

III. MATERIAL Y METODOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Metanol absoluto	85%
Formaldehído	10%
Acido acético	5%

durante una hora.

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

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

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

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

Las soluciones empleadas y el método se detallan a continuación:

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

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

METODO:

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

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

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

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

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

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

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

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

IV.- R E S U L T A D O S.

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

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

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

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

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

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

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

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

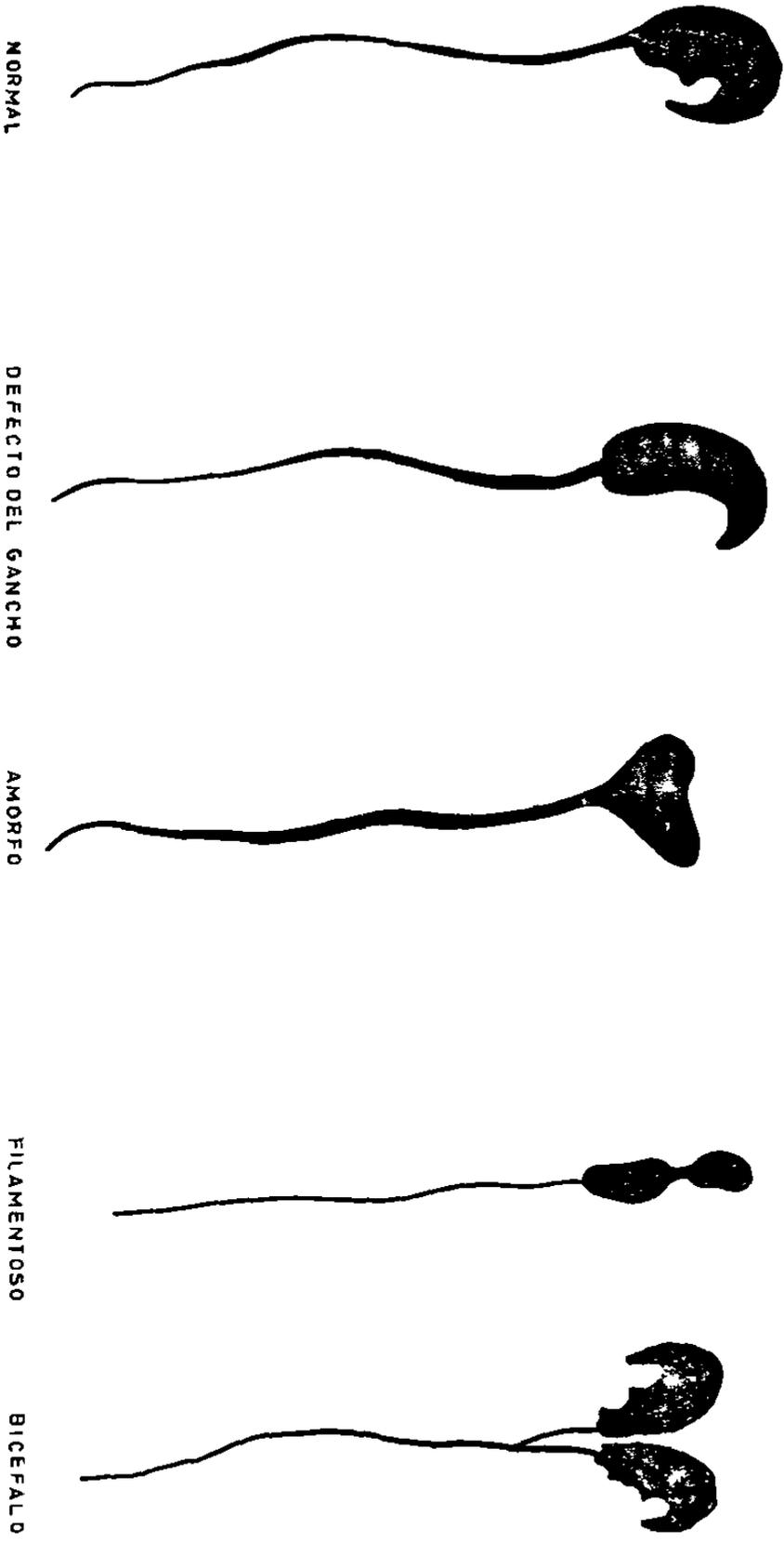


FIG. 39 INDUCCION DE ALTERACIONES EN LA FORMA DE ESPERMATOCITOS DE RATON POR EMS.

