo sinaptonémico pero colocándose a intervalos, de forma esférica o elipsoidal (20) que está constituida por proteínas que tienen un diámetro de 90 nm y se piensa que integra una maquinaria de recombinación multienzimática en las cromátides materna y paterna reuniendo las regiones locales de DNA a través de los 100 nm de amplitud del CS (21). Un apareamiento normal en esta etapa asegura la segregación de los cromosomas en anafase I.

Paquiteno.- Los cromosomas son mas cortos y gruesos y permanecen estrechamente apareados, la condensación total en esta etapa puede acortar la longitud de los cromosomas de un cuarto a un sexto de las dimensiones observadas en leptoteno. En esta etapa se conocen como bivalentes o tétradas.

Los nódulos de recombinación observados con microscopía electrónica paulatinamente se transforman en estructuras planas o barras de recombinación, que presentan una apariencia fibrilar durante el paquiteno. Esta transformación se considera como el verdadero fenómeno de recombinación genética ya que los mismos sitios donde estas estructuras se observaron, aparecen después los quiasmata en profase tardía, se ha visto que el número de nódulos es igual al número de quiasmata y que se distribuyen a lo largo del complejo sinaptonémico de la misma forma: ni dos quiasmata ni dos nódulos de recombinación se encuentran juntos, y la recombinación genética no puede suceder en dos sitios adyacentes.

El CS provee un armazón estructural adecuado para los eventos de recombinación pero se cree que no participa directamente en ellos (21).

Mientras que el leptoteno y el cigoteno ocurren relativamente en corto tiempo, el paquiteno puede durar varias semanas, meses e incluso años.

Diploteno.- Se hacen visibles las cuatro cromátides del cromosoma bivalente debido a la repulsión de los homólogos, éstos no se separan totalmente sino que quedan unidos en uno o mas puntos espaciados a lo largo del cromosoma, que se denominan quiasmata. Cada quiasma representa el resultado del entrecruzamiento que se llevó a cabo en paquiteno.

El número y posición de los quiasmata es variable entre los individuos, sin embargo, lo normal es que haya cuando --

menos uno por tétrada.

En este estadio permanecen los oocitos humanos en el ovario fetal desde el quinto mes de vida prenatal hasta antes de la ovulación.

En algunas especies los cromosomas se descondensan de manera que pueden llegar a semejar una interfase, este fenómeno se relaciona con la síntesis de RNA que puede ocurrir en esta etapa, así como con el crecimiento de la célula.

Diacinesis.- En las especies en que se disgregan los cromosomas, aquí vuelven a condensarse y se unen a las fibras del huso.

En esta etapa se alcanza la mayor condensación de los cromosomas profásicos, desaparecen el nucléolo y la envoltura nuclear.

La separación de los bivalentes cromosómicos se hace mas evidente por la disminución de la cantidad de quiasmata que quedan localizados en los extremos distales de las cromátides. A este fenómeno se le conoce como terminalización de los quiasmata.

Metafase I.- Se inicia con la desaparición de la envoltura nuclear y la formación del huso acromático. Las tétradas se mueven al ecuador del huso y se unen a los microtúbulos de manera que puedan segregarse los cromosomas homólogos durante la anafase I.

Anafase I.- Al completarse la anafase I, cada célula hija contiene uno de los dos homólogos por lo que es haploide en cantidad de cromosomas, pero como cada cromosoma es doble, posee $2n$ DNA.

Cuando la segregación anafásica falla, ocurre la no-disyunción primaria, es decir, los cromosomas homólogos de un

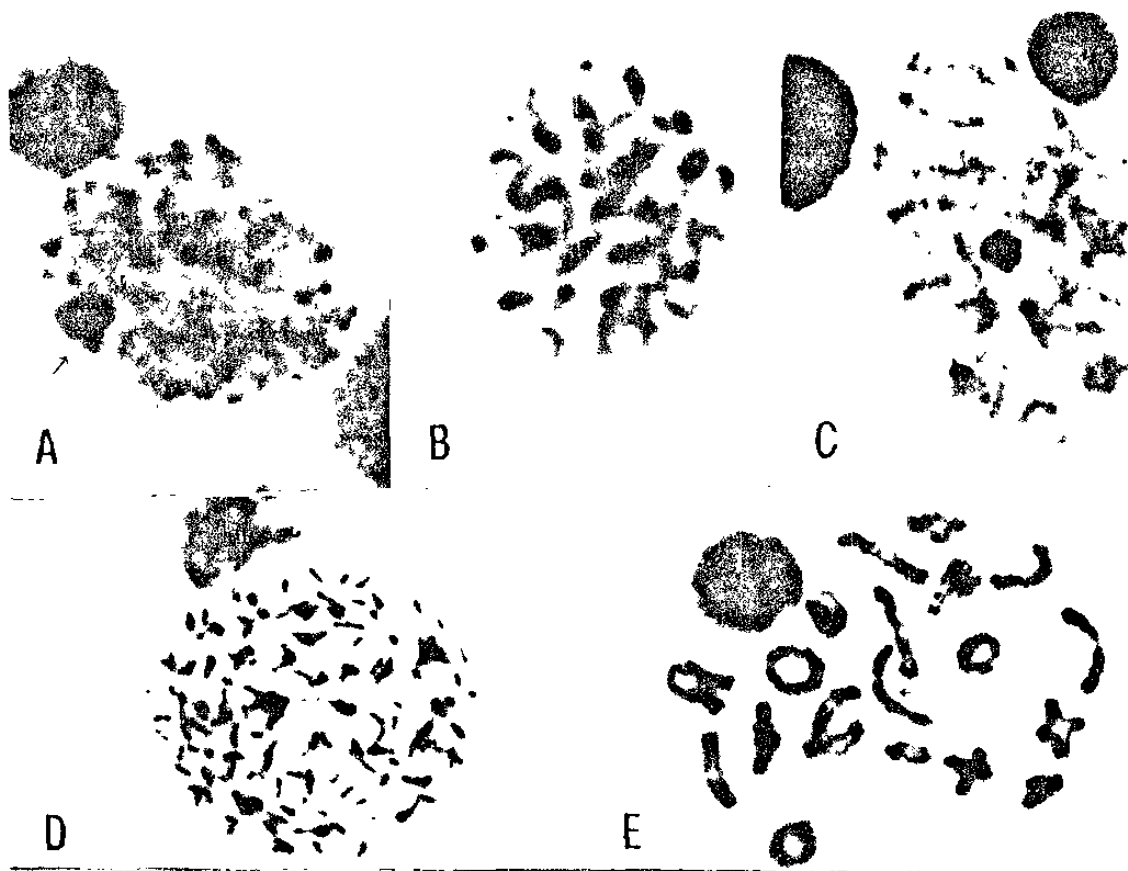


Fig. 2.- Los cinco subestadios de la profase I meiótica:
A.- Espermatocito preleptoténico, se observan pequeños acúmulos de cromatina y condensaciones filamentosas en segmentos muy cortos, la flecha señala el nucléolo. B.- Los cromosomas están mas condensados pero todavía no pueden apreciarse en toda su longitud, los cromosomas sexuales están estrechamente empaquetados en cigoteno. C.- Se observan bivalentes con su estructura cromomérica, la flecha señala la vesícula sexual. D.- En diploteno los cromosomas se disgregan regresando a la apariencia interfásica. E.- En diacinesis se observan las figuras cuadriradiales y en anillo debido a la terminalización de los quiasmata, en el centro se señala el bivalente X-Y.

par no se separan y toda la tétrada se moviliza completa hacia una de las células hijas, produciendo gametos totalmente anormales por falta o exceso de material genético.

Telofase I.- Es una etapa muy corta, los cromosomas no vuelven a la interfase sino que existe una corta intercinesis sin formación de la envoltura nuclear y la profase II se continúa directamente después de la formación de los espermatoцитos secundarios.

Segunda división meiótica.- Los espermatoцитos secundarios tienen el número haploide de cromosomas, son mas pequeños que los espermatoцитos primarios, además de que duran muy poco tiempo en el ciclo espermatogénico por lo que es poco frecuente encontrarlos en el epitelio seminífero.

Los mecanismos por los que ocurre la segunda división son básicamente los mismos que una mitosis pero con dos diferencias significativas: no hay nueva duplicación de DNA y por lo tanto los cromosomas inician la profase II en número haploide.

En la profase II el nucléolo ya no se forma y la envoltura nuclear está ausente. En metafase II se forma el huso acromático y los cromosomas se alinean en el ecuador. En anafase II se separan las dos cromátides de cada cromosoma con división del centrómero; cuando esta separación falla, el fenómeno de no disyunción secundaria origina la formación de gametos normales y gametos anormales en la misma proporción.

En la telofase II se forma la envoltura nuclear alrededor de las células hijas y se pierde la estructura normal de los cromosomas debido a la descondensación.

Después de la telofase II, se forman las espermátides jóvenes que luego deben pasar por el proceso de espermiogénesis antes de liberarse a la luz del túbulo.

La duración de la espermatogénesis en el ratón se ha estudiado en base a experimentos con exposición a radiaciones agudas y en células marcadas con ^{14}C -adenina y ^3H -timidina (22,23), en 33.5-35.5 días.

Por otro lado, se ha determinado el tiempo de duración de cada uno de los estadios celulares en el epitelio seminífero, así como el intervalo de tiempo que transcurre hasta que las células aparecen en el eyaculado (Fig. 3), con lo que se puede inferir que por selección del intervalo adecuado entre el tratamiento y la observación se puede determinar el estadio celular involucrado (24).

Figura 3.- Tiempo de duración de los estadios del ciclo del epitelio seminífero de ratón.

ESTADIO	DURACION EN HORAS
I	22.5
II	18.1
III	8.7
IV	18.6
V	11.3
VI	18.1
VII	20.6
VIII	20.8
IX	15.2
X	11.3
XI	21.4
XII	20.8

SINTESIS DE BIOMOLECULAS DURANTE LA ESPERMATOGENESIS.

En 1962 y 1965 (25,26), Monesi investigó las actividades

sintéticas durante la espermatogénesis del ratón utilizando timidina, uridina, así como aminoácidos marcados con tritio que se inyectaron intraperitonealmente (i.p.) en los animales para después recuperar los tejidos en varios períodos de hasta 60 hs. después de la inyección.

En estos trabajos se identificaron cuatro generaciones de espermatogonias tipo A (que incluyen de la A_1 a la A_4)- una generación de espermatogonias intermedias y otra de tipo B. El tiempo de vida promedio fué muy semejante en todos los tipos de espermatogonias y oscila entre 27 y 30.5 hs.

El promedio de duración del período de síntesis de DNA es de 7.5 a 10.5 hs. En espermatogonias tipo B la síntesis dura mas tiempo y es muy variable, pero presenta menor duración en la espermatogonia tipo I y la A_4 , después se hace mas corto y es mas constante en la espermatogonia tipo A_1 . La síntesis de DNA es muy variable después del período post-sintético, y previo a la meiosis toma lugar en los espermatoцитos primarios en fase de reposo (a través de 14 horas - que dura dicho estadio) y debe terminar antes de la profase.

Con respecto al RNA, el nivel de síntesis en la espermatogonia tipo A es mayor que en la de tipo B, al igual que con la síntesis de proteínas. Esta diferencia probablemente se relaciona con la variación en el grado de condensación del DNA entre los dos tipos de células.

En espermatoцитos primarios en reposo es muy bajo el nivel cuando se inicia la síntesis de DNA, pero luego disminuye mas aun en leptoteno, cigoteno, y casi desaparece en paquiteno temprano.

