

I.- INTRODUCCION.-

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

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

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

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

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

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

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

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

∞

SISTEMA UTILIZADO

PARAMETRO INDICADOR DEL EFECTO CARCINOGENICO.

I.- Inducción de Neoplasias en animales de experimentales.

Mamíferos, generalmente monos, perros ó ratones

Transformación neoplásica demostrada en la necropsia.

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

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

Resistencia a la 6-Ouabaína
Síntesis de DNA no programada indicada por incorporación de Timidina tritiada.

III.- Detección del efecto mutagénico de los carcinógenos.

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

Cambios en el aspecto de las colonias.
Cambios en los requerimientos nutricionales.
Adquisición de resistencia a una droga.
Mutaciones letales dominantes
Clastogénesis: rupturas cromosómicas, intercambio de cromátides hermanas.
Micronúcleos en reticulocitos
Alteraciones en la forma del espermatozoide.

II.- ANTECEDENTES.

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

A.- La Espermatogénesis en el Ratón.

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

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

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

a).- Estructura del Túbulo Seminífero.

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

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

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

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

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

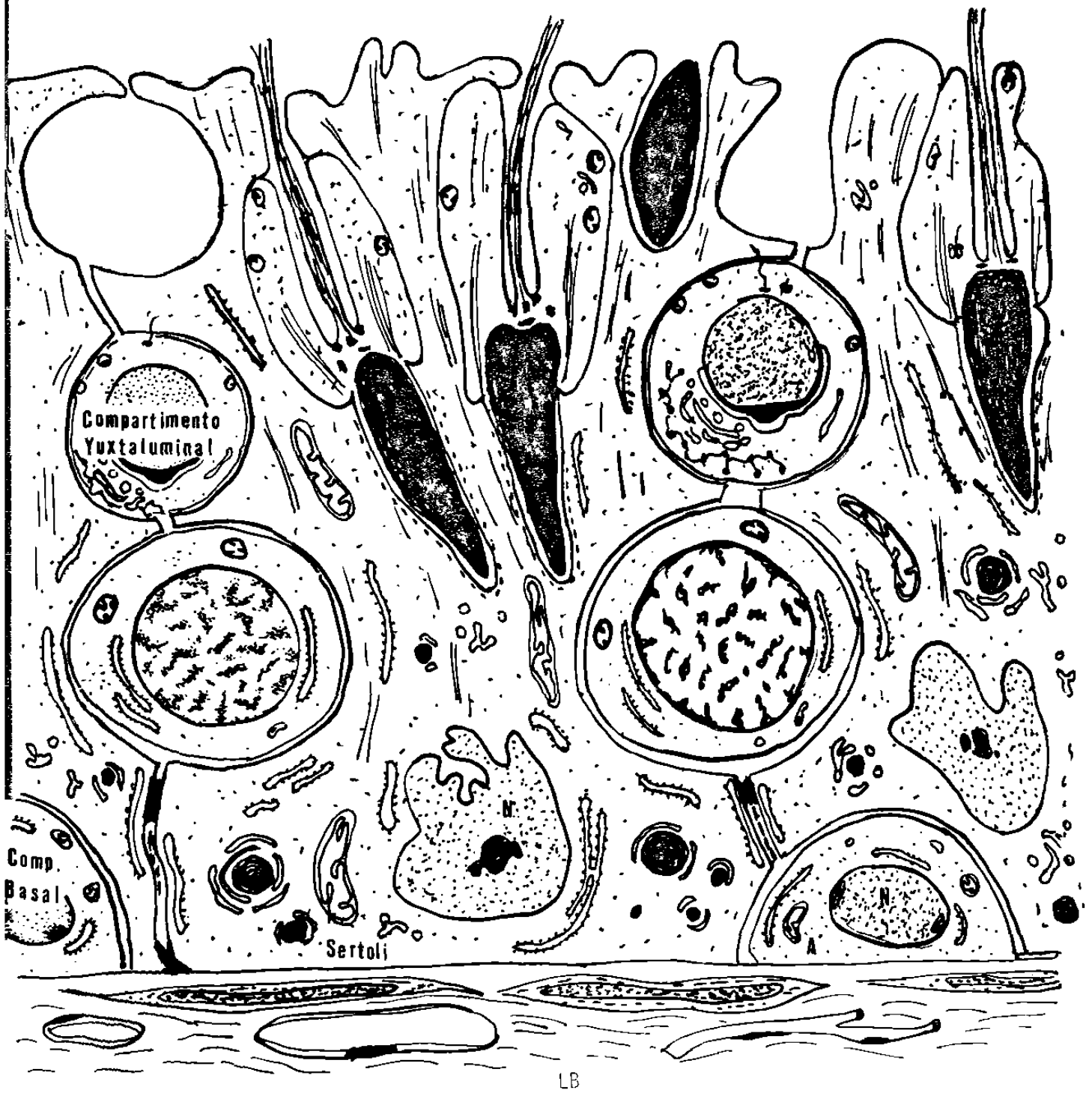


Fig. 2 Población celular del túbulo seminífero. Organización de los compartimentos basal y yuxtaluminar.

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

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

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

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

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

b) El Ciclo del Epitelio Seminífero.

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

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

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

(OAKBERG 1955).

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

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

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

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

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

FIG. 4 DURACION DE LA ESPERMATOGENESIS EN EL RATON (OAKBERG 1957)

Intervalo para alcanzar la forma madura del espermatocitoide en el túbulo.

| ESTADIO | DURACION (Hs) | | |
|------------------------------------|------------------|---------------|---------------|
| | Siempre presente | MINIMO (días) | MAXIMO (días) |
| Espermatogonia A | | 33.5 | 35.5 |
| Espermatogonia intermedia | 27.3 | 28.8 | 30 |
| Espermatogonia B | 29.4 | 27.6 | 28.6 |
| Espermatocito Primario en reposo | 31 | 26.3 | 27.6 |
| Espermatocito Primario Leptoténico | 31.2 | 25.3 | 26.3 |
| Espermatocito Primario Zigoténico | 37.5 | 23.4 | 25 |
| Espermatocito Primario Paquítenico | 175.3 | 16.1 | 23.4 |
| Espermatocito Primario Diploténico | 21.4 | 15.2 | 16.1 |
| Diacinesis + metafase I | 10.4 | 14.8 | 15.2 |
| Espermatocito Secundario | 10.4 | 14.4 | 14.8 |
| Espermátides | 229.2 | 0 | 14.4 |