	% DE FORMAS NORMALES		% DE FORMAS ANORMALES		DEFECTOS DEL GANCHO O MINIMOS		AMORFOS		FORMAS FILAMENTOSAS		FORMAS CON DOBLE CABEZA O DOBLE COLA		
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	
C ₃			88.4		11.6		2.5		3.25		4.2		1.65
C57 BL-NORMAL			89.35		10.65		4.3		5.65		0		0.7
(C57BL X C ₃ H) F1 NORMAL		98.35		1.65		0.7		0.85		0			.1
(C57 BL X C ₃ H) F1 I	96.85	95.71	3.15	4.29	.5	1	1	1.04	1.6	2.87	0.05	.09	
(C57 BL X C ₃ H) F1 II	87.65	85.34	12.35	14.66	2.2	2.5	3.25	4.2	4.75	5.46	2.15	2.5	
(C57 BL X C ₃ H) F1 III	95.35	92.08	4.65	7.92	1.65	2.76	1.7	2.05	1.25	2.35	0.05	0.76	
(C57 BL X C ₃ H) F1 CONTROL	99	98.2	1	1.8	0.25	0.6	0.45	0.9	0	0	.3	0.3	

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

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

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

OBSERVACIONES GENERALES.-

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

Fig. 40

Determinación estadística del grado de confiabilidad de los resultados.

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

t = cte. = 1.96 X 2

P = % de formas normales

Q = % de formas anormales

L = % de significación

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

De nuestros datos:

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

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

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

Fig. 41

Porcentaje de túbulos alterados por el EMS

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

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

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

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

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

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

PORCENTAJE DE TUBULOS LESIONADOS.

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

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

ALTERACIONES EN ESPERMATOGONIAS.

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

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

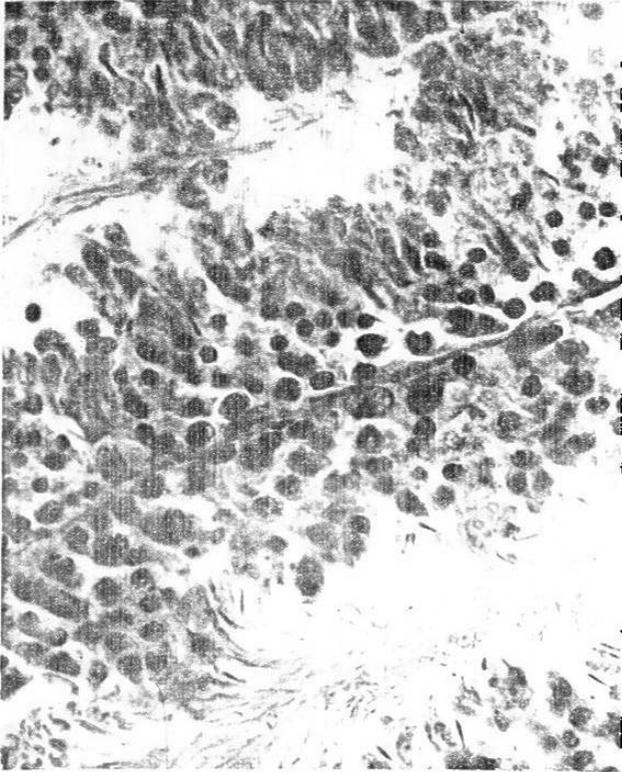
b) Mitosis.- Salvo en las etapas IX a XII, se vieron pocas espermatogonias en división. Sólo ocasionalmente se vieron células de éste tipo en degeneración, y específicamente en túbulos con daño leve.