El nivel de incorporación del precursor incrementa rápidamente a medida que avanza el paquiteno pero declina nuevamente en paquiteno tardío, diploteno y diacinesis para detenerse completamente en metafase y anafase I y II.

Los espermatoцитos secundarios y las espermátides tempranas incorporan muy pequeñas cantidades de uridina tritiada al núcleo. No se encuentra RNA marcado en espermátides del estadio 8 en adelante, ni en el espermatozoide.

Por otro lado, la célula de Sertoli incorpora activamente uridina tritiada al núcleo, concentrándose sobre todo en el nucléolo.

La síntesis de proteínas nucleares y citoplásmicas ocurre en todos los estadios del ciclo de división mostrando su mayor nivel en paquiteno medio entre los estadios II a IV.

Todos los estadios de la espermátide incorporan aminoácidos marcados, con excepción de la espermátide inmadura. La radioactividad aumenta de la espermátide 1 a la 11 y entonces disminuye hasta la 16.

La célula de Sertoli incorpora activamente radioactividad en el núcleo y el citoplasma.

TECNICAS DE ESTUDIO.

En los últimos años se han venido desarrollando pruebas de mutagenicidad que han contribuido al conocimiento del potencial genotóxico de los agentes químicos en el humano y otros mamíferos (27), como las de mutaciones letales dominantes, mutaciones específicas de locus, o de locus múltiple, de translocaciones heredables, etc.

Las técnicas disponibles para evaluar el efecto en células germinales pueden llevarse a cabo durante la gametogénesis, la fertilización, el desarrollo embrionario, así como en el adulto, y las pruebas citogenéticas deben acompañar cualquier tipo de estudio mutagénico (28).

El progreso de las técnicas citogenéticas en mamíferos ha ampliado tremendamente el conocimiento de los cromosomas humanos y muchos defectos diagnosticados como desórdenes con-

génitos se han investigado para establecer la relación entre aberraciones cromosómicas y la etiología correspondiente (29).

La observación de metafases espermatogoniales es de utilidad en la detección de cambios numéricos y estructurales en los cromosomas, sin embargo, generalmente son eliminados de manera selectiva en la primera división mitótica y las condiciones son mas favorables cuando se consideran las células meióticas (13).

Falconer y colaboradores (30) y Cattanach (31) fueron los primeros en detectar translocaciones en la progenie F_1 de animales machos tratados con un compuesto químico. Los resultados positivos de estos estudios sugieren que la observación de cromosomas meióticos de machos tratados (por medio de la prueba de espermatocitos) o de su progenie (prueba de translocaciones heredables) pueden ser un método simple y demostrativo para probar rutinariamente la mutagenicidad potencial en mamíferos.

Las primeras técnicas de obtención de cromosomas meióticos se basaban en el apalastamiento ("squash") de un fragmento de túbulo seminífero teñido con orceína (32,33,34), con lo cual, aunque se demuestra una buena parte de los estadios de la meiosis, no siempre proporciona figuras lo suficientemente extendidas para un análisis detallado.

Evans y colaboradores (op.cit. 12) describieron la primera técnica de "secado al aire" que mejoró en mucho la calidad de las preparaciones, particularmente para la observación de diacinesis y metafase I en el humano y en el ratón.

Poco después empezaron a practicarse variaciones de la técnica descrita por Evans, utilizando diversas soluciones hipótónicas, fijadoras y diferentes períodos de incubación en las mismas, se ha logrado mayor calidad en las preparaciones meióticas en diferentes especies (35,36,37).

ANALISIS CROMOSOMICO EN EL RATON.

Por medio del estudio del cariotipo en sangre periférica del ratón, se ha determinado que el complemento cromosómico diploide en el animal macho corresponde a 40,XY (Fig.4).

Generalmente, todos los cromosomas son descritos como acrocéntricos (38), aunque realmente pertenecen a un tipo especial de cromosoma que no presenta brazos cortos cuando se tienen con giemsa o nitrato de plata, reciben el nombre de telocéntricos y han sido descritos para algunas especies de mamíferos (39, fig.5).

Las alteraciones cromosómicas que pueden ser observadas durante el análisis citológico de los espermatocitos después de tratamiento con agentes químicos en espermatogonia y en meiosis se describen a continuación (13):

Translocación Recíproca.-

Involucra un intercambio de segmentos terminales entre cromosomas no homólogos y requiere que haya un rompimiento y una reparación posterior. La heterocigocidad producida por una translocación de este tipo puede dar lugar a la formación de un anillo de cuatro cromosomas (que se simboliza como R IV), o bien cuando un brazo falla para asociarse, origina una cadena de cuatro (C IV), de tres cromosomas mas un univalente (C III + I), de un bivalente mas dos univalentes, o pueden formarse varios univalentes cuando los quiasmata no se mantienen debidamente o cuando se presentan lesiones.

Algunas translocaciones pueden ser el origen de la nondisyunción, fenómeno que dá por resultado la aparición de un cromosoma extra en los espermatocitos primarios.

Cambios estructurales diversos.-

Se han encontrado translocaciones robertsonianas en algunas líneas de ratones, que se identifican como un gran bivalente en anillo formado por fusiones céntricas espontáneas en los cromosomas.

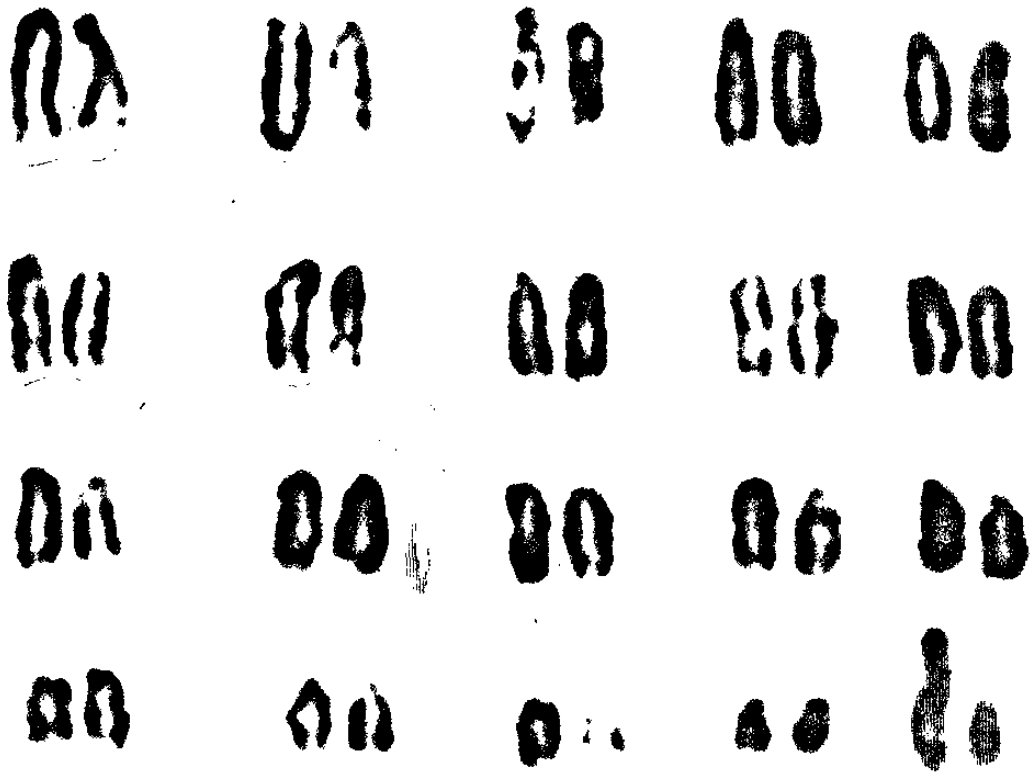


Fig. 4.- El cariotipo de ratón obtenido de una espermatogonia en mitosis. Fórmula cromosómica masculina normal 40,XY.

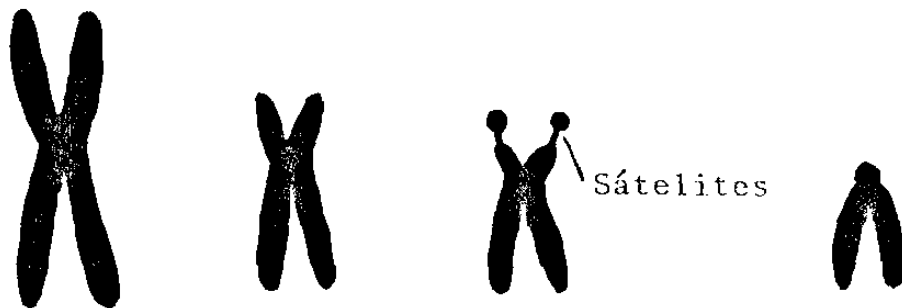


Fig. 5.- Clasificación de los cromosomas de acuerdo a la posición del centrómero: A.Metacéntrico, B.Submetacéntrico, C.Acrocéntrico, D.Telocéntrico.

Las inversiones paracéntricas o pericéntricas no han sido detectadas hasta ahora, pero se piensa que si puede investigarse la presencia de inserciones, según se ha demostrado - en ratones machos portadores de una translocación específica.

Fragmentos.-

Aunque las aberraciones cromosómicas mas inestables se pierden durante la división celular, se pueden observar fragmentos de material semejante a la cromatina en espermatocitos en división. No se ha determinado la frecuencia.

Univalentes Autosómicos y Sexuales.-

Los univalentes resultan de un proceso asináptico previo, Son mas notorios cuando se trata de los cromosomas sexuales y específicamente en los machos, ya que los cromosomas sexuales son muy diferentes y solo pueden aparearse a través de un - - corto segmento homólogo en los extremos distales de los brazos.

La frecuencia espontánea de univalentes sexuales se ha calculado entre 6 - 10%.

Poliploidías.-

En las preparaciones meióticas de ratones tratados y testigo, son frecuentes las tetraploidías en espermatocitos primarios. Sin embargo, en estudios de ratones con translocaciones conocidas se determinó que dichas poliploidías se deben a artefactos que se originan debido a la presencia de puentes intercelulares naturales en la población del túbulo seminífero, o a sobreposición de células al momento de preparar las laminillas.

La frecuencia de poliploidías en animales testigo varía en un rango de 3-6% en espermatocitos.

MUTAGENESIS. -

Los mecanismos de mutagénesis eran completamente desconocidos hasta que se reconoció al DNA como el material genético, después de lo cual se han venido desarrollando hipótesis muy precisas acerca de la acción de muchos mutágenos químicos (40).

Sin embargo, las pruebas de mutagenicidad permanecen aún relativamente escasas dada la alta cantidad de químicos que se agregan cada día a nuestro ambiente.

El análisis cuidadoso de los procedimientos técnicos que se utilizan para probar el riesgo de dichas sustancias para la población, indica que muy pocas investigaciones cumplen los requisitos de los métodos estándar válidos (13,41).

Desde el primer estudio genético en el ratón doméstico tratado con mostaza nitrogenada por Falconer (op.cit.) y posteriormente otras investigaciones (32,42,43) se ha reconocido la importancia del uso de la técnica de obtención de los cromosomas meiósicos en espermatoцитos de machos tratados con agentes químicos, como demostrativa de potencial genotóxico en mamíferos.

El etil-metano-sulfonato (EMS 62-50-0*) es un agente alquilante con peso molecular de 124.16 daltons y su fórmula química corresponde a $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OSO}_2\text{CH}_3$. Se conoce desde 1958 (44) cuando empezó a utilizarse como droga antineoplásica, pero cayó en desuso debido a su alta toxicidad, después de lo cual se ha venido utilizando como un mutágeno experimental.