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

Figura No. 5

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

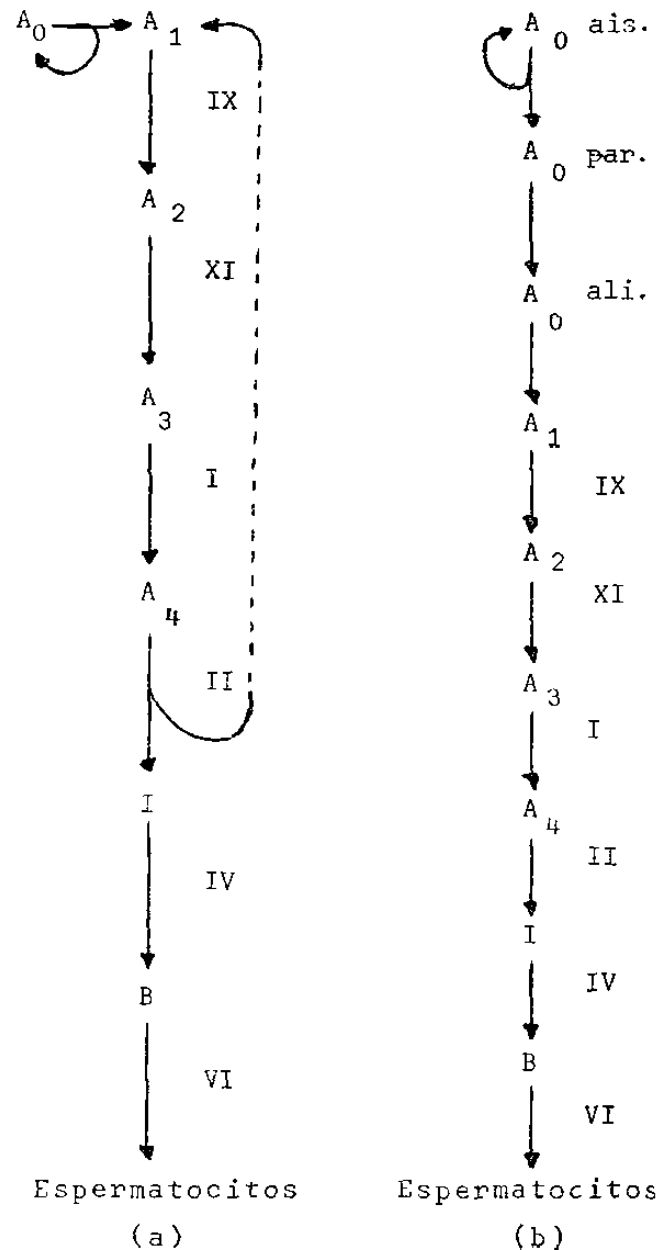


Figura No. 6



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

Figura No. 7



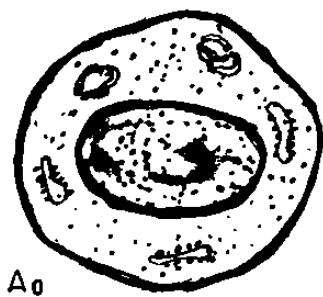
Esquema que representa los modelos de renovación de espermatogonias en el varón; propuestas por Bustos Obregon, 1968 (a) y Luckins, 1971 (b), modificados de acuerdo a Oackberg, 1956. (Ver explicación en el texto). Los números romanos indican las etapas del ciclo en que se dividen las células.

Figura No. 8

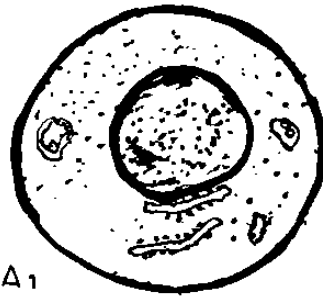
ratón prepuberal (4). Las espermatogonias A, miden unas 12 micras de diámetro, presentan una cromatina nuclear homogénea y nucléolos múltiples y reticulados cerca de la envoltura nuclear. El citoplasma es escaso, finamente granular, pobre en retículo endoplásmico y pequeñas mitocondrias ovoides ó esféricas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

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

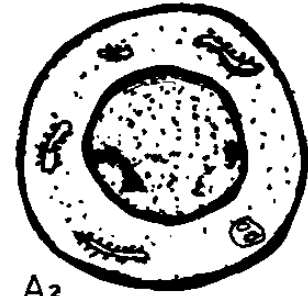
El segundo modelo, propuesto por Huckins y Oakberg (1971) considera a las espermatogonias A_0 , responsables de la renovación y a los tipos A_1 a A_4 , así como las espermatogonias I y B, células en diferenciación. Estos dos modelos de renovación se presentan en esquema de la Fig. 8, tomado de Bratmaska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



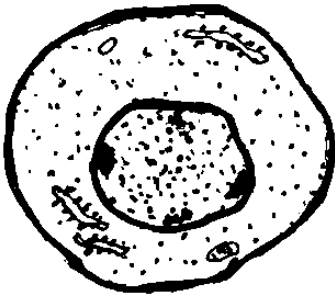
A₀



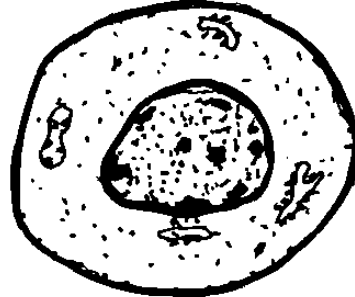
A₁
(VII-IX)



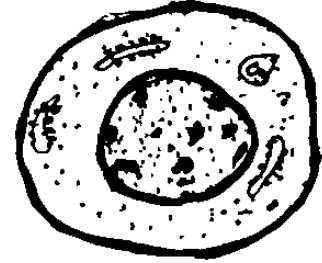
A₂
(IX-XI)



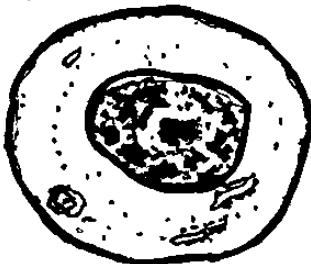
A₃
(XI-I)



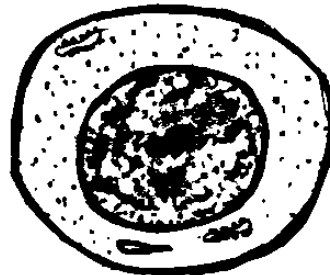
A₄
(I-II)



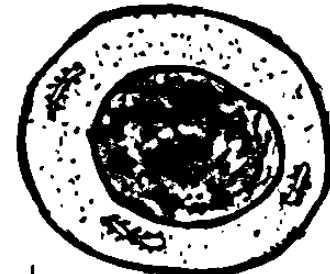
I



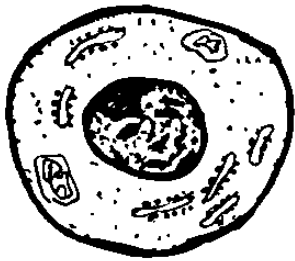
B



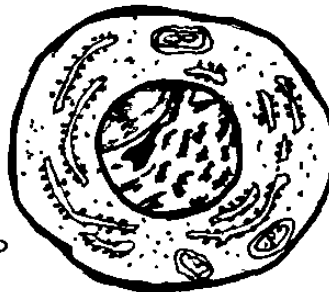
PL



L



Z



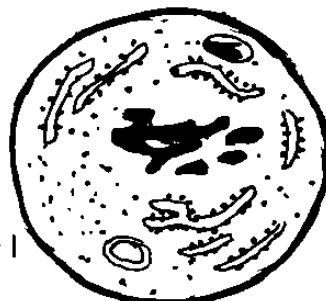
P



DIPL.



