

ESTUDIO DEL EFECTO DEL OZONO INTRATESTICULAR SOBRE LA ESPERMATOGÉNESIS

S.I. Fernández, G. Quinzan, S. Hernández, H. Gómez, P. Acosta

CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

RESUMEN. Se empleó la administración intratesticular, aunque constituye una situación extrema que no se reproduce en la práctica médica, con el objetivo de conocer el efecto directo del O_3 , sobre un proceso de morfodiferenciación *in vivo*, que además tomará en cuenta la expresión de un daño genotóxico. Se administró por vía intratesticular en volúmenes de 1,0; 0,7 y 0,5 mL de ozono en oxígeno a una concentración de 70 $\mu\text{g/mL}$ (dosis de 100 a 200 veces mayores a las empleadas por inyección intramuscular). Se recogió cada semana la relación de pesos $P(\text{testículo})/P(\text{corporal})$, no viéndose ésta afectada por ninguno de

los tratamientos. Se detectó disminución del conteo a todas las dosis en la segunda semana, lo que desaparece a las dosis menores en las semanas subsiguientes. En cuanto a la morfología sólo hay expresión a las dosis mayores en las primeras 2 semanas post-tratamiento. El ensayo de síntesis no programada de ADN no arrojó resultados positivos.

INTRODUCCION

Aunque el ozono intratesticular constituye una situación extrema, que no se reproduce en la práctica médica, se consideró interesante conocer el efecto directo del ozono sobre un proceso de morfodiferenciación celular *in vivo*, que además tomara en cuenta la posibilidad de expresión de un daño genotóxico.

MATERIALES Y METODOS

Los animales son anestesiados ligeramente para llevar a cabo la inyección intratesticular. Se utilizaron volúmenes de 1,0; 0,7 y 0,5 mL de gas (70 µg/mL de ozono en oxígeno) los cuales representan dosis de hasta 100 veces mayores que la terapéutica en humanos por vía intramuscular. Se realizaron 2 aplicaciones separadas 24 h, una en cada testículo.

El oxígeno fue empleado como control, utilizándose además controles no tratados, por las implicaciones del trauma de la aplicación.

Los grupos originales de animales contaban con 20 ratones, de manera que pudieran extraerse 4 semanalmente, e ir muestreando los diferentes estadios de la espermatogénesis a través del análisis de la morfología de la cabeza del espermatozoide y el conteo de éstos, además de recoger el peso de los testículos. En el caso de los animales que serían empleados en la detección de síntesis no programada de ADN, ambos testículos fueron inyectados el mismo día pero sólo se emplearon dosis de 1,0 y 0,5 mL, además de los controles con O₂. Con este sistema de ensayo también se empleó un control positivo tratado con Nitomicina C (8 mg/kg p.c.) por vía intraperitoneal, acompañado de los correspondientes controles que recibieron por la misma vía suero fisiológico.

Para el análisis de la morfología del espermatozoide se obtuvo la muestra por dislocación cervical de los animales, procesamiento de los epidídimos y montaje de dos láminas por animal, analizándose 5 000 espermatozoides por grupo de dosis, y clasificándose según el criterio de Wyrobek y Bruce.¹

El resto de la suspensión celular sirvió para realizar el conteo de los espermatozoides por un contador electrónico de células.

En el caso de la síntesis no programada de ADN, los animales fueron tratados con timidina tritiada (³H-TdR/testículo) por inyección intratesticular, esperándose 16 d para el sacrificio de ellos. Se extrajeron los epidídimos y se procesaron,² para ser leídas las muestras en un contador de centelleo líquido.

Los valores del número de espermatozoides afectados se transformaron según x_1 y_1 para realizar posteriormente el análisis de varianza. Al conteo también se le realizó un análisis de varianza.

RESULTADOS Y DISCUSION

Recoger la relación peso testículo/peso corporal podría dar un índice de la afectación del órgano entre otras cosas por la intervención traumática del método. Como se ve en la Tabla 1, este índice ponderal no se afecta, ni entre los grupos de dosis para un estadio de maduración, ni tampoco entre los diversos estadios. Sin embargo, cuando se analiza la morfología de estos espermatozoides, se detecta en la primera semana (espermatozoides en epidídimo) un aumento de cabezas (%) anómalas, a predominio de amorfos. Si bien se ha dicho que los traumas testiculares son capaces de afectar la espermatogénesis, los resultados con el oxígeno o con la dosis menor de ozono no son compatibles con esta posibilidad, siendo la afectación más notable a la dosis máxima. En la segunda semana (espermatozoide en testículo y espermátida tardía) aún se mantiene este efecto a la dosis mayor, pero es menos marcado que sobre el espermatozoide en epidídimo.

El sacrificio de los animales en tercera semana después del tratamiento, en el cual se encontró a los gametos masculinos en estadios de espermátidas tempranas no afectó la morfología del espermatozoide, no así el conteo de los espermatozoides, el que se encuentra disminuido en los tratados con ozono (las 3 dosis) con respecto a los animales inyectados con oxígeno. En la cuarta semana, sobre el espermatozocito secundario (recién concluida la meiosis) tratado con ozono intratesticular, no se muestra efecto en lo absoluto sobre la morfología, pero los conteos a las dosis de 1,0 y 0,7 mL fueron inferiores de forma significativa. En la quinta semana no se detectó ningún efecto, ni morfológico ni de sobrevivencia.