En 1970, Cumming y Walton (45), trabajando sobre el metabolismo del EMS en el ratón, trataron machos inyectándolos i.p. con EMS marcado radioactivamente para cuantificar la radioactividad que se presentaba en homogenizados de diferentes tejidos, encontrando que la distribución del químico en el orga

* Número de registro del Chemical Abstracts Service, U.S.A.

nismo es muy rápida: se empieza a observar radioactividad - 15 minutos después de la inyección. En las primeras cuatro horas el movimiento es muy lento pero después se acelera notablemente para alcanzar el testículo, el epidídimo y el bazo en forma uniforme y activa, casi en la misma dosis que se administró y después es hidrolizado, encontrándose restos en el aire exhalado, en la orina y las heces.

Posteriormente, Segal y colaboradores (46) estudiando el modo de acción del EMS concluyeron que dicha molécula etila - al nitrógeno 7 y el oxígeno 6 de la guanina, al nitrógeno 1 y 3 de la adenina y al nitrógeno 1 de la citocina.

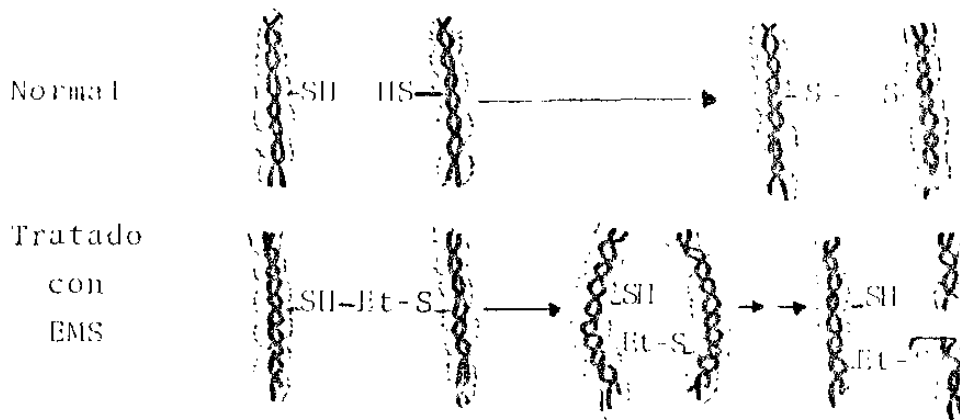
En 1978, Segal y Owens (47), determinaron que las protaminas son más frecuentemente etiladas por el EMS inhibiendo - la condensación normal de la cromatina en el núcleo espermatóico al etilar los grupos sulfhidrilos impidiendo la forma--- ción de los enlaces disulfuro entre las cisteínas.

Esta alteración en la condensación de la cromatina llega a producir una gran presión en la estructura de la cromatina que eventualmente puede resultar en el rompimiento cromosómico. Este rompimiento puede originarse directamente en el punto de etilación o a cierta distancia de él, y se ha sugerido que puede ser el resultado de la despurinización de una base etilada y la hidrólisis del puente fosfato con el azúcar. La presión resultante de la etilación de los residuos de cisteína en la protamina puede ser suficiente para romper el otro hilo de DNA y producir el rompimiento cromosómico (Fig.6).

Por otro lado, se estudió el efecto de la dosis, en la inducción de alteraciones en células germinales de ratón, que se trataron con dosis de 50 a 300 mg/kg, determinando los rangos en que se pueden producir efectos tales como mutaciones letales dominantes (por arriba de 100 mg/kg) en espermátide tardía, translocaciones heredables (desde 50 mg/kg) y al-

teraciones orgánicas, anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide y anomalías en la meiosis (150-200 mg/kg), estableciendo como dosis promedio para producir daño celular observable dos semanas después de la aplicación, la de 200 mg/kg, lo cual es de importancia en la determinación de la naturaleza del daño y en la evaluación de los resultados en diferentes especies (46).

Fig. 6.- Modelo de Segal y Owens para la producción de rompimientos cromosómicos por etilación de la cromatina después de la exposición al EMS. La línea punteada corresponde a las protaminas asociadas al DNA.



Se sabe que el efecto cromosómico requiere de que ocurra un período de síntesis de DNA para hacer manifiesto el daño, sin embargo, se ha informado de casos en que se ha observado que las alteraciones pueden producirse independientemente de que intervenga un período S (58).

En los estudios de mutagénesis química en sistemas de mamíferos es importante conocer si las células germinales con

capaces de reparar el DNA dañado.

La capacidad de reparación del DNA puede investigarse "In Vivo" en células germinales meióticas y post-meióticas - de ratón haciendo uso de la secuencia de eventos que ocurren durante la espermatogénesis y la espermiogénesis.

Por estudios comparativos mediante la utilización de -- varios homólogos químicos del EMS (MMS, metil-metano-sulfonato; PMS, propil-metano-sulfonato; e IMS, isopropil-metano-sulfonato; además del propio EMS), se ha sugerido la posibilidad de que el sistema de reparación del DNA en células germinales de ratones machos es más eficiente en reconocer y reparar DNA metilado y que a medida que aumenta la cantidad de grupos alquil, la eficiencia de reparación disminuye ya que se encontró que el DNA dañado con MMS presenta mayor capacidad de reparación, siguiéndole el EMS, IMS y PMS en orden sucesivo.

Se ha informado de un buen número de modelos experimentales que permiten la detección de agentes de acción mutagénica en el hombre y se conoce que dichos agentes son responsables de una significativa proporción de anomalías cromosómicas en meiosis, reducción de la fertilidad, así como de -- causar alteraciones morfológicas en espermátide tardía y espermatozoide (49,50,51,52,53, 54,55).

Además, se ha demostrado epidemiológica y experimentalmente en mamíferos que el mismo modelo masculino es muy sensible a la no-disyunción debido a que se producen mutaciones que alteran el apareamiento de los cromosomas homólogos y por lo tanto la formación del complejo sinaptonémico, dando lugar a la formación de desbalances cromosómicos (56,57).

Una de las pruebas que se utilizan ampliamente a nivel mundial es la Wyrobeck y Bruce (59), para el estudio de los cambios morfológicos en la cabeza del espermatozoide, que pueden ser inducidos por mutágenos químicos de diversos tipos. Muchos investigadores han tratado de encontrar alguna relación

entre la frecuencia de alteraciones morfológicas del espermatozoide y la aparición de aberraciones cromosómicas en meiosis, siempre con resultados negativos (58,59,28).

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

El material biológico consistió en 18 ratones machos de genotipo híbrido C 57 BL x CD 1 (F₁) de dos a tres meses de edad.

El modelo se seleccionó en base a pruebas preliminares en las que se analizó el porcentaje de formas anormales de espermatozoides en las líneas paternas puras, así como en el híbrido, donde se encontró una disminución en la frecuencia porcentual de aparición de dichas anomalías.

Los animales se dividieron en seis grupos de tres ratones cada uno, para hacer un total de cinco repeticiones del tratamiento y un grupo testigo.

El EMS se administró i.p. por cinco días consecutivos en una dosis de 200 mg/kg de peso. El grupo testigo se trabajó de la misma forma, pero solamente utilizando agua tri--destilada estéril (vehículo).

Después de la administración del tratamiento, los animales se mantuvieron en el laboratorio por dos semanas. Posteriormente se inyectaron con 0.5 ml de colchicina 10^{-5} M, se sacrificaron por dislocación cervical y se practicó la -- disección para tomar los testículos, el epidídimo y los conductos deferentes. Estos últimos para la prueba de la morfología de la cabeza del espermatozoide (59) y de esta manera comparar la frecuencia de anomalías en los animales tratados y los testigos para valorar el efecto mutagénico del EMS.

El material testicular se procesó según la técnica de Evans y colaboradores (12), de la siguiente manera:

1.- Después de la extracción el material testicular se mantiene en una solución de citrato de sodio al 2.5%, para conservarlo fresco mientras se trabaja.

2.- Bajo observación con el microscopio estereoscópico se rompe la albugínea para liberar los túbulos seminíferos que posteriormente se fragmentan tratando de obtener la mayor cantidad de células que sea posible.

Un indicador de que se han liberado las células del túbulo es el hecho de que la solución se torna blanquecina y grasosa.

3.- Con una pipeta Pasteur se toma la solución para -- filtrarla a través de varias capas de tela de gasa y se coloca en un tubo de ensaye.

4.- Se centrifuga a 800 rpm por diez minutos, para sedimentar el botón celular y separar la solución en que se colocó inicialmente.

5.- Se decanta el sobrenadante y se agregan 5 ml de solución hipotónica de citrato de sodio al 1% por veinte minutos a temperatura ambiente.

6.- Se centrifuga a 800 rpm por diez minutos para retirar la solución hipotónica.

7.- Se decanta el sobrenadante y se agregan 5 ml de solución fijadora de Carnoy, se resuspende y se deja por 10 minutos a temperatura ambiente.

8. El último paso se repite varias veces para retirar restos celulares y espermatozoides. El botón nuclear obtenido se refrigera de 3 a 72 hs antes de preparar las laminillas.

9.- Después de la refrigeración se resuspende el botón en nueva solución fijadora y se centrifuga para decantar el sobrenadante.

10.- Se agrega solución fijadora y se resuspende el sedimento.

11.- Con una pipeta Pasteur se toman unas gotas y se dejan caer libremente sobre un portaobjetos limpio y libre de grasa.

12.- Una vez que se han secado las preparaciones se procede a teñirlas con colorante giemsa de 10 a 12 minutos.

El análisis de las preparaciones teñidas se llevó a cabo en un microscopio Zeiss K-7 a 1200 aumentos en un total de 300 células por caso y se fotografiaron campos seleccionados con un fotomicroscopio Zeiss Axiomat.

PREPARACION DE LOS FROTIS DE ESPERMATOZOIDES.

El epidídimo y los conductos deferentes se fragmentaron y resuspendieron en 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M pH 7.3.

La suspensión se filtra en una malla de cobre de 200 -- mesh para eliminar los fragmentos de tejido.

La solución obtenida se utiliza para preparar los frotis que se dejan secar a temperatura ambiente, permaneciendo libres de polvo por 12 hs.

Se fijan en una solución de metanol, formaldehído y ácido acético en las mismas proporciones, por una hora.

Se lavan en agua y se tiñen con Eosina Y al 1% por una hora. Se lavan nuevamente en agua corriente y se dejan secar durante 24 horas antes de hacer el análisis microscópico de la morfología del espermatozoide.

En un microscopio Zeiss K-7 se estudiaron 100 espermatozoides por laminilla, en un total de 300 laminillas por grupo para determinar el porcentaje de anomalías en la forma de la cabeza del espermatozoide.

R E S U L T A D O S

PREPARACION DE CROMOSOMAS MEIOSICOS POR "SECADO AL AIRE".

La centrifugación a que se somete el botón celular obtenido de los túbulos seminíferos permite la separación de un gran número de núcleos de células espermatogénicas en diferentes momentos del ciclo celular, así como de cabezas de espermatozoides que se han desprendido de su flagelo (como se observa en la figura 10 A).

Las figuras meiósicas identificadas en las preparaciones obtenidas, se grafican en la figura 7, comparando las frecuencias de aparición (en porciento) de cada una de las fases de la meiosis encontradas en cada grupo.