DIA



M-I



II

FIG.9 MORFOLOGIA DE ESPERMATOGONIAS Y ESPERMATOCITOS

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

d) Meiosis: Morfología de los Espermatocitos.

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

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

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

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

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

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

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



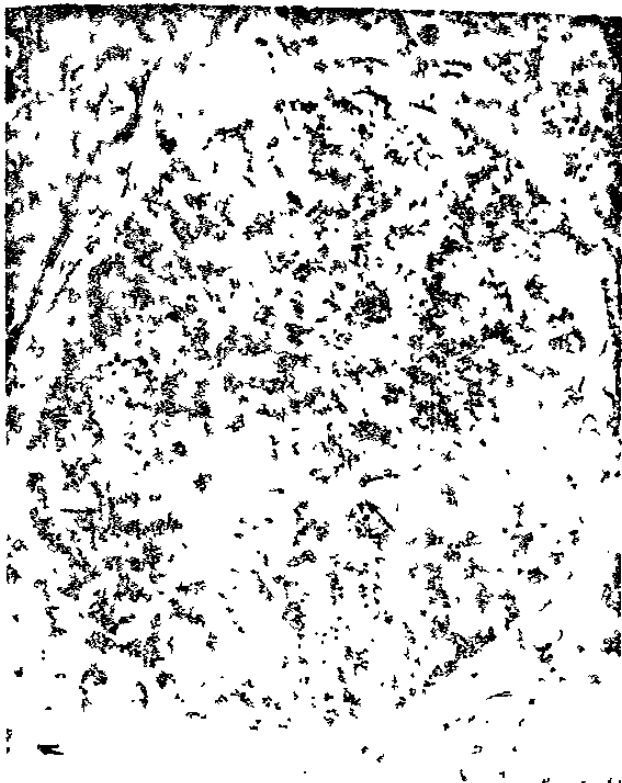
Microfotografía electrónica en la que se observan espermatocitos leptoténicos en el compartimiento yuxtaluminal del túbulo seminífero, separadas de la lámina basal por el citoplasma de una célula de Sertoli. Complejos de unión entre las células de Sertoli -- adyacentes, están señalados con flechas. (b,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

Figura No. 10

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



Figura No. 11

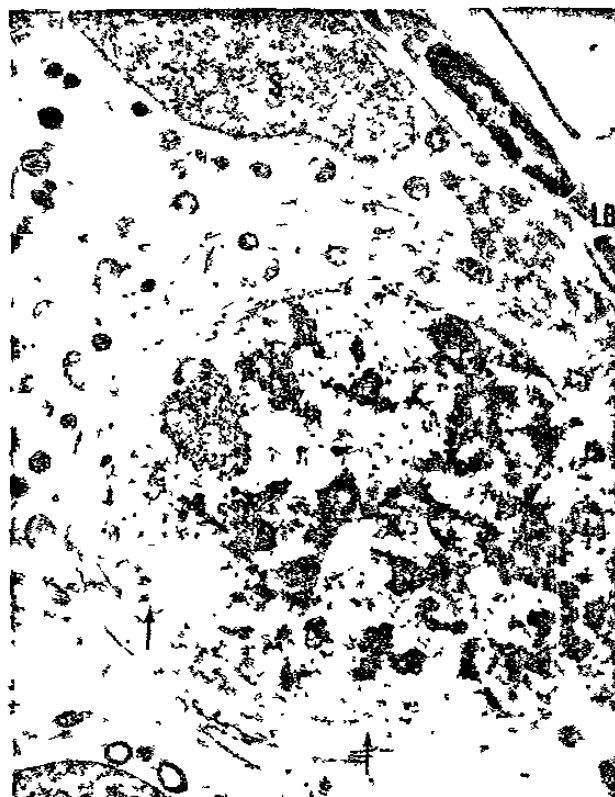


Espermatocito primario paquiténico. El núcleo presenta grumos más gruesos de heterocromatina y se observan los complejos sinaptonémicos (flechas), así como la envoltura nuclear. En el citoplasma, que es menos abundante que en etapas anteriores, se observan mitocondrias y cisternas de retículo endoplásmico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

Figura No. 12

Espermatocito primario diploténico. En el núcleo se observan segmentos de cromatina muy condensada que corresponden a los cromosomas. La vesícula sexual está asociada a la envoltura nuclear, que en algunos sitios ha desaparecido (flechas). Aún se observa material nucleolar. El citoplasma es muy escaso, presenta mitocondrias y una red muy extensa de cisternas membranosas, que se continúa con la cisterna perinuclear. Se señalan la lámina basal y la célula de Sertoli. (9,000 X)

Figura No. 13



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

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

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

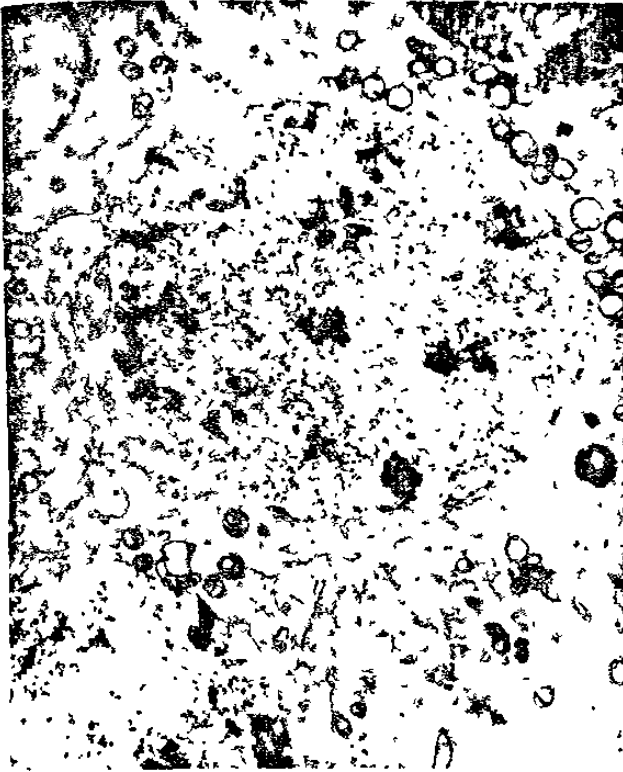
Los estudios ultraestructurales, confirman la escasez de Espermatocitos Secundarios; que tienden a ser más pequeños que los espermatocitos primarios tardíos; su núcleo es esférico con agregados de substancia cromatínica centralmente localizados. Las mitocondrias muestran similitud a las de los espermátides;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

e) Espermiogénesis.

