

VARIABILIDAD GENETICA E INFLUENCIAS AMBIENTALES DETERMINANTES EN LA MORFOLOGIA DEL ESPERMATOZOIDE

A. Rendón, D. Walker* y S.I. Fernández*

*Instituto de Medicina del Trabajo y * Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba*

Recibido: 2 de abril de 1988

ABSTRACT. The frequency and proportions of sperm abnormalities are features for all rodent strains. Both parameter can be modified by exogenous factors such as diet, temperature, xenobiotics and others. Four isogenic mouse strains: (DBA/2j, Balb/c, C57BL/6j, C3H/Sn) and its hybrids were analyzed, as well as a non isogenic strain so called "Swiss". Other four strain: another animal house (CBA/j, C3H/He, A/j, AKR), were also studied. In both groups the frequency and proportions of sperm morphology abnormalities were calculated for each strain. The usefulness of some strains in mutagenicity testing is discussed.

RESUMEN. La frecuencia de anomalías del espermatozoide así como la proporción de éstas, es característico para cada cepa, independientemente que pueda ser modificada por factores exógenos, como son la alimentación, la temperatura, compuestos ambientales y otros. En este trabajo se ha tratado de caracterizar ambos parámetros en las condiciones ambientales de trabajo estudiando 4 cepas isogénicas: (DBA/2j, Balb/c, C57BL/6j, C3H/Sn) y los híbridos construidos de sus combinaciones, además la línea no isogénica: albina conocida como "Suiza" y también otras 4 cepas isogénicas: (CBA/j, C3H/He, A/j, AKR), discutiéndose así la conveniencia del empleo de algunas de ellas en los estudios de mutagenicidad.

INTRODUCCION

Los espermatozoides son células de gran importancia en la toxicología reproductiva, específicamente en los ensayos de actividad genotóxica, por ser posibles indicadores de mutaciones genéticas heredables, además de reflejar otros tipos de efectos sobre la espermatogénesis y la posible infertilidad resultante.

Por dichas razones, se ha propuesto entre las pruebas de mutagenicidad a corto plazo, una conocida como el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide, cuya finalidad es observar la frecuencia espontánea de anomalías del espermatozoide.¹ Dicha prueba posee valor intrínseco en el ensayo de riesgo de las sustancias, ya que el sistema refleja efectos de interferencia con el proceso de diferenciación *in vitro* de las células germinales.² Todo esto hace que la prueba haya sido utilizada generalmente en roedores para la evaluación toxicológica de la actividad de algunos agentes químicos.

Por otra parte, son conocidas las razones que apuntan al uso de líneas isogénicas o no isogénicas en las tareas de investigación. Cada una tiene ventajas y desventajas ampliamente reconocidas en la literatura. Las primeras muestran menor variabilidad biológica en relación a la regularidad de su genotipo, característica de la que carecen los segundos, pero a su vez los isogénicos resultan muy sensibles a los factores ambientales. Una solución entre los dos extremos, son los híbridos obtenidos a partir de las líneas isogénicas, que por regla general, conservan la estrecha variabilidad y aumentan la resistencia del fenotipo.

Las razones apuntadas determinaron que los autores se propusieran como objetivo estudiar en diferentes líneas e híbridos de ratones la frecuencia espontánea de anomalías del espermatozoide así como determinar el predominio de cada una de las formas anómalas y conocer además, cuáles podrían ser útiles en general, para el trabajo evaluativo en Genitotoxicología en las condiciones ambientales de laboratorio.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron 4 líneas de ratones isogénicos: Balb/c, C3H/Sn, C57BL/6j, DBA/2j y los híbridos resultado de

las diferentes combinaciones de éstos 4 primeros, además de la línea no isogénica albina conocida como "Suiza". También se estudiaron las líneas isogénicas CBA/j, C3H/He, A/j y AKR.

Los animales tenían 6 semanas de nacidos y entre 25 y 30 g de peso corporal. Todo el tiempo mantuvieron libre acceso al agua y a la dieta consistente en ratonina.

El método de trabajo seguido consistió en sacrificar al animal por dislocación cervical, extraerle los epidídimos colocándolos en placas petri, que contenían solución isotónica de NaCl, reducirlos a pequeños fragmentos, cortándolos con tijeras y mezclarlos con pipetas pasteur. A continuación añadir 4 ó 5 gotas de eosina al 1 %, dejar reposar durante 5 min. Colocar una gota de solución sobre una lámina seca y extender con un cubre-objetos.¹

Se prepararon dos láminas por animal, analizándose 5 animales y 5 000 espermatozoides por cada una de las líneas. La observación se realiza a 1 600x. El criterio de clasificación seguido fue el planteado por Wyrobek y Bruce.³

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla I se observa la frecuencia espontánea de las líneas estudiadas encontrándose que la C57BL/6j duplica la frecuencia reportada en la literatura (19,16 y 9,44 % respectivamente),⁴ mientras que la línea Balb/c se mantiene dentro del amplio rango reportado para ésta (35 al 55 % de anomalías).⁵ Las demás líneas mantienen una frecuencia relativamente baja y un rango aceptable a excepción de las líneas CBA, C3H/He y AKR, que mostraron baja frecuencia de anomalías y rango de variación estrecho. El caso más sorprendente lo constituyó la línea C3H/Sn que mostró una alta teratozoospermia (88,9 % de espermatozoides con cabezas anómalas).