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

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

CAMBIOS EN ESPERMATOCITOS.

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

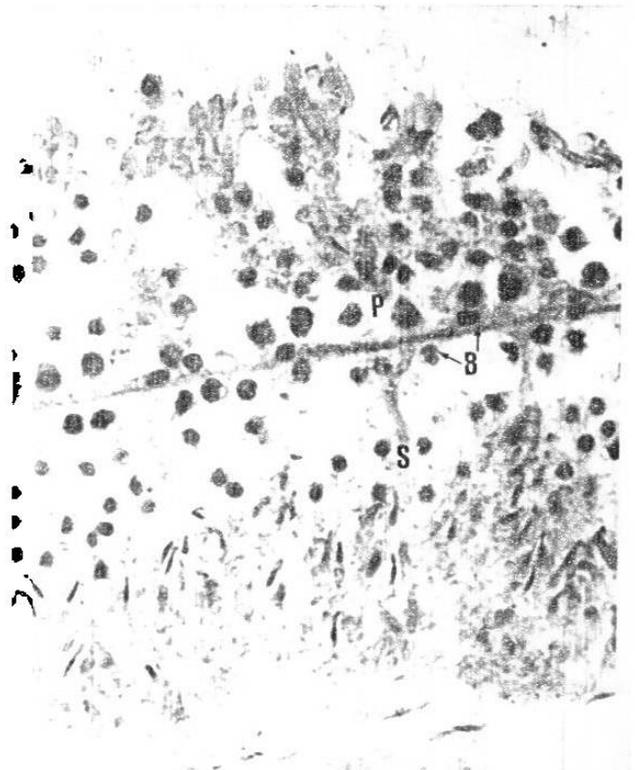


Túbulos seminíferos normales del grupo control. El túbulo superior muestra una asociación celular correspondiente a la etapa III del ciclo del epitelio seminífero. La pared del túbulo muestra espermatogonias B, células de Sertoli, espermatocitos paquí-ténicos, espermatídes redondos y espermatídes 13.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

F i g u r a No. 42

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

F i g u r a No. 43



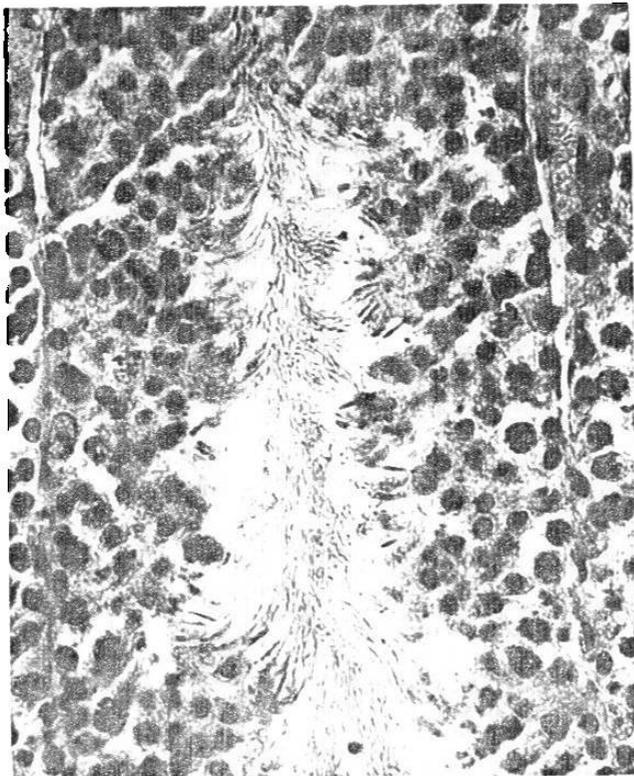
permatocitos paquiténicos fueron los siguientes:

- a) Número.- Se observó una disminución de éstas células en todas las etapas del ciclo del epitelio seminífero, aún en túbulos con daño leve, donde faltaban espermatoцитos en pequeños segmentos, dejando huecos en los sitios correspondientes. Las áreas afectadas por éste cambio fueron mayores en túbulos de daño moderado, y en los de lesión severa, en los que llegaron a desaparecer por completo en grandes áreas.
- b) Localización.- En túbulos con lesión leve no se observaron cambios en el acomodo normal de las células, que se presentaron acompañando a los defectos en el número de las células, encontrándose espermatoцитos aún en la luz del túbulo seminífero.
- c) Morfología.- Se presentaron cambios nucleares y citoplasmáticos que indican lesión celular severa que culminó con muerte y desaparición de muchos espermatoцитos. Estos cambios se observaron aún en túbulos con daño leve, y en todas las etapas del ciclo del epitelio seminífero, y no se observaron diferencias a intervalos distintos de exposición al EMS.

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

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

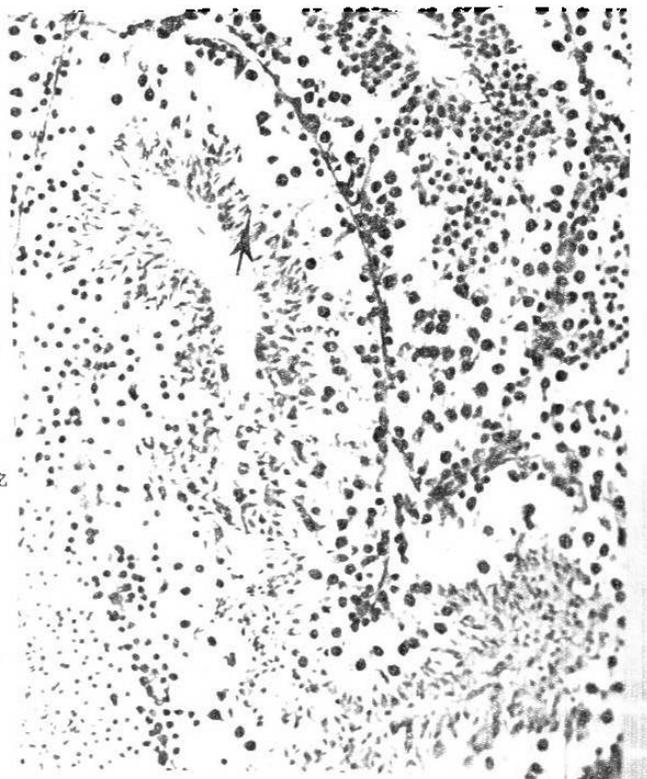
Con microscopía electrónica se vieron espermatoцитos con francos signos de muerte celular: desaparición de organelos y membranas; otros espermatoцитos no mostraron ningún cambio ultraestructural. En el núcleo, coincidiendo con éstos cambios citoplásmicos, se observó cariólisis; apareciendo con microscopía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