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

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

Los cambios morfológicos que conducen a la formación de espermatozoides



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

(6, 600 X)

Figura No. 14

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

(8, 900 X)

Figura No. 15



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

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

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

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

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

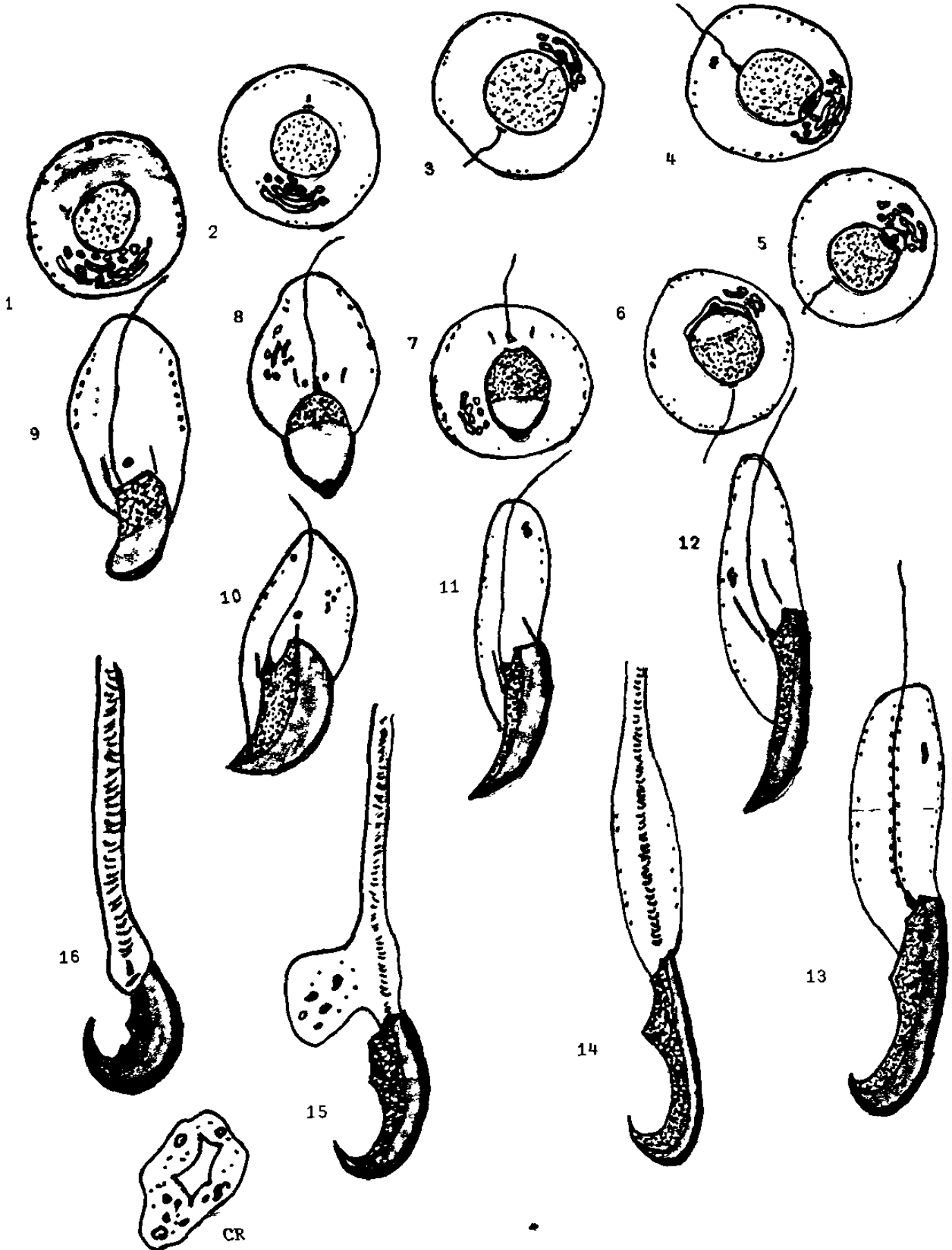
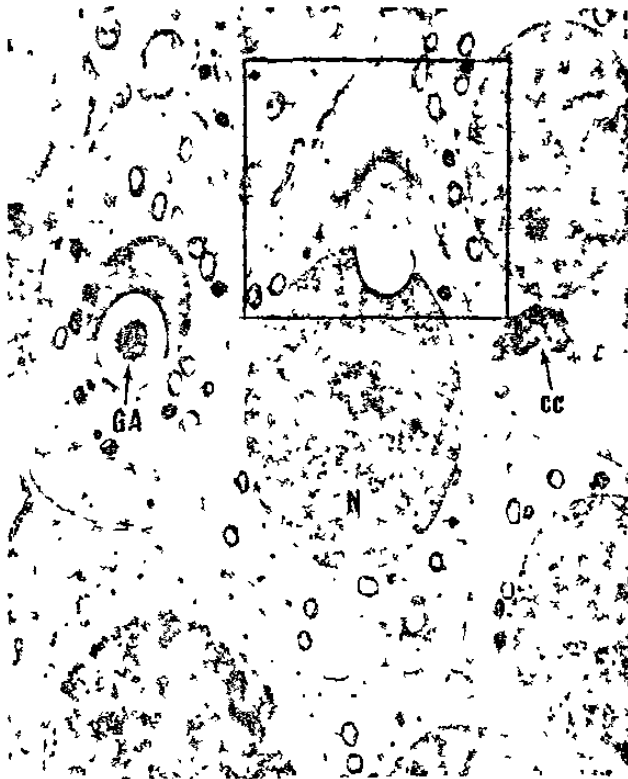


Fig. 16. Espermiogénesis en el ratón.