La frecuencia promedio calculada en cada caso fué: en leptoteno 23.5%, cigoteno 16%, paquiteno 43%, diacinesis 8%, metafase I 6% y metafase II 3.5%. Los núcleos en diploteno no fueron bastante escasos en las preparaciones analizadas.

Los estadios meiósicos utilizados en el análisis cromosómico son la diacinesis, la metafase I y la metafase II. Las descripciones se hacen generalmente, considerando que la diferencia entre las dos primeras es muy sutil y no se hace distinción entre ellas, sin embargo, en este trabajo preferimos separarlas totalmente distinguiéndolas respectivamente por la prevalencia o ausencia total de quiasmata.

ALTERACIONES CROMOSOMICAS IDENTIFICADAS DESPUES DEL TRATAMIENTO MUTAGENICO.

Las anomalías de la meiosis que pueden ser identificadas directamente como alteraciones cromosómicas después del tratamiento con EMS, se resumen en la figura 8. Las cadenas

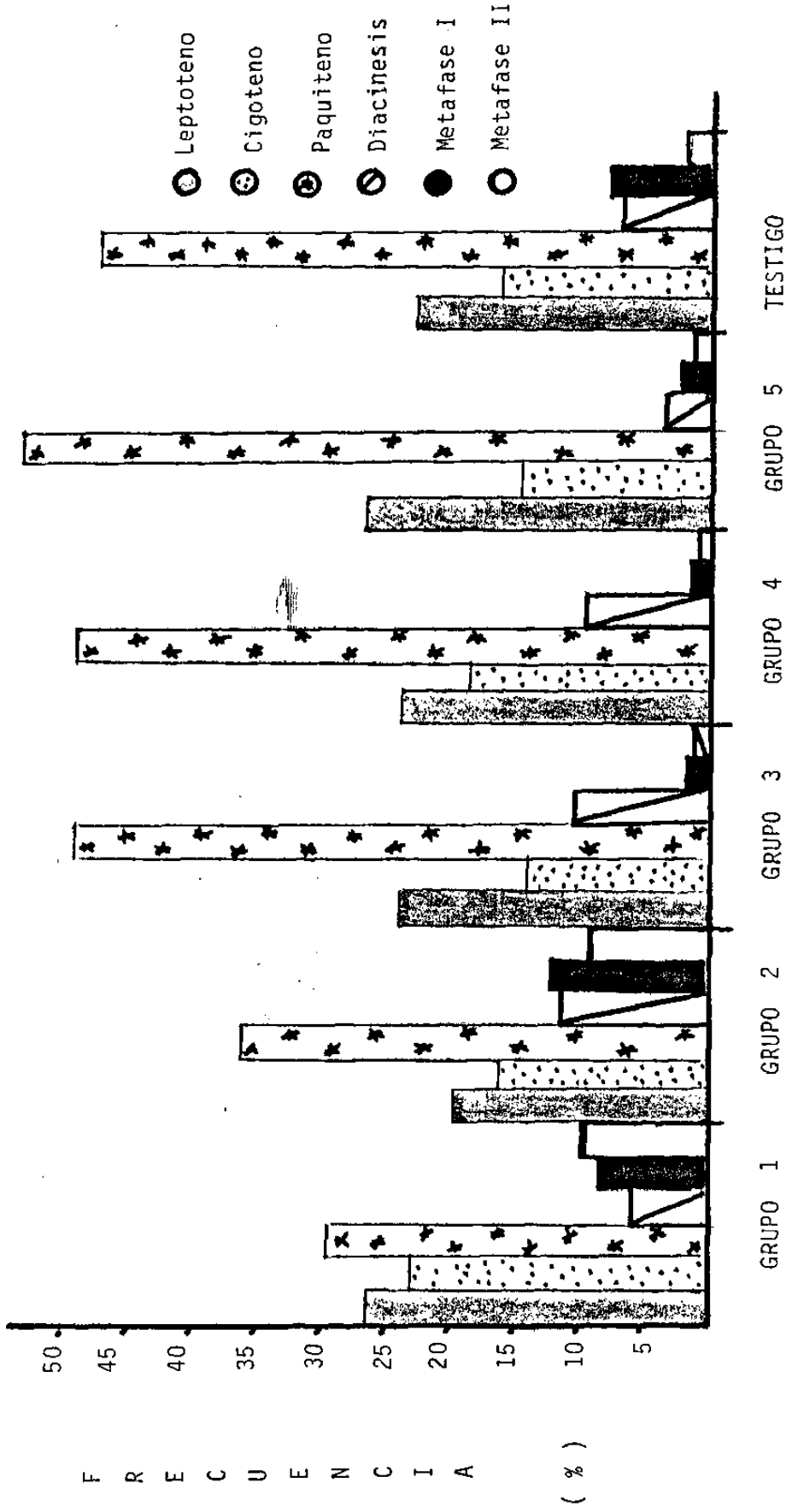


Fig. 7.- Frecuencia de aparición de los estadios de división meiótica encontrados.

y los anillos multivalentes, así como los fragmentos cromosómicos y la presencia de cromosomas aparentemente submetacéntricos en metafase II pueden tener su origen en rompimientos cromosómicos causados por el EMS.

En el grupo testigo que no recibió el mutágeno, no se identificó ninguna alteración cromosómica en espermatoцитos.

Figura 8.- Alteraciones cromosómicas identificadas en meiosis después del tratamiento mutagénico.

DIACINESIS	{ Cadenas multivalentes Anillos multivalentes Fragmentos cromosómicos
METAFASE I	{ Fragmentos cromosómicos Bivalentes rezagados
METAFASE II	{ Cromosomas aparentemente submetacéntricos

Diacinesis.

En este momento de la meiosis se identificaron cadenas multivalentes (1.8%) como la observada en la figura 9 A, -- donde además puede reconocerse un bivalente con una condensación de cromatina que raramente se encuentra en el material estudiado con fines mutagénicos y cuya función e impor

tancia biológica es desconocida. En la misma fotografía la mayoría de los bivalentes presenta una configuración - cuadrirradial y otro está formando un anillo debido a la -- terminalización de los quiasmata.

Aparentemente la figura 9 B está incompleta, al igual que la primera, ya que se cuentan menos de 20 bivalentes - en la fotografía, pero se puede identificar el bivalente - XY, así como varios anillos cromosómicos que han empezado a a abrirse debido a la terminalización de los quiasmata, antes de que el resto de los bivalentes lo haga.

Los anillos multivalentes pueden identificarse debido a la presencia de mas de un par de centrómeros en el bivalente (Fig. 10 A) cuando la tinción con giemsa permite la - visualización microscópica de las zonas centroméricas.

La frecuencia con que aparecen este tipo de anomalías cromosómicas en meiosis es de 0.9% y en un mismo juego cromosómico se puede presentar mas de un tipo de alteración, como se muestra en la figura 10 A, donde se puede estudiar el complemento cromosómico de dos células vecinas que se - mezclaron durante la preparación de las laminillas, con un total de bivalentes cercano a los 40, y con dos bivalentes sexuales.

Los fragmentos cromosómicos producidos por lesiones también se presentaron en este estadio, en un 0.5% (fig. 10 B , donde encontramos un complemento cromosómico de 20 bivalentes).



Figura 9.- Diacinesis. A.- Una cadena multivalente está señalada con la flecha gruesa, a la derecha se indica una rara condensación de cromatina. B.- Terminalización de los quiasmata en los bivalentes en anillo, mas tempranamente que el resto de los bivalentes. La flecha indica el XY.

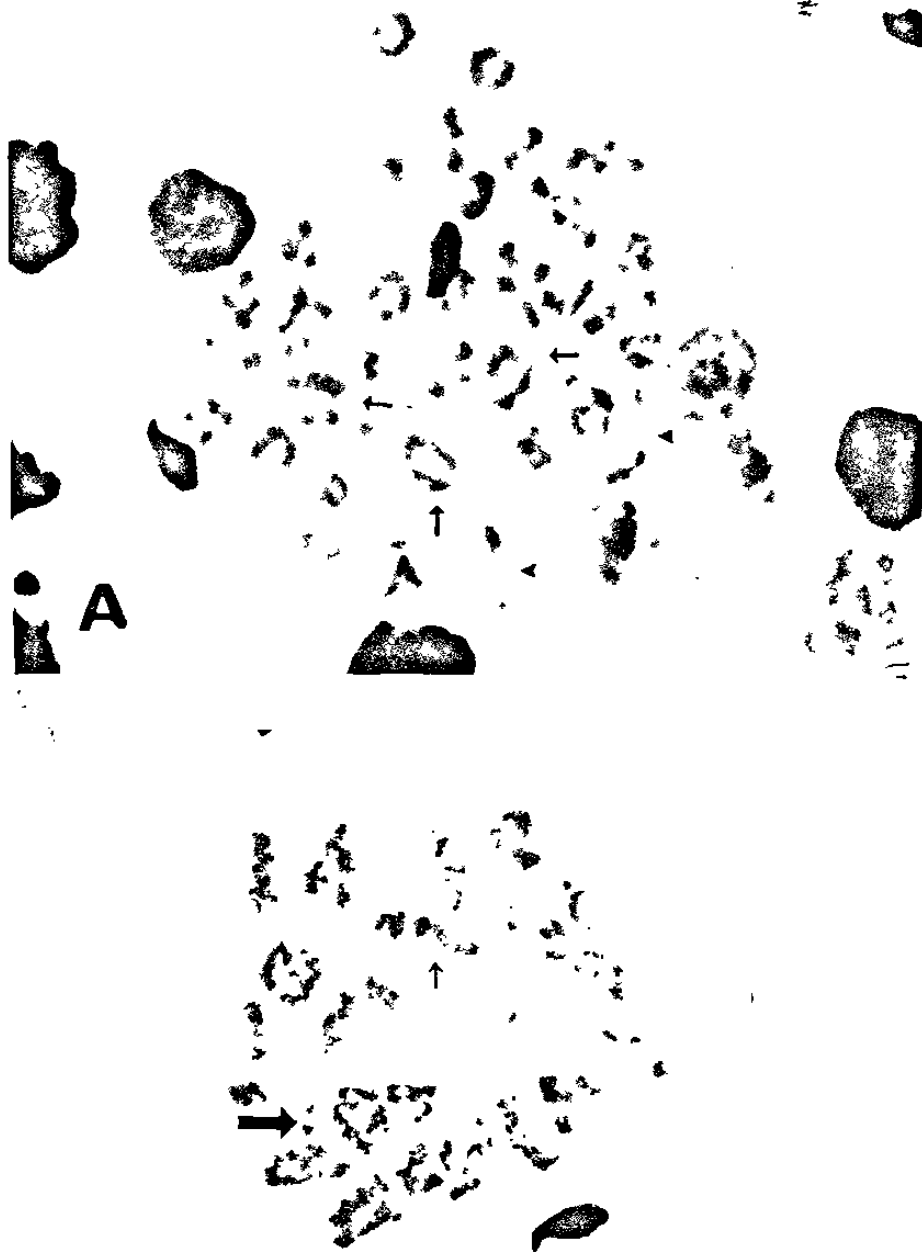


Figura 10.- Diacinesis. A.- Las cabezas de flechas señalan los dos bivalentes sexuales. Se muestran una cadena y dos anillos multivalentes entre varios núcleos de células espermatogénicas y cabezas de espermatozoides. B.- Un fragmento cromosómico está indicado por la flecha gruesa en una diacinesis con 20 bivalentes, la flecha superior señala el sexual.

Metafase I.