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

F i g u r a No. 44

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



F i g u r a No. 45

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

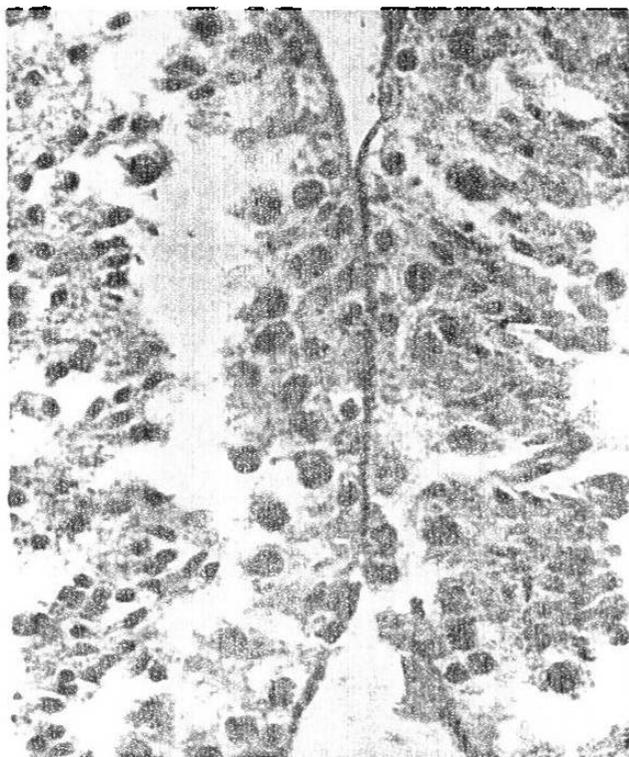
CAMBIOS ESPERMATIDES.

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

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

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

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

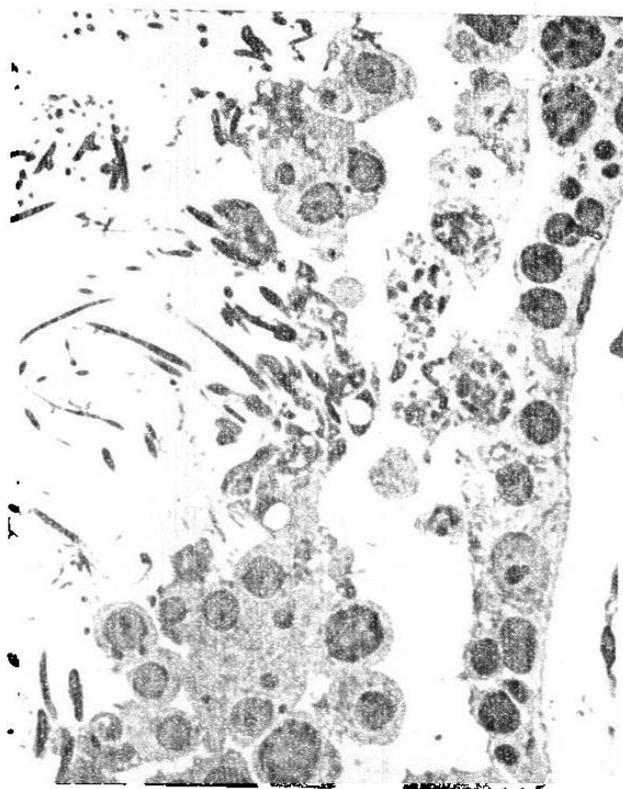


Microfotografía en la que se observan tubulos seminíferos de las etapas IX y X del ciclo del epitelio seminífero. A este aumento resulta evidente la disolución y disgregación del citoplasma de los espermátides primarios y la resistencia de los espermátides avanzados al efecto tóxico del EMS. Objetivo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