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

(3, 600 X)

F i g u r a No. 17

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

(7, 300 X)



F i g u r a No. 18

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

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

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

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

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

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



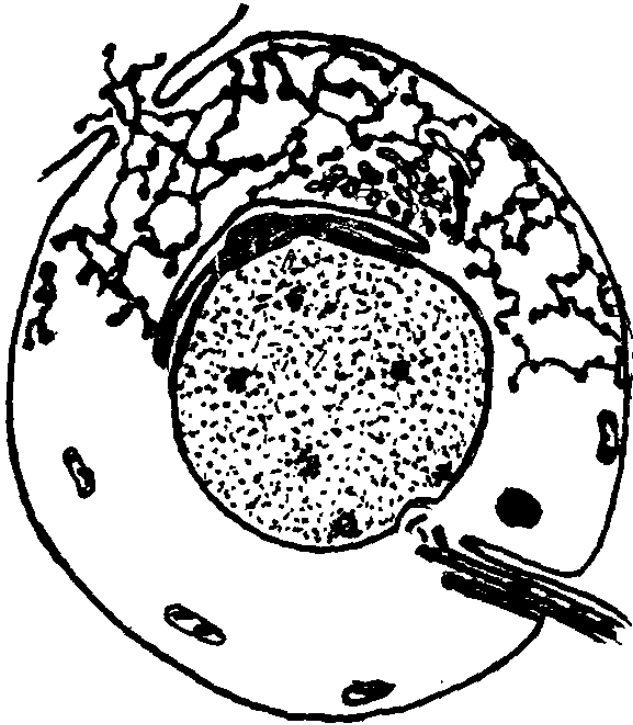
Espermátide en fase de casquete. La envoltura nuclear subyacente al casquete membranoso está engrosada al igual que en la fosa de implantación. En éste sitio se observan el par de centriolos, el annulus (felcha) y el cuerpo cromatoide en relación con el flagelo en formación. El citoplasma es abundante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

Figura 19

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

Figura 20





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

Figura No. 21

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

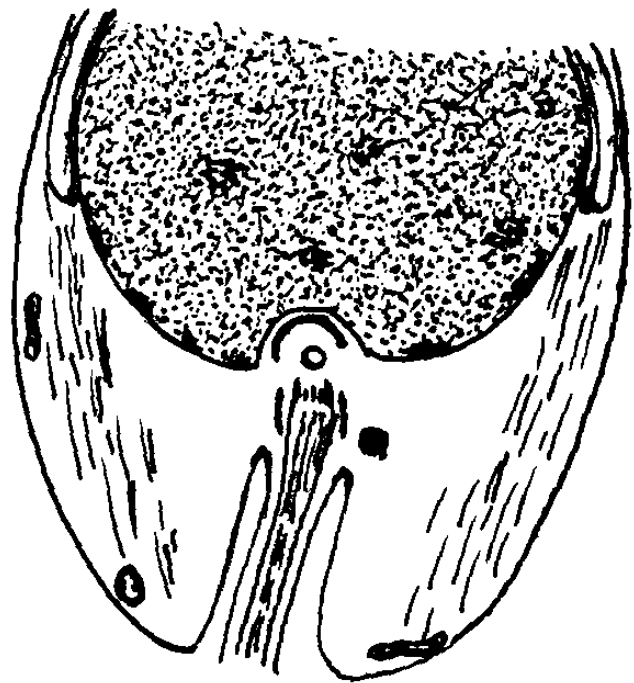


Figura No. 22

hidratos y enzimas hidrolíticas (5). El acrosoma presenta una subestructura ordenada y característica, al parecer debido a la distribución específica por regiones, de las enzimas que contiene, en arreglos paracrystalinos (77).

Aunque se encuentra presente en todos los mamíferos, el acrosoma varía de forma y tamaño según la especie (5).

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

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

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

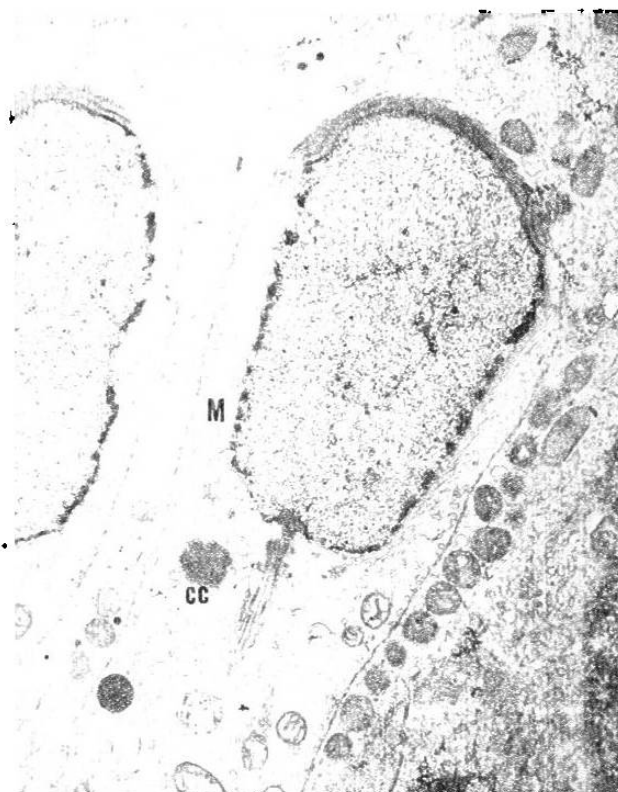


Micrografía electrónica de un esper-
mátide en fase acrosomal. El cito-
plasma del polo anterior ha sido des-
plazado caudalmente, y la membrana -
acrosomal externa está adherida a la
membrana citoplásmica. El núcleo es
más alargado, y se observan masas de
heterocromatina en la periferia.
(15, 000 X)

F i g u r a No. 23

Espermátide en fase acrosomal. La elon-
gación del núcleo es más evidente, y
su extremo anterior es de forma cua-
drada. La cromatina condensada en la
periferia es más abundante; en el extre-
mo caudal del núcleo se observa la fo-
sa de implantación y los elementos pro-
pios del cuello en formación. En el
citoplasma se ven claramente los micro-
túbulos del manchete de trayecto recto.
Se observan también el cuerpo cromatoi-
de, una porción del canal flagelar y
del flagelo.

(6750 X)