En esta etapa desaparecen totalmente los quiasmata y -- pueden observarse 20 cromosomas dobles, de ellos 38 corres-- ponden a los autosomas y dos a los cromosomas sexuales X e Y.

Los homólogos se mantienen unidos a nivel del centrómero por lo que cada par semeja un cromosoma metacéntrico (fig.5).

La apariencia espiralada de los cromosomas en esta etapa es característica. Son muy largos y cuando se tiñen con -- giemsa su coloración es mas pálida que los cromosomas en dia-- cinesis o los de los núcleos de espermatogonias en mitosis.

En metafase I se encontraron bivalentes que se mantienen unidos por quiasmata cuando los demás ya se han separado o -- terminado totalmente (fig.11) a los cuales denominamos aquí como bivalentes rezagados (0.1%).

Los fragmentos cromosómicos se encontraron en un 0.3% -- de los núcleos analizados en esta etapa.



Figura 11.- Metafase I. La apariencia en espiral es característica de esta fase. A la izquierda se observa un bivalente donde la terminalización de los quiasmata se ha rezagado. La flecha mas pequeña -- señala un fragmento cromosómico.

Metafase II.-

En esta etapa el cromosoma sexual ya puede identificarse como X o Y individualmente. En el caso del primero es fácil reconocerlo en la metafase, ya que se presenta mas condensado que el resto de los cromosomas (fig.12). Se pueden distinguir 20 cromosomas dobles, de apariencia un tanto variable, según el grado de condensación de los cromosomas, debido a que pueden ser muy semejantes a los cromosomas en metafase I (espiralados) o encontrarse mas compactados, cortos y gruesos, como en la figura 13, donde observamos 20 cromosomas que son aparentemente metacéntricos, puesto que los cromosomas sencillos se mantienen unidos a nivel del centrómero. En la figura mencionada se muestra un cromosoma de tipo "submetacéntrico", lo cual nos indica que puede ser el portador de una alteración cromosómica de tipo delesi3n o translocaci3n, que lo haya hecho cambiar del tipo "metacéntrico" normal.



Figura 12.- Metafase II. Los cromosomas tienen la misma apariencia que en metafase I pero se distingue por la presencia de un cromosoma X doble mas condensado que el resto de los cromosomas, señalado con la flecha.

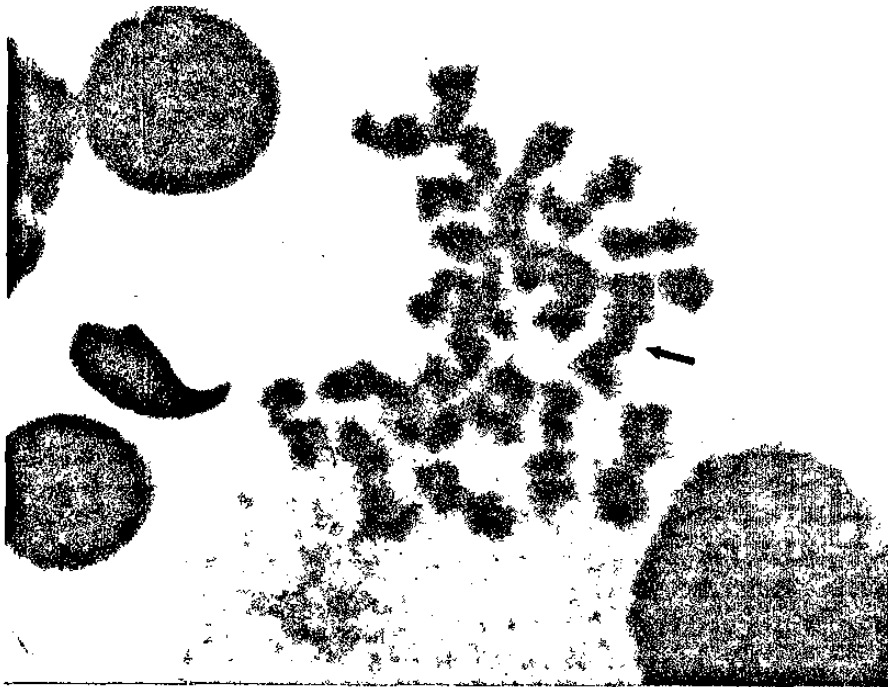


Figura 13.- Metafase II.- La flecha indica un cromosoma "submetacéntrico", probable portador de una alteración. La condensación de los cromosomas es mayor que en la figura anterior, los cromosomas se ven muy cortos y gruesos.

Otros hallazgos.

Células aparentemente poliploides se encontraron en varios estadios de división en los espermatocitos (fig. 14).

En los bivalentes paquiténicos frecuentemente se observan asociaciones a nivel del centrómero en los que se presentan prolongaciones de cromatina que adoptan formas variables e incluyen dos o mas cromosomas a la vez (fig.15).

Por otro lado, en los animales testigo, se encontraron metafases espermatogoniales alteradas (fig. 16) con aneuploidía (41 cromosomas) en la foto A, o con poliploidía (doble complemento cromosómico por endoreduplicación) en la B.

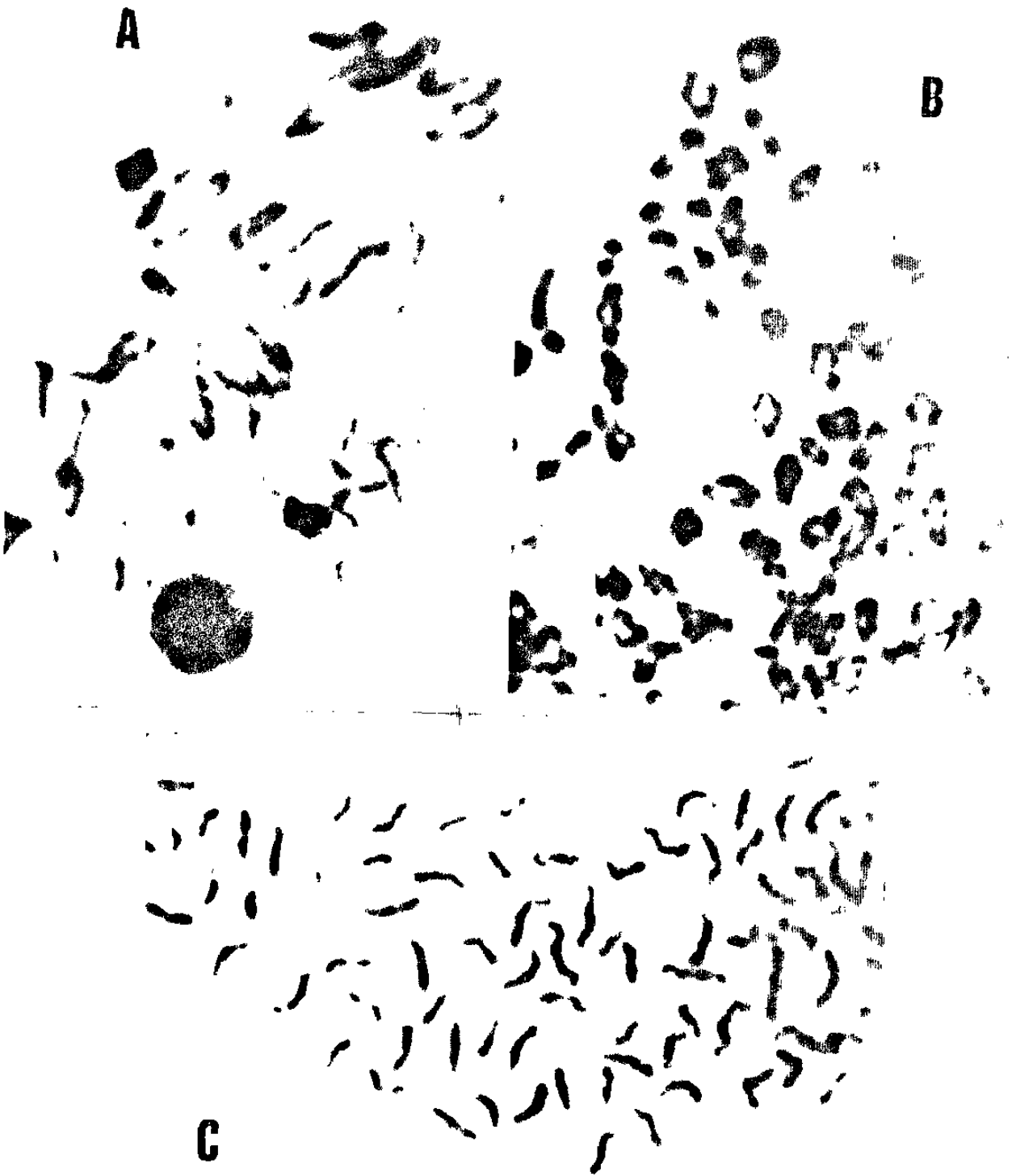


Figura 14.- Falsas poliploidías en espermatocitos en diferentes fases de división: A. Paquiteno, B. Diacinesis, C. metafase meiótica.

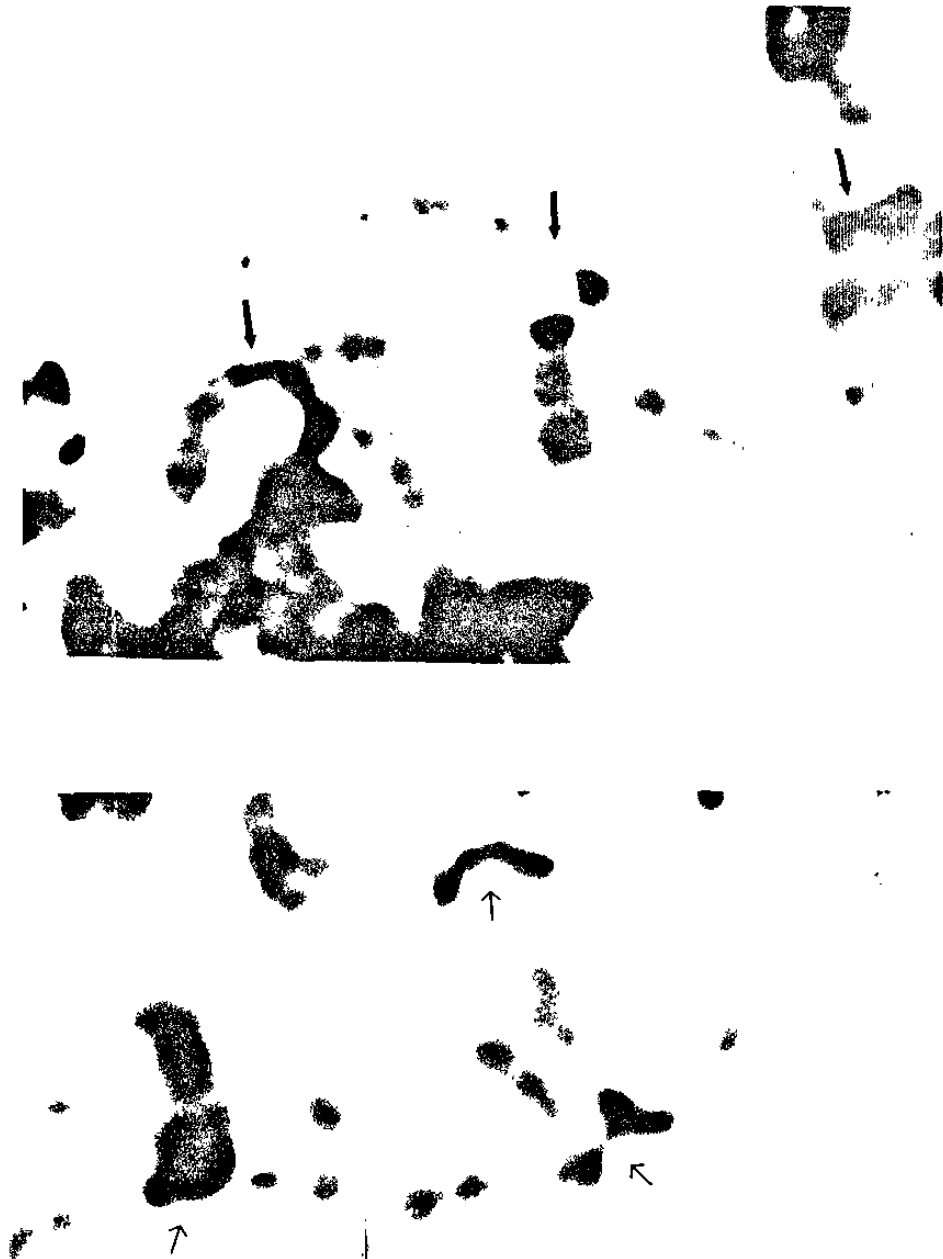


Figura 15.- Asociación de cromosomas paquiténicos a nivel del centrómero. Las flechas indican las prolongaciones de la cromatina centromérica que mantienen unidos los cromosomas.