Se plantea que diversos factores como las infecciones, las reacciones alérgicas, los cambios en la temperatura corporal y el flujo sanguíneo, pueden modificar los valores espontáneos.⁶ Es posible que las no óptimas y constantes condiciones de mantenimiento para estos animales, tengan efectos negativos sobre la espermatogénesis y hayan sido las líneas C3H/Sn y C57BL/6j las más sensibles a esto.

TABLA I

Rangos y medias del análisis de la morfología del espermatozoide en las líneas no isogénicas, isogénicas e híbridos machos

Hembras	Machos			
	DBA/2j	Balb/c	C57B1/6j	C3H/Sn
DBA/2j	Rango	Rango*	Rango*	Dificultades en la obtención del híbrido
	4,7 a 9,4	2,0 a 3,1	1,0 a 2,8	
	Media 7,18	Media 2,66	Media 2,14	
Balb/c	Rango	Rango	Rango	Rango
	1,0 a 3,2	38,5 a 46,6	3,4 a 13,3	10,9 a 31,1
	Media 2,08	Media 42,82	Media 7,06	Media 22,36
C57B1/6j	Rango	Rango	Rango	Oligospermia
	2,1 a 5,0	3,3 a 4,0	16,7 a 20,7	
	Media 3,44	Media 3,56	Media 19,16	
C3H/Sn	Rango	Rango	Rango	Rango
	4,1 a 43,8	16,0 a 58,7	2,2 a 3,8	85,9 a 91,0
	Media 22,88	Media 40,82	Media 3,36	Media 88,90
CBA	C3H/He	A/j	AKR	"Suizos"
	Rango	Rango	Rango	Rango
	3,1 a 2,1	1,8 a 0,8	15,0 a 10,8	4,6 a 2,0
Media	Media	Media	Media	Media
	2,74	1,30	11,80	3,16
	6,30			

*Híbridos de menor variación biológica y por tanto, más recomendables para los ensayos de genotoxicidad.

Todos los valores están expresados en %

Los resultados sugirieron que se investigara el comportamiento reproductivo histórico de estas líneas en las condiciones de trabajo de laboratorio.

En la Tabla II aparecen algunas de las líneas isogénicas utilizadas, provenientes de laboratorios norteamericanos con una escala intermedia de 25 ó 45 generaciones en el Laboratorio de Modelos Biológicos Experimentales de la Academia de Ciencias de la URSS, y que llegaron a Cuba en 1984. Se adjunta además, el comportamiento reproductivo de algunas de las cepas isogénicas de este estudio. Según se pudo conocer, el número de crías por madre se mantuvo, con la única excepción para el isogénico C3H/Sn, con menos de cuatro crías por hembra. Esta reducción de la fertilidad pudiera estar relacionada con la teratozoospermia presente en el macho C3H/Sn (Tabla I), aunque se conoce que una cabeza anormal no implica siempre un complemento cromosómico anormal,^{7,9} una posibilidad es que las anomalías de la cabeza interfieran en la capacidad de fecundación de estos espermatozoides, aunque esto ha sido comprobado mayormente para las anomalías de la pieza media lo que reduce la movilidad del espermatozoide.³

Además, en cuanto a los híbridos se puede observar en la Tabla I la frecuencia espontánea y algunos rasgos interesantes:

De los 12 híbridos posibles las dos terceras partes mejoran a sus parentales y el 50 % de ellos, lo hace ostensiblemente en cuanto al rango y media de cabezas anómalas. Sólo un híbrido en el que participa el C3H/Sn como macho pudo ser logrado, el cual mostró un rango amplio y una media no satisfactoria. Con la DBA hembra hubo dificultades en la obtención del híbrido a lo que debió contribuir la baja libido de la hembra y la alta teratozoospermia del macho C3H/Sn. La oligospermia del híbrido C3H/Sn x C57B1/6j puede ser debida a una disfunción de la espermatogénesis en esos animales, se desconocen sus orígenes, y el posible impacto de la afectación morfológica en el macho parental, en esta alteración de la F-1. Posiblemente, sea necesario y además interesante, un estudio citogenético del parental y el híbrido en espermatoцитos primarios.