F i g u r a No. 24

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

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

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

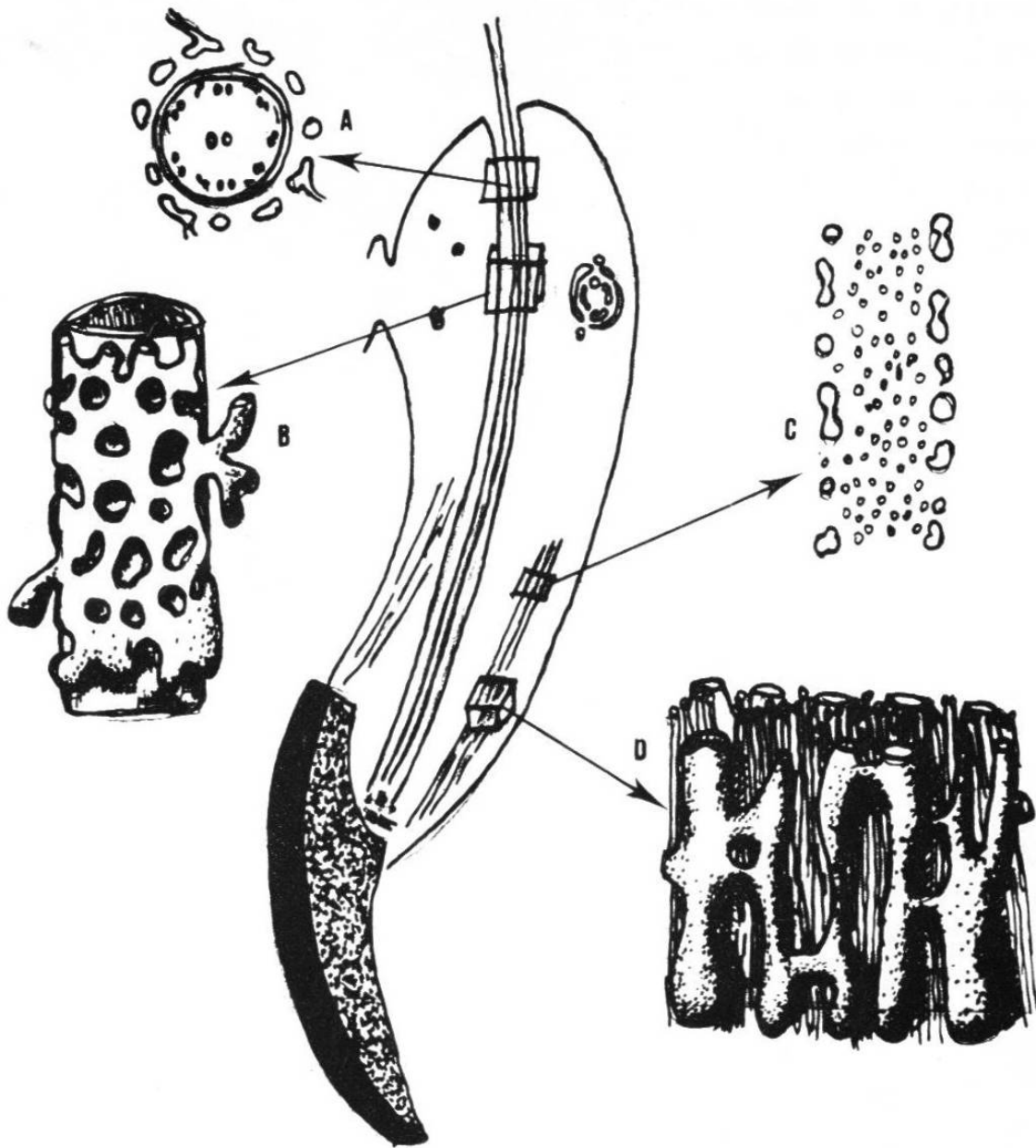


Fig. 25 Representación esquemática de un espermátide del estadio 14 mostrando la configuración del Retículo Endoplásmico Rugoso, (Clermont 1978). En A y B se muestra la conformación del Retículo Endoplásmico a nivel de la vaina caudal. En C y D se ilustra la configuración a nivel del flagelo, (descripción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



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

(39, 000 X)

Figura No. 26

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

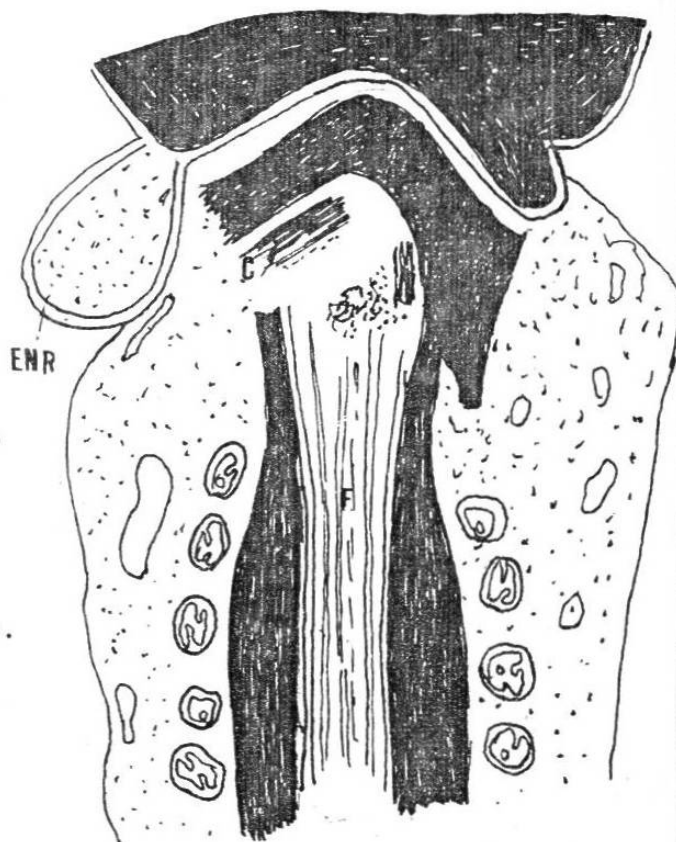


Figura No. 27

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

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

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

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

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



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

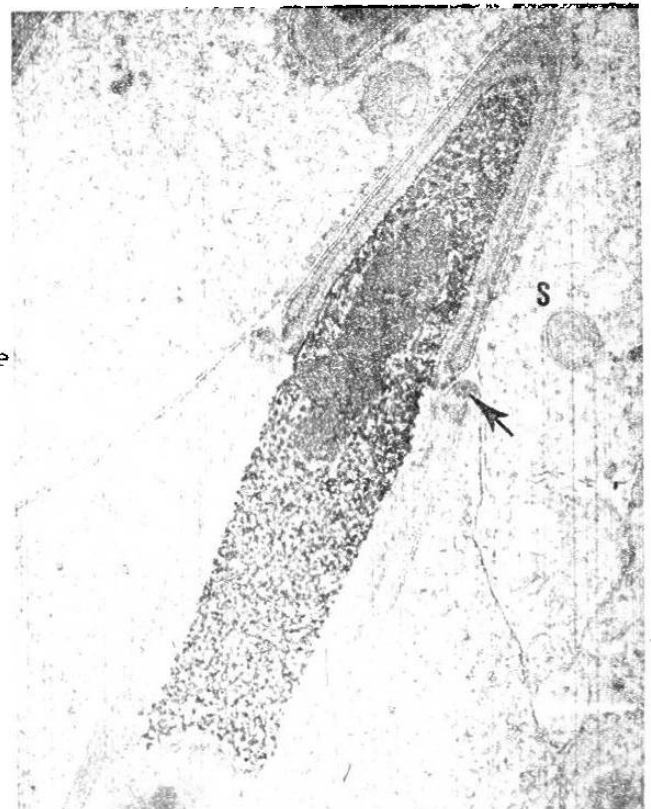
(25, 000 X)