Análisis Estadístico.

De acuerdo con el objetivo principal de este trabajo, se compararon los promedios de alteraciones encontradas entre los diferentes grupos de tratamiento por medio de un análisis de varianza.

El promedio porcentual de células alteradas en diacinesis, metafase I y metafase II se sumariza en la figura 17.

Los resultados de esta prueba estadística demuestran que las diferencias encontradas entre los grupos de tratamiento no son significativas ($P < 0.05$).

Cabe aclarar que aunque en el grupo 4 no se encontraron anomalías cromosómicas, se consideró comparable, ya que se encontró muy poca celularidad en las preparaciones obtenidas del mismo (se contaron 150 células en total). Con esta base los datos obtenidos en dicho grupo fueron utilizados en la valoración.

Cuando la comparación se hace en el sentido horizontal de la tabla presentada en la figura 17 para establecer la diferencia entre los promedios de anomalías que se observaron en las diferentes fases de la meiosis, se encontró que las diferencias si tienen importancia estadística ($P < 0.05$) entre diacinesis, metafase I y metafase II.

Esto puede explicarse en base al momento en que la célula recibe el tratamiento dentro del ciclo del epitelio seminífero, ya que las células estudiadas en diacinesis debieron recibir el tratamiento en preleptoteno y se pudo hacer manifiesto el daño cromosómico en mayor proporción.

Además, las anomalías que se pueden detectar en cada -



Figura 16.- Metafases obtenidas de espermatogonia de ratón no tratado. A.- Con 41 cromosomas en total, uno de los cuales es metacéntrico (cabeza de flecha), probablemente debido a una translocación. B.- Endoreduplicación.

estadio son diferentes y la permanencia de cada tipo celular en el túbulo también es un factor importante en la evaluación de éste parámetro.

En la figura 18 se grafican los promedios porcentuales de alteraciones cromosómicas encontradas en cada grupo considerando juntas todas las fases meióticas utilizadas para el análisis citogenético; se incluye también el grupo testigo para hacer la comparación, ya que no se encontraron alteraciones en este caso, es muy clara la diferencia obtenida experimentalmente.

Figura 17.- Promedio porcentual de células alteradas en cada fase de la meiosis por grupos, en los animales que recibieron el tratamiento mutagénico (sin incluir el testigo).

FASE	G R U P O S					Promedio
	1	2	3	4	5	
Diacinesis	7	5	2	0	2	3.2
Metafase I	1	0	1	0	0	0.4
Metafase II	1	1	0	1	1	0.8
Promedio	3	2	1	0.3	1	

* Cuando se comparan las frecuencias entre los grupos tratados, la F calculada es de 0.7656 y la F teórica al 0.05 es de 3.48, por lo tanto las diferencias no tienen significado estadísticamente.

** Cuando la comparación se hace entre las fases de la meiosis (utilizando los promedios enlistados en línea vertical) las diferencias si son importantes estadísticamente ya que la F calculada es de 4.19 y la F teórica al 0.05 es de 3.89.

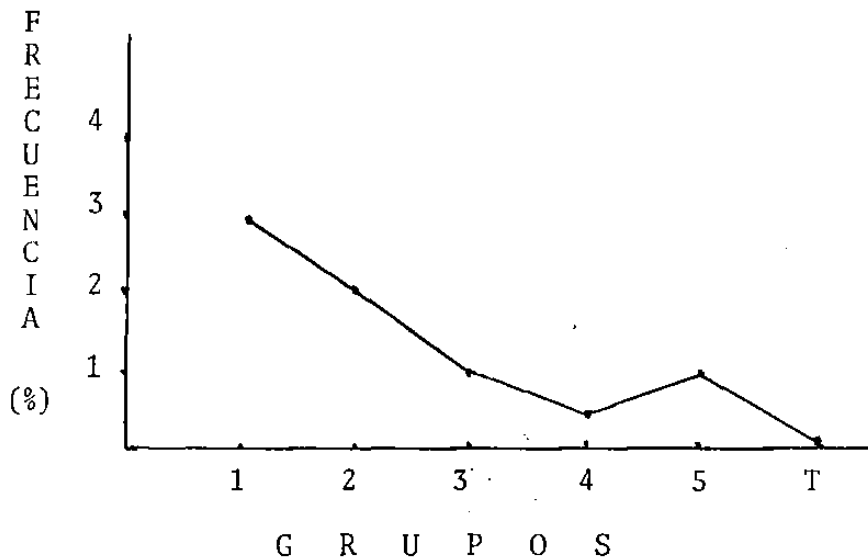


Figura 18.- Frecuencia de aparición de alteraciones cromosómicas en promedio para cada grupo de tratamiento y el grupo testigo.

INDUCCION DE ALTERACIONES EN LA MORFOLOGIA DEL ESPERMATOZOIDES.

En una etapa preliminar al estudio cromosómico, se investigó el porcentaje de formas anormales de espermatozoides así como el tipo de anomalías en el híbrido utilizado, el cual presenta un 6% de formas anormales espontáneas, mientras que en los grupos tratados, aumentó a 24% de anomalías en la forma de la cabeza del espermatozoide.

Las alteraciones encontradas fueron de las denominadas como amorfas, en un 10.7%; filamentosas en 7.6%; con defecto del gancho 5.6%, así como macrocéfalos y bicéfalos o biflageados en 0.3% (fig.19).

En ambos casos, tratados y testigos, los mas frecuentes fueron los espermatozoides de tipo amorfo, aunque los filamentosos y los que presentan defectos en la formación del gancho, no mostraron gran variación en la frecuencia con la

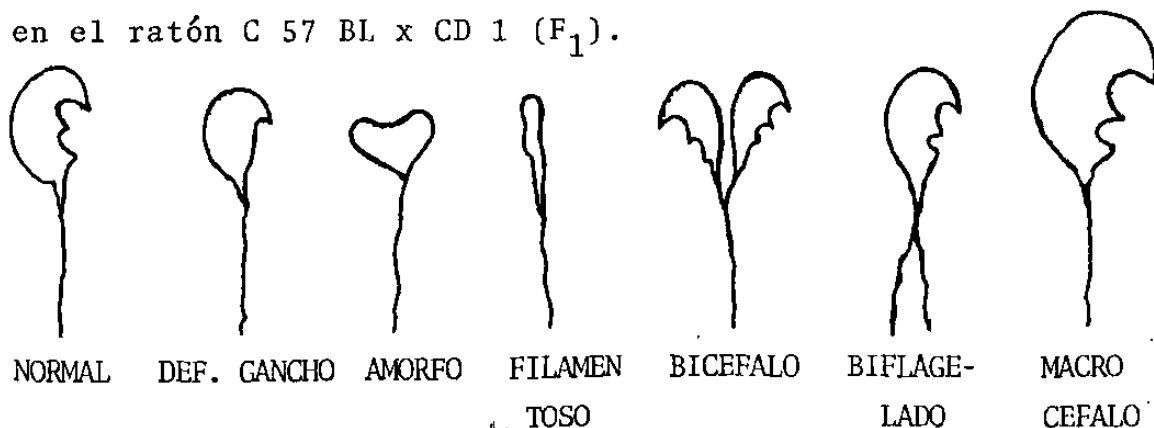
que se presentan en el grupo testigo (fig. 20).

No se observaron efectos tóxicos a consecuencia del químico en los animales tratados, pero se encontró una ligera disminución en el tamaño testicular, además de comportamiento agresivo después del período de tratamiento.

Figura 19.- Distribución de porcentajes de formas anormales de espermatozoides en animales tratados y los testigos.

GRUPO	AMORFO	DEF. GANCHO	FILAM.	OTROS
Testigo	3.0	1.6	1.3	0.01
1	8.13	3.3	7.6	0.65
2	12.40	9.1	10.3	0.03
3	9.36	3.2	6.9	0.01
4	14.65	7.3	6.3	0.01
5	9.20	5.3	7.0	1.03
Total de tratamientos.	53.74	28.36	38.0	1.74
\bar{x} de tratamientos (sin incluir el testigo).	10.74	5.6	7.6	0.3

Figura 20.- Formas anormales de espermatozoides encontrados en el ratón C 57 BL x CD 1 (F_1).



D I S C U S I O N

La técnica utilizada en el presente trabajo resultó efectiva para la obtención de cromosomas de ratón en meiosis, propios para análisis citogenético.

La interpretación de los cromosomas meióticos requiere de un estudio cuidadoso y detallado, uno de los principales problemas por los que se atraviesa en este tipo de trabajos es debido a la cantidad de material con que se cuenta, y a que las soluciones que se utilizan son selectivas para determinadas especies y fases de división.

Con respecto a la frecuencia con que aparecen las fases de la meiosis en las preparaciones analizadas, es muy notorio que el paquiteno es el estadio más frecuente a lo largo del ciclo del epitelio seminífero, mientras que los estadios de utilidad en el diagnóstico de alteraciones cromosómicas son más escasos.

La diacinesis es la etapa que se encuentra más frecuentemente en las laminillas estudiadas (cuando se calcula la frecuencia porcentual de aparición de cada una de las fases de la meiosis utilizadas para diagnóstico cromosómico), además de que es el que puede estudiarse con más detalle debido a que es en este estadio cuando los bivalentes alcanzan su mayor grado de condensación.

Cuando se utilizan mutágenos químicos para análisis citogenético, uno de los mejores modelos de estudio "In Vivo" es el que utiliza células espermatoogénicas, ya que éstas se diferencian cíclicamente, pudiéndose analizar a la vez, y en buen número, células en diferentes estadios después de una sola aplicación del mutágeno.

Las alteraciones cromosómicas pueden producirse en cualquier momento del ciclo celular, independientemente de que ocurra un período de síntesis de DNA; sin embargo, la mayor parte de los químicos producen alteraciones en células que se encuentran en la fase S al momento del tratamiento, o entre este período S y la metafase.

En el caso particular de los espermatoцитos es posible estudiar el efecto de agentes químicos analizando la profase meiótica I en diacinesis y metafase.

En muchas ocasiones, si la célula atraviesa por un período S entre el tratamiento y el sacrificio, el daño producido al DNA por un químico no se manifiesta como aberraciones cromosómicas. Por lo tanto, las células más adecuadas para la demostración de alteraciones de este tipo, son las que se tratan en fase pre-leptoténica.