TABLA II

Origen y comportamiento reproductivo de las líneas isogénicas estudiadas

Líneas	Fertilidad crías/madre	Hembras fértiles	Generaciones URSS	Cuba
Balb/c YC	5,4	98,0 %	F 105-127	F 127-136
DBA/2j YC	4,0	86,0 %	F 80-125	F 125-132
C3H/Sn YC	6,6	99,5 %	F 70-97	F 97-107
C57B11/6j YC	8,22	99,4 %	F 78-110	F 100-120

Sn Laboratorios Snell

J Laboratorios Jackson

Y Laboratorios de Modelos Biológicos Experimentales, Academia de Ciencias de la URSS

C Bioterio del Centro Nacional de Investigaciones Científicas

El único híbrido que no mejora la frecuencia de uno de sus parentales (DBA/2j) es el DBA/2j x C3H/Sn. Ciertamente de todos los híbridos donde participó C3H/Sn sólo el C57B1/6j macho x C3H/Sn hembra mostró frecuencias satisfactorias.

En la Tabla III se pueden observar las diferentes formas anómalas: banana, sin gancho y amorfa. Esta última, por el criterio de clasificación es un grupo demasiado amplio y no será incluida como guía en el análisis (Fig. 1).

TABLA III

Comparación de las formas sin gancho-banana en las diferentes líneas e híbridos

Machos	DBA/2j	Balb/c	C57B1/6j	C3H/Sn
Hembras	SG-B	SG-B	SG-B	SG-B
DBA/2j	1,24 ≈ 1,18	0,46 > 0,16	0,36 ≈ 0,28	Dificultades en la obtención del híbrido
Balb/c	0,38 > 0,08	13,8 > 5,8	0,42 < 2,18	2,60 > 1,00
C57B1/6j	0,46 < 0,86	0,06 < 0,56	2,10 < 4,10	Oligospermia
C3H/Sn	3,08 > 2,32	2,40 > 1,55	0,44 ≈ 0,38	19,96 > 1,16
CBA	C3H/He	A/j	AKR	"Suizos"
0,58 ≈ 0,64	0,30 < 0,77	3,88 > 0,64	0,52 ≈ 0,40	0,64 ≈ 0,72

SG Forma sin gancho

B Forma Banana

Todos los valores están expresados en %

La línea C57B1/6j como casi todos sus híbridos tuvieron un predominio de la forma banana sobre la sin gancho. También se observó este predominio en la línea C3H/He, pero en general la relación entre ambas formas tiende a seguir en los híbridos aquella mostrada por el macho isogénico cuando participa como hembra en el cruce. La única excepción absoluta a esto fue el híbrido C57B1 X Balb/c en el cual se invierte la proporción banana-sin gancho con respecto al isogénico Balb/c, esto corrobora que los factores autosómicos están involucrados en la determinación de las proporciones relativas de las distintas formas.¹⁰

Por último, los ratones no isogénicos albinos conocidos como "Suizos" exhibieron una frecuencia adecuada de cabezas anómalas, con un estrecho rango de variación.

CONCLUSIONES

Al estudiar las líneas isogénicas de Cuba se observan frecuencias espontáneas por encima de lo reportado en la literatura en el caso de la C57B1 y una alta teratozoospermia en la línea C3H/Sn, lo cual pudiera estar relacionado con la agresividad de algunos factores ambientales, lo que parece estar comprometiendo el comportamiento reproductivo de esta última línea.

Fueron seleccionadas algunas líneas e híbridos que pudieran ser útiles en la evaluación toxicológica teniendo en cuenta su comportamiento reproductivo respecto a los parámetros de menor variabilidad y más baja frecuencia de anomalías, las cuales son: AKR, C3H/He, CBA, la no isogénica "Suiza", C57B1 X DBA, DBA X Balb/c, DBA X C57B1, Balb/c X C57B1, C57B1 X C3H/Sn. Balb/c X DBA

La relación de las formas banana-sin gancho se demostró que es característica para la línea isogénica y por lo general, esto se mantiene en la F-1 cuando participa como hembra en el cruce, lo cual parece confirmar la existencia de factores autosómicos en la determinación de los tipos relativos de cabezas anómalas.