Figura No. 28

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

(25, 600 X)

Figura No. 29





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

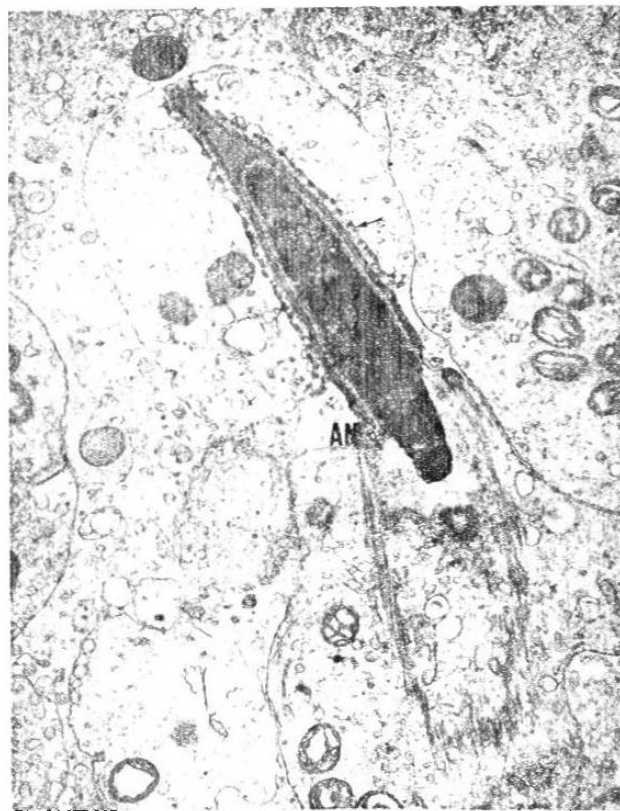
(15, 000 X)

Figura No. 30

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

(30, 000 X)

Figura No. 31





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

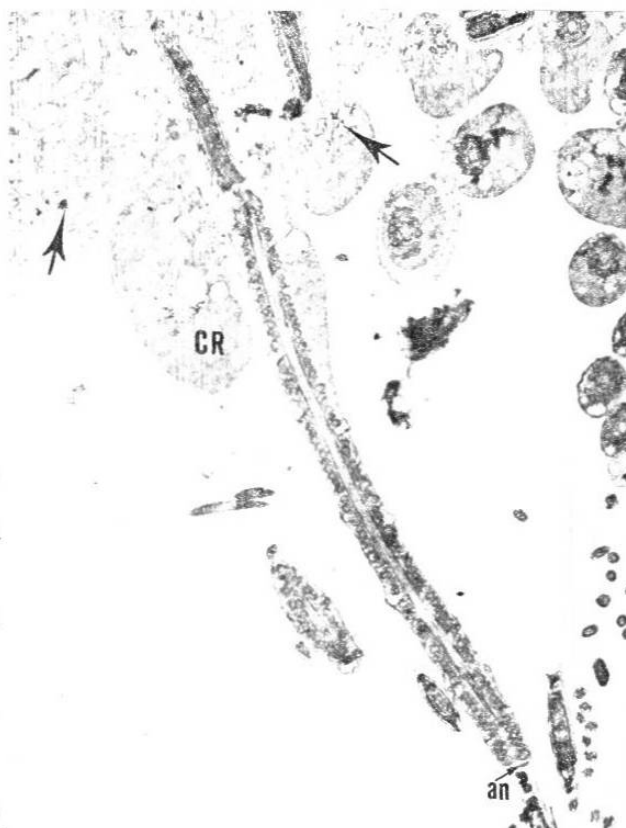
(7, 000 X)

F i g u r a No. 32

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

(3, 600 X)

F i g u r a No. 33



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

f) Síntesis de Macromoléculas Durante la Espermatogénesis.

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

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

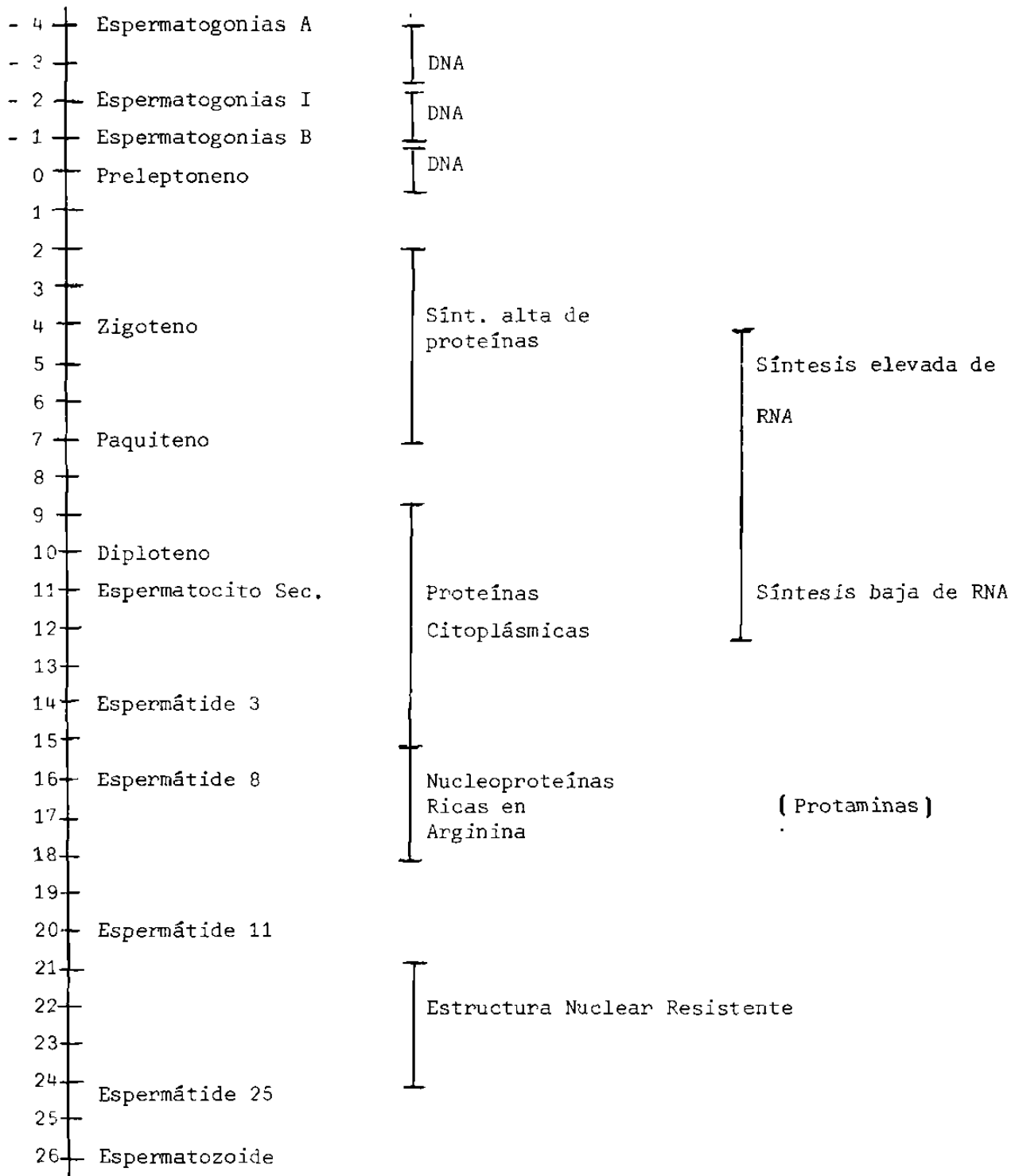
Igualmente ha sido determinado por Monesi (1962), el tiempo de duración del período de síntesis de DNA en las células en que sucede: En espermatogonias A_1 a A_4 , que tienen un promedio de vida y de duración de la etapa presintética muy semejante (de 27 a 30 hrs. y 10.5 hrs. respectivamente), el período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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