El tiempo indicado para analizar las células tratadas en preleptoteno, es entre 12 y 14 días después del tratamiento para que alcancen a llegar a diacinesis.

Aunque la probabilidad de registrar una translocación es baja después del tratamiento químico, las aberraciones inducidas pueden producir la muerte celular en la primera o segunda división debido a la pérdida de material cromosómico (60).

Hasta ahora no se han publicado informes de químicos que inequívocamente produzcan una frecuencia significativa de translocaciones, de tal forma que un resultado negativo en este tipo de experimento no implica que el compuesto no produzca aberraciones cromosómicas, sino que no han podido hacerse visibles.

Conociendo esta serie de datos hemos llegado a considerar que no obstante que en nuestros hallazgos las translocaciones son proporcionalmente en baja presentación, existe la posibilidad de que se hayan perdido mas células alteradas en la división meiótica o que haya ocurrido síntesis reparadora de DNA. Además, no existen informes previos de las alteraciones cromosómicas específicas en diacinesis-metafase I producidos por exposición de células espermatogénicas al EMS.

La importancia de los estudios en meiosis radica en el hecho de que los hallazgos citogenéticos representan daño heredable, a diferencia de los estudios de mutagénesis en células somáticas o en espermatogonia, donde los rearrreglos estructurales no son estables y pueden repararse o eliminarse en la primera división mitótica después del tratamiento (13).

Utilizando EMS, Cattanach y cols. (50) y Generoso y cols. (61) demostraron que existe una excelente correlación entre la frecuencia de mutaciones letales dominantes y la frecuencia de aberraciones cromosómicas inducidas en células germinales. Esto ha conducido a la afirmación de que la letalidad dominante es una clara manifestación de rompimientos cromosómicos.

Un problema actual consiste en la determinación del porque el EMS induce mas daño cromosómico en algunos estadios celulares que en otros. En el ratón los estadios germinales mas sensibles al EMS muestran un 50% de mutaciones letales dominantes en espermatozoide y espermátide tardía; además cuando se expone a dosis entre 200-300 mg/kg del mismo químico para inducir mutaciones específicas de locus en estadios meióticos y posmeióticos, se produce mayor frecuencia de dominantes letales.

En el grupo 4 de los animales tratados en este estudio, las células en interfase, en diacinesis y en metafase I fueron bastante escasas y no se identificaron alteraciones en las figuras analizadas. Sin embargo, también se consideró en las pruebas estadísticas porque las causas para que se presentara baja celularidad pueden ser muy diversas. La reacción particular del grupo al tratamiento, la capacidad de reparación de DNA e incluso la centrifugación puede tener un efecto adverso por lo que debe ser cuidadosamente revisada (36).

En este trabajo se encontraron diversas poliploidías "aparentes", que consideramos como artefactos producidos por la técnica ya que en cada una de ellas encontramos que podía delimitarse perfectamente cada juego cromosómico individualmente. Desafortunadamente las pruebas de que dispone en la actualidad no nos permiten hacer una determinación precisa de los problemas de aneuploidías y poliploidías, importantes parámetros en la evaluación del riesgo genético que causan un serio impacto en la salud humana: aproximadamente el 33% de la pérdida fetal temprana y de 5 a 7% de las muertes infantiles, son atribuibles a falta de segregación de los cromosomas meióticos (62).

Hasta ahora, las aneuploidías inducidas por químicos carecen de validez debido a que el ciclo espermatogénico durante su división celular da lugar a la formación de clonas de células comunicadas físicamente por un complejo puente intercelular que constituye un canal abierto para transporte de materiales que permiten el desarrollo sincrónico de las células germinales (63), posteriormente debido a la utilización de la solución hipotónica y otros reactivos, los núcleos se rompen pero su contenido queda situado muy cerca uno de otro en las preparaciones.

Las verdaderas poliploidías pueden originarse después de la segunda división meiótica, como se ha demostrado por la ob

servación de espermatozoides diploides (64) o durante toda la meiosis, por alteraciones cromosómicas estructurales tales como deleciones o translocaciones, que pueden dar lugar a la formación de univalentes que no se segregan adecuadamente.

Aunque las translocaciones en metafase I pueden indicar potencial producción de aneuploidías en las divisiones meióticas subsecuentes, no son consideradas como evidencia directa de su inducción; además como la frecuencia de translocaciones que originan estas anormalidades puede variar dependiendo del tipo de cromosoma involucrado y del tipo de translocación, no puede predecirse una aneuploidía en metafase II (41).

El muestreo de las frecuencias de aparición de los diferentes estadios de división en meiosis es importante en la determinación de las condiciones fisiológicas que prevalecen en el túbulo seminífero. El origen de problemas de infertilidad masculina en los que se detecta arresto celular en alguna fase de división (10) pueden ser las mutaciones meióticas que alteran el apareamiento de los cromosomas homólogos o problemas cromosómicos en meiosis que se acompañen o no de cariotipos somáticos normales.

Además de utilizarse en la confirmación de que el mutágeno está actuando adecuadamente, con el análisis de la morfología del espermatozoide se ha tratado de correlacionar la presencia de alteraciones en la frecuencia de anormalidades cromosómicas con dismorfogénesis en la cabeza del espermatozoide. La forma normal del espermatozoide es determinada por numerosos factores y sus alteraciones morfológicas se han asociado con rearrreglos cromosómicos específicos como las translocaciones recíprocas entre cromosomas sexuales y autosomas. Sin embargo, generalmente no se encuentran aumentadas las anormalidades en la forma de la cabeza cuando se estudian ratones con translocaciones conocidas (28).

C O N C L U S I O N E S

La hipótesis planteada originalmente puede ser aceptada en base a la observación de alteraciones cromosómicas en espermatoцитos primarios y secundarios de ratones tratados con etilmetanosulfonato.

Las anomalías cromosómicas observadas después del tratamiento incluyen modificaciones estructurales del tipo de fragmentos cromosómicos, anillos y cadenas multivalentes, que pueden ser originadas por lesiones y translocaciones en diacinesis, metafase I y metafase II.

Dichas anomalías pueden considerarse dentro del rango de aberraciones que pueden ser producidas por el rompimiento cromosómico que causa el EMS inicialmente.

No se encontraron alteraciones numéricas en espermatoцитos, lo que concuerda con la bibliografía disponible, que no describe alteraciones aneuploides como consecuencia del tratamiento. Sin embargo, todavía hacen falta pruebas mutagénicas válidas para el análisis de las aneuploidías.

El promedio de alteraciones encontradas en los grupos tratados contrasta con el grupo testigo, en el que no se observaron anomalías de ningún tipo, así como con la frecuencia de alteraciones espontáneas informadas en la literatura disponible.

P E R S P E C T I V A S

Este tipo de estudios es muy importante en el área de Biología de la Reproducción, ya que muchos problemas de infertilidad masculina tienen su origen en disfunciones de la meiosis, que no pueden ser demostrados por medio de otros tipos de pruebas.

Las aberraciones cromosómicas, así como alteraciones en la formación del complejo sinaptonémico y la determinación de la frecuencia de quiasmata, pueden ser estudiadas en los mismos pacientes por medio de otras técnicas utilizando el mismo material biológico. Además es muy valioso conocer la frecuencia con que aparecen los diversos estadios de la meiosis, así como la determinación de los patrones de apareamiento cromosómico y las condiciones fisiológicas del tubo seminífero por medio del seguimiento del ciclo espermatogénico.

La obtención del material de estudio no se restringe a la toma de biopsias testiculares sino que puede manejarse también la célula espermátogénica descamada y liberada en el líquido seminal, además de que existen métodos de estudio citogenético que utilizan directamente el espermatozoide.

La prueba de espermátocitos para estudio citogenético en meiosis es de gran valor en la determinación de alteraciones cromosómicas causadas por mutágenos químicos, que pueden ser heredadas directamente a la descendencia.

Como la capacidad de la prueba de espermátocitos muestra variabilidad de acuerdo al tipo de mutágenos químicos que se deseen investigar, es necesario analizar una gran cantidad de células para obtener un resultado confiable en la visualización de alteraciones cromosómicas en meiosis.

Además se recomienda seleccionar adecuadamente el mutágeno que se va a analizar por medio de esta prueba, ya que ciertos químicos no producen alteraciones cromosómicas en meiosis.

R E S U M E N

Con el objetivo de determinar el efecto mutagénico e identificar las alteraciones cromosómicas producidas por el etilmetanosulfonato, se llevó a cabo un análisis citogenético por medio de la prueba de espermatoцитos en células germinales de ratón (C 57 BL x CD 1)F₁ tratado con etilmetanosulfonato (EMS).

Siguiendo las recomendaciones de la Agencia de Protección del Ambiente de los Estados Unidos de Norteamérica (U.S. EPA's), para dar validez a los resultados de estudios mutagénicos en este modelo experimental, donde además se recomienda utilizarlo como parte de un grupo de pruebas para evaluación de mutagenicidad potencial en mamíferos.

Se sabe que el EMS produce alteraciones cromosómicas en base a la determinación de mutaciones letales dominantes en espermátide tardía y espermatozoide, así como la aparición de translocaciones heredables en la progenie de machos tratados con el mutágeno, y disminución de la fertilidad.

Sin embargo, no se han demostrado con anterioridad en meiosis.

Para el aislamiento de los cromosomas meióticos se utiliza la técnica de Evans y cols. (1964). Los cromosomas se tiñen con colorante de giemsa 1.2% en buffer de fosfatos.

El análisis citogenético se lleva a cabo en diacinesis, metafase I y metafase II y se acompaña de la prueba de morfología del espermatozoide para comprobar el efecto nocivo del EMS.

Los resultados muestran alteraciones cromosómicas que se relacionan con rompimientos cromosómicos y corresponden a anillos y cadenas multivalentes, así como fragmentos cromosómicos en espermatoцитos de los animales tratados.

Aunque la técnica es de utilidad en la evaluación de alteraciones cromosómicas en meiosis, la frecuencia con que se encontraron en el presente trabajo fué muy baja.