Figura No. 46

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

Figura No. 47



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

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

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

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

CAMBIOS EN LA CELULA DE SERTOLI

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

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

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

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

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

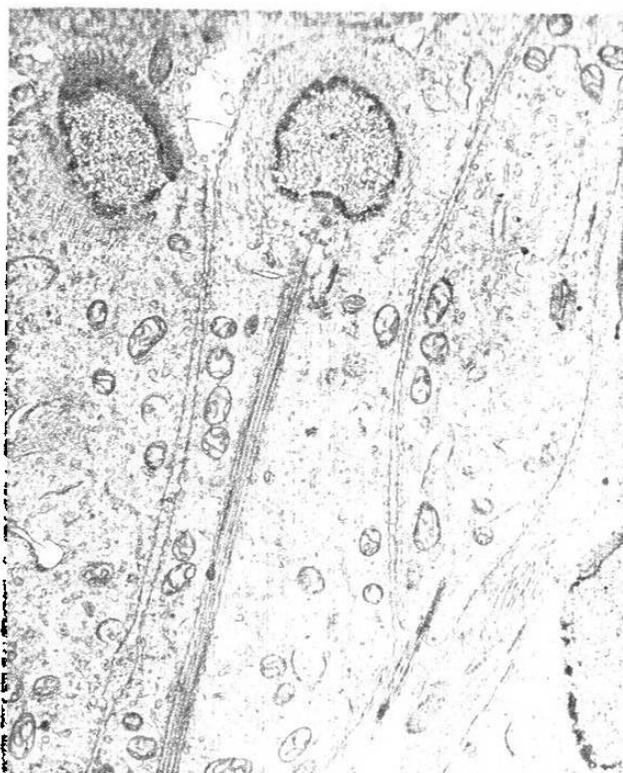
Se hizo un análisis con microscopía electrónica del tejido testicular - de los ratones tratados con EMS, para indagar sobre los cambios morfológicos conducentes a la aparición de espermatozoides de forma anormal.

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

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

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

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



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

F i g u r a No.48

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

F i g u r a No. 49



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

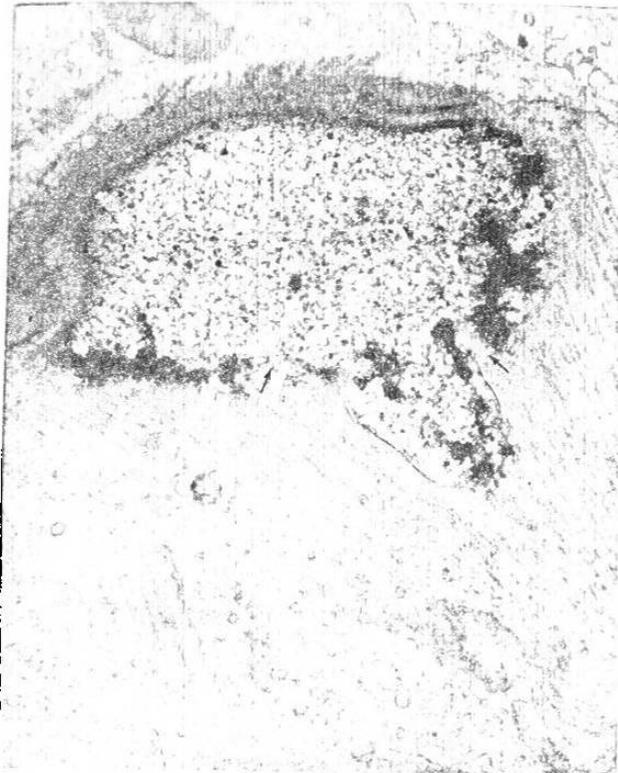
Espermátides de los estadios 9 y 10: Fueron identificados por el tipo de asociación del que forman parte. En muchos de ellos el defecto principal correspondió al aplanamiento del polo anterior del núcleo y a la falta de -- elongación nuclear, que normalmente se presenta en ésta etapa (Figs. 48,49 y 50).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

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

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

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

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



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

F i g u r a No. 50

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



F i g u r a No. 51

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

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

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

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

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



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

(26, 000 X)