Síntesis de Proteínas Nucleares. Cambios Cromatínicos en Espermiogénesis.-

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

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

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

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

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

a).- Alteraciones en Espermatozoides.

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

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

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

Agentes de conocida acción mutagénica, teratogénica y carcinogénica, pro

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

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

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

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

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

Fig. No. 35

Agentes químicos que producen alteraciones morfológicas en espermatozoides de ratón.

(citados por Wyrobeck 1975).

Actividad Reportada:

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

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

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

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

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

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

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

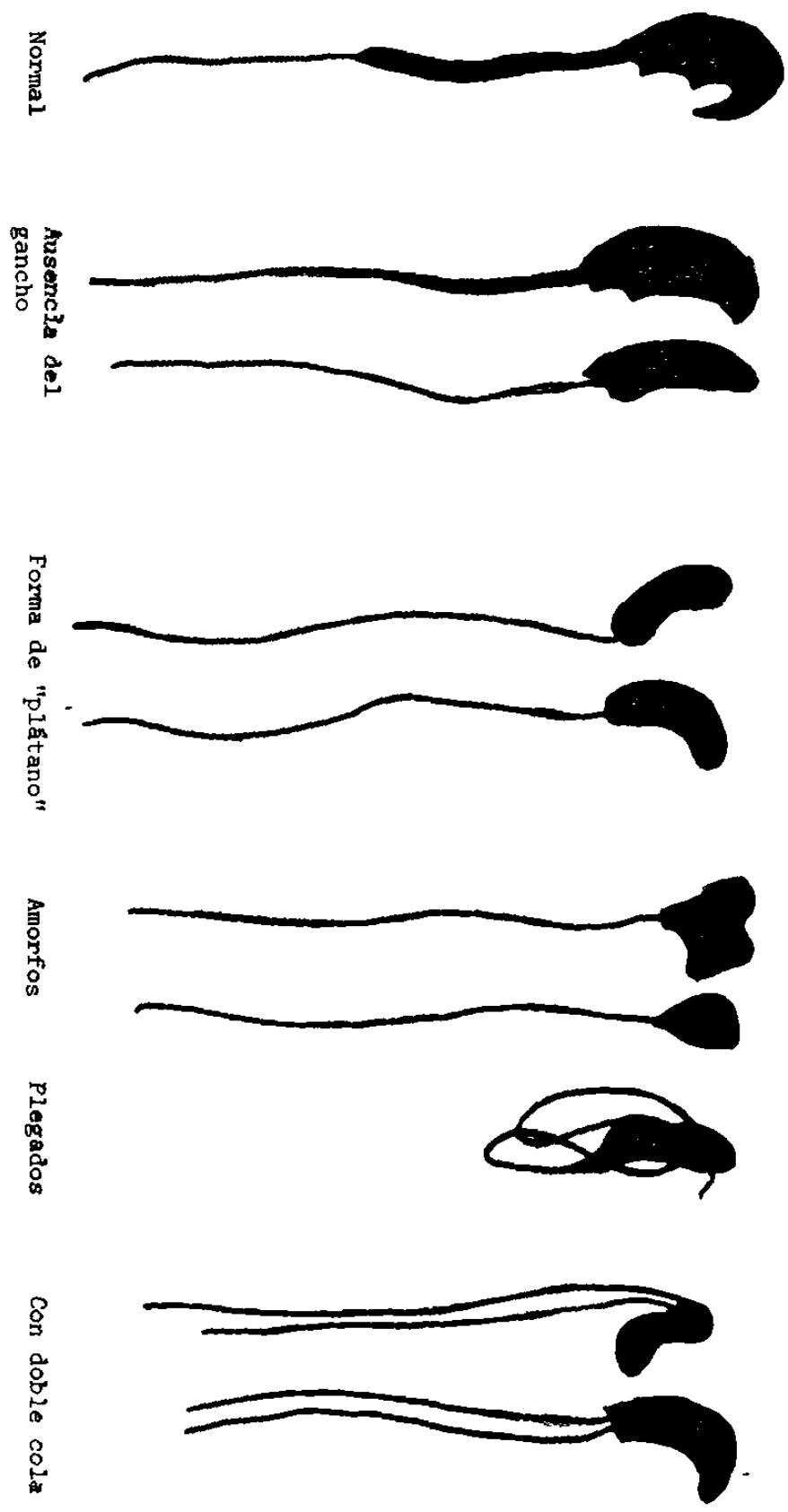
b) Alteraciones en Células Espermatogénicas.

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

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

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

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



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

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

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

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

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

Fig. 37 Efecto de agentes químicos sobre las células espermatogénicas en roedores, reportada en la literatura por varios autores. (1,9,26,27,31,53,54,57,63,71,72,74,75,79,87,88,97 y 113)

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

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

(continuación Fig. 37)

| | | | |
|----------|---------|---------|---|
| TEM | | | + |
| Thiotepa | + (c-d) | + (c-d) | + |
| Thiram | | | + |

ABREVIATURAS:

| | |
|---------|---|
| EMS | Etilmetanosulfonato |
| ENU | Etilnitrosourea |
| IMS | Isopropilmetanosulfonato |
| METPA | Oxido de tris(2 metil-1 aziridil)-fosfina |
| MMS | Metilmetanosulfonato |
| PMS | Propilmetanosulfonato |
| TEM | Trietillemelamina |
| THIOTPA | Sulfuro de tris(2 metil-1 aziridil)-fosfina |
| THIRAM | Sulfuro de(Bis-dimetil-tioxil-carbamoil) |

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

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

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

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