L I T E R A T U R A C I T A D A

- 1.- Rohrborn,G. Biochemical mechanisms of mutation. In: Chemical mutagenesis in mammals and man. Ed.by F. Vogel and G. Rohrborn. 1970,147-149.
- 2.- Schleiermacher,E. Histological and cytogenetic investigation methods on mammalian spermatogenesis. In: Chemical mutagenesis in mammals and man. Ed.by F.Vogel and Rohrborn. 1970,167-179.
- 3.- Ehling,U.H. Comparison of the mutagenic effect of chemicals and ionizing radiation in germ cells of the mouse. In: Progress in environmental mutagenesis. Developments in toxicology and environmental science. -- 1980, 7:47-58.
- 4.- Adler, I.D. Comparative cytogenetic study after treatment of mouse spermatogonia with mitomycin C. Mut. Res. - 1974, 23:369-379.
- 5.- Bochkov,N.P.;Filippova,T.V.;Kuzin,S.M. and Stukalov,S.V. Cytogenetic effects of ciclophosphamide on human lymphocytes in vivo and in vitro. Mut.Res.1986,159:103-107
- 6.- Das, R.K. Mytomycin C and ethylmethanesulphonate induced sister-chromatid-exchanges in lymphocytes from individuals with Alzheimer's pre-senil dementia. Mut. Res.1986,173:127-130.
- 7.- Rinkus, S.J. and Legator,M.S. The need for both in vitro and in vivo systems in mutagenicity screening. In: - Chemical Mutagens: principles and methods for their-detection. Ed.by de Serres and Hollaender. 1981,6 (Chap.13):365-379.
- 8.- Schmid,W. Chemical mutagen testing on in vivo somatic mammalian cells. Agents and Actions. 1973,32:77-82.
- 9.- Takanari,H. e Izutsu,K. Studies on endoreduplication III. Endoreduplication induced by mitomycin C in PHA stimulated tonsillar lymphocyte cultures. Mut.Res.1983, 107:297-306.
- 10.- Templado,C.;Marina,S.;Call,M.D.;and Egozcue,J. Meiotic -

- studies in human semen. *Hum.Genet.*1980,53:335-339.
- 11.- Oakberg,E.F. A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am. J. Anat.* 1956 a), 99:391-413.
 - 12.- Evans,E.P.;Breckon,G. and Ford,C.E. An air drying method for meiotic preparations from mammalian testes. *Cytogenetics.* 1964, 3:289-294.
 - 13.- Leónard,A. Observations on meiotic chromosomes of the male mouse as a test of potential mutagenicity of chemicals in mammals. In:*Chemical Mutagens. Principles and methods for their detection.* Ed.by A. Hollaender. 1973, 3(Chap.25):21-56.
 - 14.- Roosen-Runge,E.C. The process of spermatogenesis in mammals. *Biol.Fert.* 1961,343-377.
 - 15.- Huckins,C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. I.-Their morphology, proliferation and maturation. *Anat.Rec.* 1971,169:533-558.
 - 16.- Dym,M. The male reproductive system. In:*Histology.Cell and tissue biology.* 5a.Ed'n. Ed. by León Weiss,1983, 1000-1036.
 - 17.- de Robertis,E.D.P. and de Robertis,E.M.F. Meiosis and sexual reproduction. In:*Cell and molecular biology.* 7a. Ed'n. Ed.by Saunders College,Philadelphia,Pa. 1980,400-419.
 - 18.- Karp,G. Proliferación celular y división. En:*Biología Celular.* 2a. Ed'n. Ed. Mc Graw-Hill. 1987,cap. 16: 744-759.
 - 19.- de Torres,M.L. and Abrisqueta,J.A. Study of the human male meiosis. II.Q-banding in pachytene bivalents. *Hum.Genet.* 1978, 42:283-289.
 - 20.- Holm,P.B. and Rasmussen,S.W. Human meiosis VI. Crossing over in human spermatocytes. *Carlsberg Res.Commun.* 1983, 48:385-412.

- 21.- Alberts,B.;Bray,D.;Lewis,J.;Raff,M.;Roberts,K. and ----
Watson,J.D. Cell growth and division. In: Molecular -
biology of the cell. Garland Pub.Inc.1983. Chap 11,
611-640.
- 22.- Oakberg,E.F. Duration of spermatogenesis in the mouse.-
Nature. 1957. 180:1137-1139.
- 23.- Oakberg,E.F. and DiMinno,R.L. X-ray sensitivity of pri-
mary spermatocytes of the mouse. Internat.F.Radiation
Biol. 1960. 2:196-209.
- 24.- Oakberg,E.F. Duration of spermatogenesis in the mouse -
and timing of stages of the cycle of the seminiferous
epithelium. Am.J.Anat. 1956. b). 99:507-516.
- 25.- Monesi,V. Autoradiographic study of DNA synthesis and -
the cell cycle in spermatogonia and spermatocytes of
mouse testis using tritiated thymidine. J.Cell Biol.
1962. 14:154-167.
- 26.- Monesi,V. Synthetic activities during spermatogenesis -
in the mouse. RNA and Protein. Exptl.Cell Res. 1965.
39:197-224.
- 27.- Ashby,J. The unique role of rodents in the detection of
possible human carcinogen and mutagens (ICPEMC). Mut.
Res. 1983. 115:177-213.
- 28.- Wyrobeck,A.J. and Bruce,W.R. The induction of sperm sha
pe abnormalities in mice and humans. In: Chemical Mu-
tagens. Principles and methods for their detection. Ed.
by Hollander and de Serres. 1978. 5(Chap.11):227-285.
- 29.- Sasaki,M. and Makino,S. The meiotic chromosomes of man.
Chromosoma.1965. 16:637-651.
- 30.- Falconer,D.S.;Slyzinski,B.M. and Averbach,C. Genetical -
effects of nitrogen mustard in the house mouse. J.Genet.
1952. 51:81-88.
- 31.- Cattanach,B.M. Induction of translocations in mice by -
triethylenmelamina. Nature. 1957. 180:1364-1365.
- 32.- Schultz,J. and St. Lawrence,P. A cytological basis for a
map of nucleolar chromosome in man. J. of Heredity. -
1949. 40(1):31-38.

- 33.- Yerganian,G. Cytologic maps of some isolated human pachytene chromosomes. *Am.J.Hum.Genet.* 1957. 9:42-54.
- 34.- Welshons,W.J.;Gibson,B.H. and Scandlyn,B.J. Slide processing for the examination of male mammalian meiotic chromosomes. *Stain Technol.* 1962. 37:1-5.
- 35.- Eicher,E.M. An air drying procedure for mammalian male meiotic chromosomes, following softening in gluconic acid and cell separation by an ethanol acetic mixture. *Stain Technol.* 1966. 41:41-46.
- 36.- Meredith,R. A simple method for preparing meiotic chromosomes from mammalian testis. *Chromosoma.* 1969. 26:254-258
- 37.- Luciani,J.M.;Devictor-Viullet,M. and Stahl,A. Hypotonic KCl: An improved method of processing human testicular tissue for meiotic chromosomes. *Clin.Genet.*1971.2:32-36.
- 38.- Brewen,J.G. and Preston,R.J. Analysis of chromosome aberrations in mammalian germ cells. In:*Chemical Mutagens. Principles and methods for their detection.*1978.5,127-149
- 39.- Thompson J.S. and Thompson,M.W. The chromosomal basis of heredity. In:*Genetics in medicine.* 3a. Ed'n. Saunders Co. Eds. 1980. 7-31.
- 40.- Watson,J.D. *Biología molecular del gen.* 3a. Ed'n. Fondo educativo interamericano. 1976. 157.
- 41.- Allen,J.W.;Liang,J.C.;Carrano,A. and Preston,J. Review of literature on chemical-induced aneuploidy in mammalian male germ cells. *Mut.Res.*1986.167:123-127.
- 42.- Leónard,A. and Deknudt,G.H. Meiotic chromosomes rearrangements induced in mice by irradiation of spermatogonial stages. *Can.J.Genet.Cytol.* 1966. 8:520-527.
- 43.- Leónard,A. Radiation induced translocations in spermatogonia in mice. *Mut.Res.* 1971. 11:71-78.
- 44.- Roberts,J.J. and Warwick,C.P. Studies on the mode of action of tumour -growth-inhibiting alkylating agents. I. The fate of ethyl-methane-sulphonate (half-mileran) in the rat. *Biochem.Pharmacol.* 1958. I, 60-75.
- 45.-Cumming,R.B. and Walton,M.F. Fate and metabolism of some mutagenic alkylating agents in the mouse. I.Ethylmethane sulphonate and methylmethanesulphonate at sublethal-

- 46.- Segal, G.A.; Cumming, R.B. and Walton, M.F. Dosimetry studies on the ethylation of mouse sperm DNA after in vivo - exposure to (³H)ethylmethanesulphonate. Mut.Res.1974. 24:317-333.
- 47.- Segal, G.A. and Owens, J.G. Ethylation of DNA and protamine by ethylmethanesulphonate in the germ cells of male - mice and the relevancy of these molecular targets to the induction of dominant lethals. Mut.Res.1978.52:87-106
- 48.- Segal, G.A.; Owens, J.G. and Cumming, R.B. Studies on DNA repair in early spermatid stages of male mice after in vivo treatment with ethyl-, methyl-, propyl-, and isopropyl-methanesulphonate. Mut.Res.1976.36:193-212.
- 49.- Ames, B.N.; Durston, W.E.; Yamasaki, E. and Lee, F.D. Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 1973. 70:2281-2285.
- 50.- Cattanach, B.M.; Pollard, C.E. and Isaacson, J.H. EMS induced chromosome breakage in the mouse. Mut.Res.1968.6:297-30
- 51.- Wyrobeck, A.J. and Bruce, W.R. Chemical induction of sperm abnormalities in mice. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 1975. 72(11):4425-4429.
- 52.- Gallegos, A.G.; Ramírez, E.; de la Garza, S. and Treviño, F. Ethylmethanesulphonate induced changes on the morphology of the seminiferous epithelium of mice. Anat.Rec. 1987. 218(1)
- 53.- Guillivod, N. and Léonard, A. Test for mutagenic effects of chemicals in mice. I. Effects of mitomycin C on spermatogonia. Mut.Res.1971.13:274-275.
- 54.- Lahdetie, J. Micronuclei induced during meiosis by EMS, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene in male rats. Mut.Res. 1983. 120:257-260.
- 55.- Shindo, Y.; Hirano, F.; Maeda, H. and Takeda, U. The micronucleus test with mouse sperm spleen cells. Mut.Res.1983.120:53
- 56.- Pacchierotti, F.D.; Bellicampi, D. and Civitareale, D. Cytogenetic observations in mouse secondary spermatocytes on numerical and structural chromosome aberrations in-

- duced by cyclophosphamide in various stages of spermatogenesis. *Mut.Res.*1983. 119:177-183.
- 57.- Vidal,F.;Templado,C.;Navarro,J.;Bousadin,S.;Marina,S. - and Egozcue,J. Meiotic and synaptonemal complex studies in 45 subfertile males.*Hum.Genet.*1982.60:301-304.
- 58.- Sharma,R.K.;Roberts,G.T.;Johnson,F.M. and Malling,H.U. Translocation and sperm abnormality assays in mouse spermatogonia treated with procarbazine. *Mut.Res.* 1979. 67:385-388.
- 59.- Wyrobeck,A.J.;Heddle,J.A. and Bruce,W.R. Chromosomal abnormalities and the morphology of mouse sperm heads. *Can.J.Genet.Cytol.*1975.17:675-681.
- 60.- Preston,J.;Au,W.;Bender,M.A.; Brewen,J.G.;Carrano,A.V.; Heddle,J.A.;McFee,A.F.;Wolff,S. and Wasson,J.S. Mammalian in vivo and in vitro cytogenetic assays: A report of the U.S.EPA Gene-Tox Program.*Mut.Res.*1981.87:143-188.
- 61.- Generoso,W.M.;Russell,W.L.;Huff,S.W.;Stout,S.K. and Gosslee D.G. Effects of dose on the induction on dominant lethal mutations and heritable translocations with ethylmethanesulphonate in male mice.*Genetics.*1974.77:741-752.
- 62.- Dellarco,V.L.;Mavournin,K.H. and Waters,M.D. An introduction to a series of U.S.Environmental Protection Agency special committee reports on testing approaches for the detection of chemically induced aneuploidy. *Mut. Res.* 1986. 167:3-7
- 63.- Weber,J.E. and Russell,L. A study of intercellular bridges during spermatogenesis in the rat. *Am.J.of Anat.* - 1987. 180:1-24.
- 64.- Beatty,R.A.;Lim,M.C. and Coulter,V.J. A quantitative study of the second meiotic metaphase in male mice (Mus musculus). *Cytogenet.Cell Genet.* 1975.15:256-275.