Figura No. 52

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

Figura N. 53

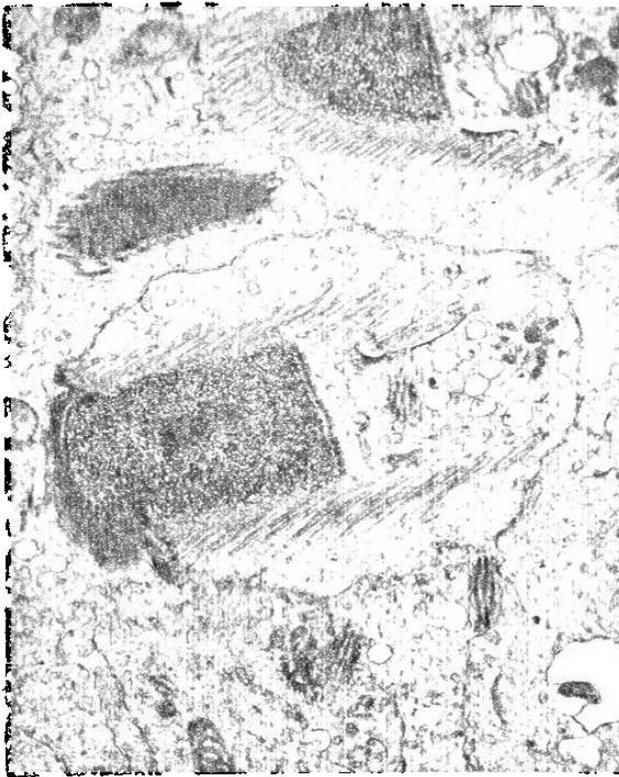


aunque la condensación de la cromatina fué de aspecto normal en algunos y en otros fué defectuosa. Estas células mostraban también aplanamiento del extremo anterior (rostrum) de la cabeza, como se observa en el espermátide de la figura 54. El acrosoma permaneció cubriendo sólo el extremo anterior aplanado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

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

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

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



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

(13, 500 X)

Figura No. 54

Espermátide anormal del estadio 12. El núcleo presenta una profunda escotadura, en cuyo extremo caudal se identifica la fosa de implantación, la posición anormal. El citoplasma es abundante.

(22, 800 X)

Figura No. 55





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

Figura No. 56

Espermátide anormal del estadio 12.
El extremo anterior se señala con una flecha, donde se observa que el acrosoma y el núcleo están aplastados. Se aprecia de nuevo el material filamentosó descrito anteriormente en relación con el acrosoma. Una proyección lateral que parece corresponder únicamente al material acrosomal es sumamente anormal.
(23, 000 X)



Figura No. 57



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

Figura No. 58

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

Figura No. 59



de la célula de Sertoli.

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

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

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



Espermátides del estadio 12 ó 13.

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

(10, 000 X)

Figura No. 60

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

(6, 000 X)