El proceso de la espermatogénesis en el ratón toma aproximadamente 14,4 d, desde que se completa la meiosis hasta la producción del espermatozoide en testículo, que posteriormente progresa a través del epidídimo. En el último momento que pudo esperarse un cambio genético sería 6 días antes de completarse la espermatogénesis, cuando cesa la síntesis de ARN.³ Los cambios morfológicos inducidos por el ozono fueron detectables después de este evento, o sea, cuando la célula germinal se encontraba en estadio de espermátida tardía, espermatozoide en testículo y en epidídimo. Los efectos observados en la primera semana del muestreo, parecen por tanto corresponderse a una interferencia con fases sensibles del proceso morfodiferenciativo, que forma el espermatozoide. Estos efectos a nivel de membrana han sido descritos también para los glóbulos rojos tratados con este gas. ●

El ensayo de síntesis no programada de ADN no arrojó resultados positivos, como se observa en la Tabla II.

Es posible que tras este período de tratamiento el efecto expresado esté enmascarado por la disminución en la sobrevivencia.

TABLA I
Efecto del ozono intratesticular

Dosis (mL)	Pt/Pc ^a	Conteo ^b	Normal e	Amorfoc	Banana	SGC	Anormal
			1				
03 1,0	0,005 2	d	72,275 [•]	17,525 [•]	0,925 [•]	6,20 [•]	24,75 [•]
03 0,7	0,006 1		84,666 [•]	9,333 [•]	0,300	5,7 [•]	15,33 [•]
03 0,5	0,005 4		93,03	4,733	0,033	2,2	6,96
02 1,0	0,005 6		91,466	5,7	0,566	3,6	9,66
			2				
03 1,0	0,005 6	0,589	86,85 [•]	10,475 [•]	0,150 [•]	2,55 [•]	13,51 [•]
03 0,7	0,006 1	0,528	90,40 [•]	7,675 [•]	0,325	1,6 [•]	9,6 [•]
03 0,5	0,006 4	0,659	96,30	2,775	0,075	0,6	3,45
02 1,0	0,005 8	0,598	96,90	2,525	0,125 [•]	0,45	3.
			3				
02 1,0	0,005 0	0,87 [•]	93,025	5,45	0,100 [•]	1,425	6,97
03 0,7	0,004 9	0,688 [•]	93,55	5,45	0,25	0,75	6,45
02 0,5	0,005 3	0,803 [•]	95,25	4,325	0,025	0,40	4,75
02 1,0	0,006 2	1,355	95,375	3,65	0,15 [•]	0,65	4,45
			4				
02 1,0	0,006 0	1,033 [•]	97,0	2,95	0,00	0,20	3,15
03 0,7	0,005 3	1,257 [•]	96,3	3,025	0,00	0,675	3,7
03 0,5	0,006 0	1,651	95,875	3,575	0,25	0,30	4,125
02 1,0	0,005 6	1,62	95,975	3,55	0,00	0,475	4,025
			5				
03 1,0	0,005 1	1,711	97,133	1,833	0,766	0,266	2,866
03 0,7	0,007 0	1,525	95,825	2,85	0,325	1,0	4,175
03 0,5	0,005 6	1,62	95,625	3,00	0,625	0,75	4,375
03 1,0	0,006 6	1,322	93,025	5,75	0,875	0,35	6,975
Control	0,005 8	1,567	94,57	5,00	0,130 [•]	0,400	5,43

a relación de pesos (t = testículos / e = corporal)

b 10⁶ /mL

e %

d no se pudo realizar el conteo

*p < 0,05

Estadios muestreados: 1: Espermatozoides⁵ sg: sin gancho
2: Espermátida tardía
3: Espermátida temprana
4: Espermatozocito secundario
5: Espermatozocito primario

TABLA II
Efecto del ozono intratesticular (SNP)

Dosis (mL)	CPM ^a
03 1,0	303 (6) ^b
03 0,5	234 (4)
02 1,0	200 (5)
Mitomicin e	675 (3)
NaCl (0,9 %)	175 (4)

a se expresan los valores en cpm por no contar con la curva de canales para H³

b numero de animales por grupo experimental

La segunda parte de la Tabla son los resultados de los controles positivos y negativos por via intraperitoneal

SNP s\ntesis no programada de ADN

BIBLIOGRAFIA

1. Wyrobek A. J. and Bruce W. R. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 72, 4 425, 1975.
2. Sega G. A. and Sotomayor R. E. Chemical Mutagens, VII, ed. de Serres and Hollander, 421-446, 1982.
3. Cairnle A. B. and Leach K. E. Can. J. Genet. Cytol., 22, 93, 1380.
4. Dorsey A. P., /lorgan D. L. and /lenzel D. B. Third Int. Congress on Toxicology, San Diego, California, 1983.
5. Oakberg K. F. Mutat. Research., 50, 327, 1978.

Revista CENIC Ciencias Biológicas, 20, 1-2-3, 1988