

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

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

El efecto del EMS, sobre la espermatogénesis, fué fácilmente detectado por las elevaciones producidas en el número de espermatozoides anormales. A éste respecto las observaciones hechas en éste experimento concuerdan con lo reportado por Wyrobeck (1975); aunque las elevaciones en el porcentaje de formas anormales fueron en nuestro estudio menores (12%) que las reportadas por Wyrobeck, a dosis y tiempo de exposición comparable (más del 20%); la elevación máxima se produjo a las cuatro semanas. Por otra parte, los tipos de alteraciones morfológicas vistas correspondieron en general a los descritos por otros autores (8,9) pero la forma filamentosa descrita en éste estudio no había sido reportada.

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

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

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

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

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

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

lulas (60).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

consecuencia de alteraciones producidas en la célula de Sertoli.

VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES.

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

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

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

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

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

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

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

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

Las formas de espermatozoides con defectos mínimos, observados con mi

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

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

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

VII. PERSPECTIVAS.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- 1.- Adler, I.D. (1974). Comparative cytogenetic study after treatment of mouse spermatogonia with Mitomycin C.
Mut. Res. 23:369-379
- 2.- Ames, B.N.; W.E. Durston; E. Yamasaki y F.D. Lee (1973). Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70:2281-2285
- 3.- Ashby, J. y I.F.A. Purchase (1977). The selection of apropiatte chemical class controls for use with short-term tests for potential carcinogenicity.
Ann. Occup. Hyg. 20:297-301
- 4.- Bellvé, A.R.; J.C. Cavicchia; C.F. Milette, D.A. O'Brien; Y.M. Bhatnagar y M. Dym. (1977). Spermatogenic Cells of the prepuberal mouse. Isolation.
Int. J. of Cell Biol. 74:68-85
- 5.- Bloom, W. y D. Fawcett (1978). Tratado de Histología. 7a. Ed. Ed. Labor.
- 6.- Bratmanska, J. y Y. Clermont (1983). Renewal of type A Spermatogonia in adult rats.
Cell. Tissue Kinet. 16:135-143
- 7.- Bruce, W.R. y M.L.Meistrich (1972). Spermatogenesis in the mouse. Proc. Iest. Internat. Conf. on cell differentiation. Copenhagen Munksgaard: 295-299
- 8.- Bruce, W.R.; R. Furrer y A.J. Wyrobeck (1974). Abnormalities in the shape of murine sperm after acute testicular irradiation.
Mut. Res. 385-386
- 9.- Bruce, W.R. y Heddle (1979). The mutagenic activity of 61 agents as determined by the micronucleus, Salmonella and sperm abnormality -- assays.
Can. J. Genet. Cytol. 21:319-333
- 10.- Brusick, D.J. (1978). Alterations of germ cells leading to mutagenesis and their detection.
Envirom. Health Persp. 24:105-112
- 11.- Cassidy, S.L.; K.M. Dix; T. Jenkins (1983). Evaluation of a testicular sperm head counting technique using rats exposed to dimethoxyethyl phthalate (DMEP), glycerol Alfa-monochlorohydrin (GMCH), Epichlorohydrin (ECH), Formaldehyde (CFA), or methyl methanesulphonate (MMS).
Arch. Toxicol. 53:71-78

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

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

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

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

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

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