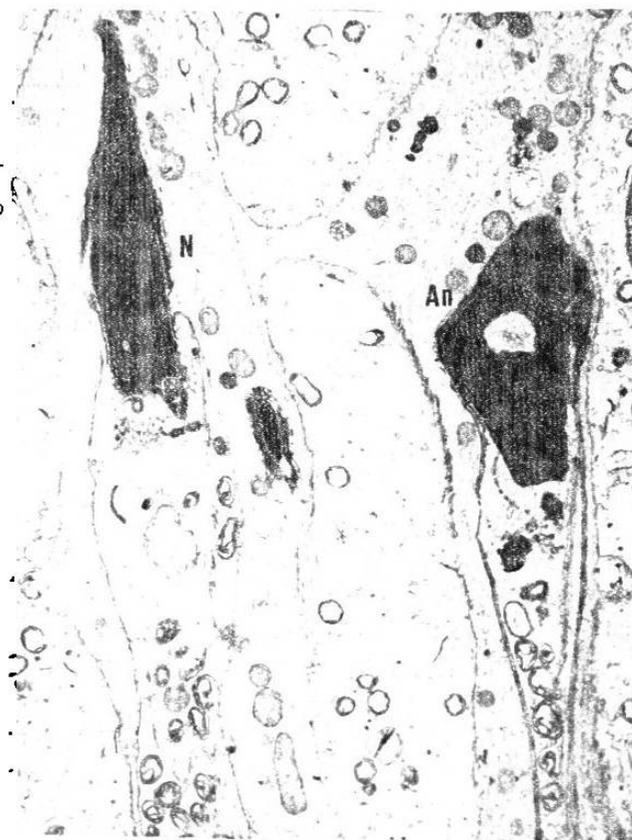


Figura No. 61

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

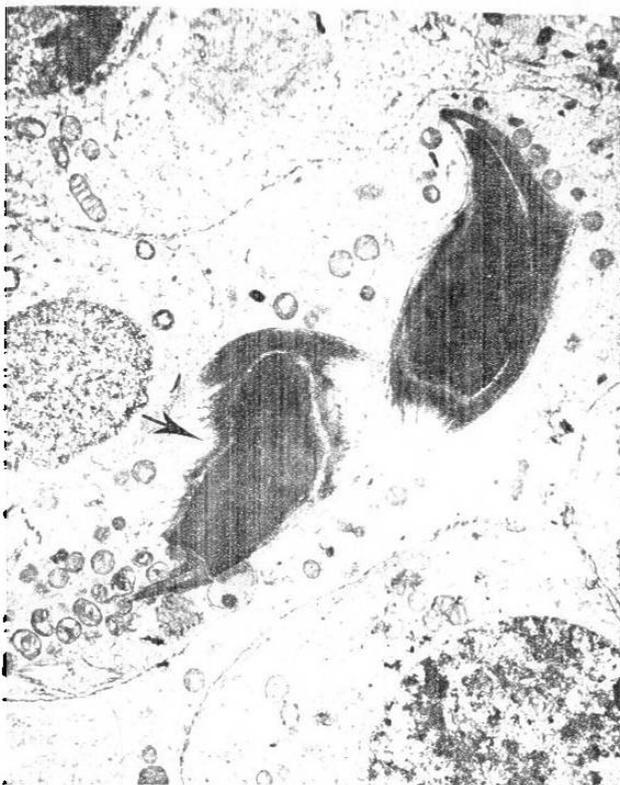
En otros espermátides los defectos fueron menos marcados, localizándose sobre todo a nivel del acrosoma, el cual presentó proyecciones anormales que casi siempre acompañaron a modificaciones leves en la forma del núcleo; alteraciones de éste tipo pueden observarse en la figura 62, en la que uno de los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

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

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

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

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



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

F i g u r a No. 62

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



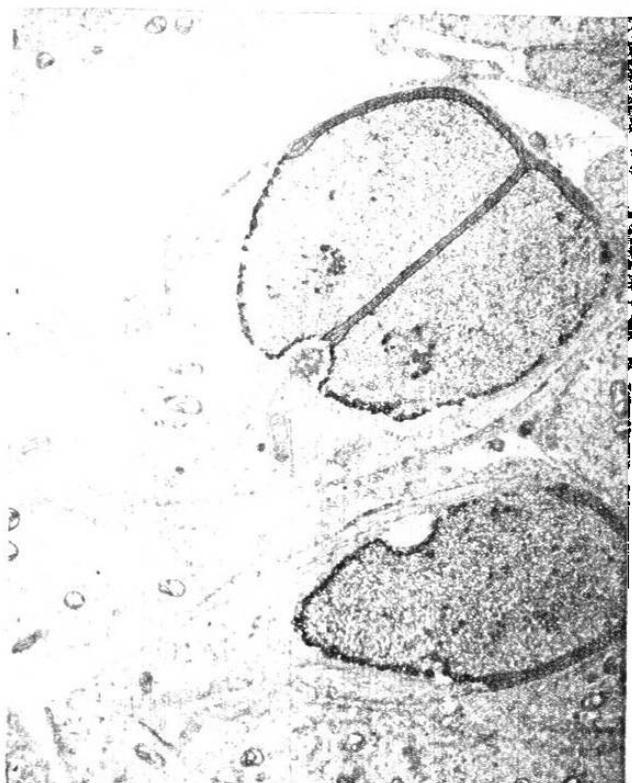
F i g u r a No. 63



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

F i g u r a No. 64

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



F i g u r a No 65

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

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

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



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

Figura No. 66

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

Figura No. 67