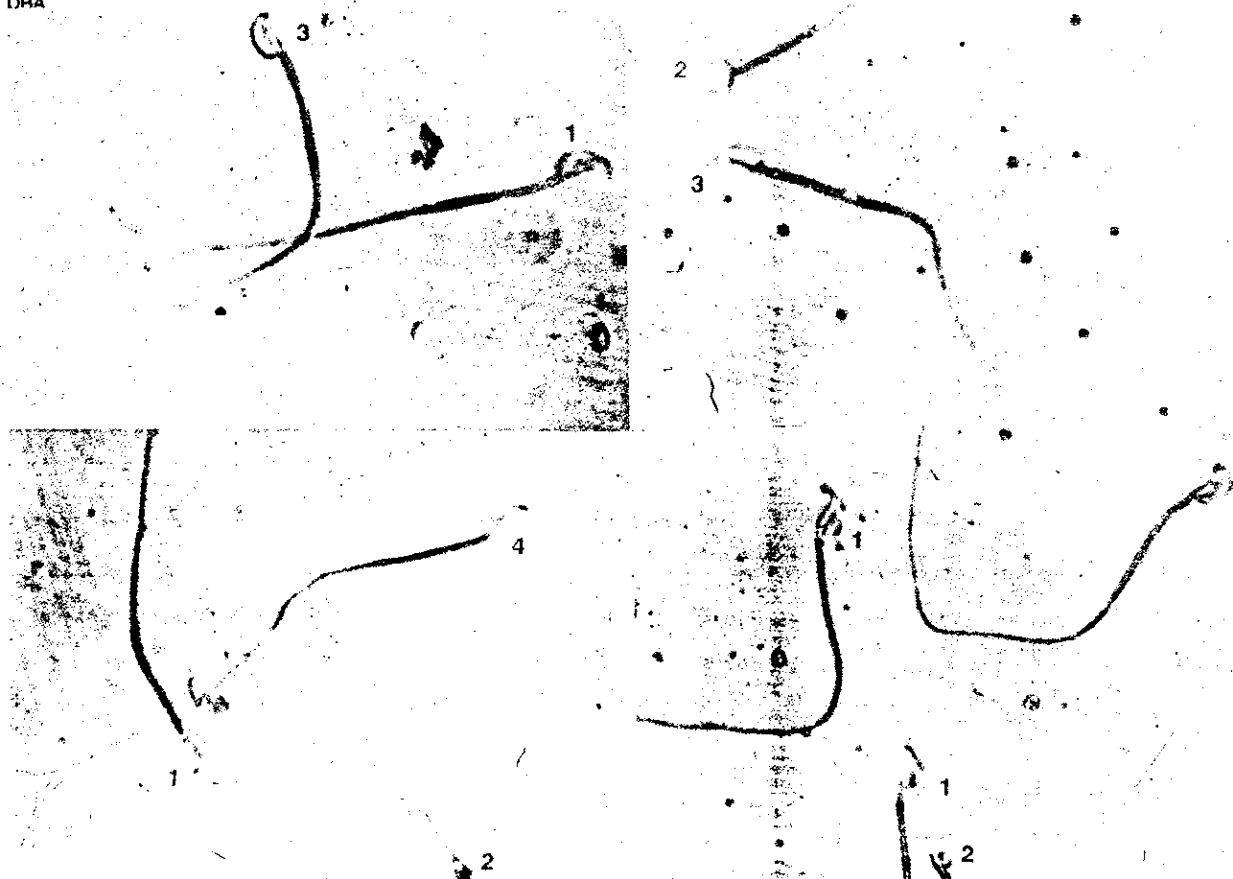


Fig. 1. Formas normales y anómalas en la morfología de la cabeza del espermatozoide en el ratón:

1. Cabeza normal; 2. cabeza amorfa; 3. cabeza sin gancho; 4. cabeza banana

BIBLIOGRAFIA

1. Wyrobek A.J. and Bruce W.R. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 70, 1973.
2. Quinto J. and Marinis E. *Mutation Research*, 124, 235, 1983.
3. Wyrobek A.J. and Bruce W.R. (Eds) *Chemical Mutagens*, 5, Plenum Press, New York, 257, 1978.
4. Bruce W.R., Furrer R. and Wyrobek A. J. *Mut. Res.*, 23, 381, 1974.
5. Topham J.C. *Mut. Res.*, 69, 149, 1980.
6. Wyrobek A.J., Watchmaker G. and Gordon L. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, 4, 83, 1984.
7. Gledhill B.L. *Acta Vet. Scand.*, 7, 1, 1966.
8. Stolla R. and Gropp A. J. *Reprod. Fertil.*, 38, 335, 1974.
9. Wyrobek A.J., Heddle J.A. and Bruce W.R. *Can. J. Genet. Cytol.*, 17, 575, 1975.
10. Krzanowska H. *Genet. Res.*, 28, 189, 1986.

NUEVAS PUBLICACIONES

COMPILACIONES: ELECTRONICA Y COMPUTACION

Edición bajo el auspicio técnico de la Dirección de Desarrollo Tecnológico del Centro Nacional de Investigaciones Científicas

Tiene el objetivo de mostrar resultados relevantes de los trabajos de investigación y desarrollo realizados en los diferentes laboratorios y talleres de esta Institución, así como de otras instituciones nacionales y extranjeras que colaboran con ella. Los trabajos están relacionados con los siguientes temas: instrumentación, electrónica, sistemas automatizados, interfases, software y otros. 172 p.