

Acción cito y genotóxica de algunos contaminantes ambientales sobre la espermatogénesis

Cito and Genotoxicity of some Environmental Chemicals upon Spermatogenesis

NELLY LAFUENTE-INDO

Laboratorio de Genética Toxicológica.
Facultad de Odontología, Universidad de Chile

Conocer la sensibilidad de las poblaciones celulares de la gónada ante la acción citotóxica y/o genotóxica frente a las sustancias químicas del macro y micro ambiente es muy importante ya que el daño que en ellas puede detectarse es fundamental para predecir el riesgo genético de las especies.

Se hace un análisis del comportamiento de las células germinales durante la espermatogénesis de: *Schistocerca cancellata* (langosta); *Schroederychtis chilensis* (tiburón); *Mus musculus* (ratón), frente a la acción de: Ciclofosfamida, Adriamicina, Actinomicina D, y tres plaguicidas: Captan, Dipterex y Bayleton.

El daño es detectado mediante los test de: cromosomas meióticos, frecuencia de quiasmas, teratospermia, análisis electroforético de las histonas (tiburón) y citotoxicidad. Los resultados se discuten con los de la literatura, postulando que: espermátidas, espermatoцитos y espermatogonios B, son susceptibles a la acción de las sustancias químicas probadas.

De un tiempo a esta parte nuestro ambiente se ha modificado por el aumento de los agentes contaminantes. El deseo del hombre de mejorar su calidad de vida, por una parte, y la necesidad imperiosa de producir mayor cantidad de alimentos, por otra, para una población que crece en progresión geométrica, han traído como consecuencia no deseada el deterioro del ambiente.

Los desechos industriales, las sustancias fabricadas para controlar las plagas (competidoras por el alimento), drogas o medicamentos, han resultado tener otros efectos que aquellos para los cuales fueron diseñados. Estos sistemas han resultado ser dañinos para la población humana. Muchos de estos daños sólo han podido pesquisar por métodos epidemiológicos, con el problema que esto conlleva, el daño es detectado después que éste se ha producido, así hay una población irreparable a la acción deletérea de los contaminantes.

Esto ha hecho surgir la imperiosa nece-

sidad de tener sistemas biológicos de ensayo, que permitan anticiparse al uso masivo de las nuevas sustancias y tener un conocimiento de su comportamiento como posibles agentes genotóxicos.

Muchos son los sistemas de ensayo biológicos propuestos: procariontes, vegetales, insectos, mamíferos y varios son los test utilizados: "Ames", "micronúcleos, alteraciones cromosómicas en mitosis o meiosis", etc.

El nivel de nuestra comprensión sobre el efecto de agentes contaminantes o cualquier noxa sobre seres vivos, dependerá en gran medida de nuestro conocimiento sobre los sistemas biológicos, propuestos como sistemas de ensayo.

Todos estos sistemas son sometidos a condiciones experimentales en el laboratorio, acondicionando todas las variables independientes (temperatura, humedad, alimentación, etc.) de tal manera que los datos así obtenidos deberán tener un valor predictivo.

Abreviaturas:

Ciclofosfamida, CFA; Actinomicina D, Act. D; Adriamicina, Adr.; Bayleton, Byt.; Dipterex, Dpt.; Captan, Cpt.; Etyl-

metano sulfonato, EMS; Metylmetano sulfonato, MMS; Etylnitrosurea, ENU.

“En la estimación del riesgo genético de los contaminantes uno de los problemas es extrapolar los resultados experimentales a la situación humana” (Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogenesis).

El daño genotóxico puede evidenciarse tanto en las células somáticas como en las germinales de los organismos superiores.

Las sustancias que producen daño a nivel de las células somáticas pueden ser vistas como posibles carcinógenos y aquellos que producen daño genotóxico a nivel de células germinales pueden ser consideradas como inductoras de riesgo genético (Ashby, 1985).

Se considera daño la lesión que sufre el genoma, si este daño es transmitido generacionalmente se habla de un riesgo genético.

Desde el punto de vista del riesgo genético, lo que interesa es conocer el daño genotóxico a nivel de las células germinales, ya que éstas son las responsables del traspaso del genoma de una generación a otra.

El sistema biológico más usado para este efecto es ratón, desde los trabajos de Auerbach (1949), Russell (1954) y Cattanaich (1957); sin embargo, otros sistemas no-mamíferos pueden ayudarnos a entender mejor los mecanismos genéticos o moleculares involucrados en estos cambios.

Nuestro laboratorio propuso en 1979 a *Schistocerca cancellata*, una langosta, y *Schroderychtis chilensis*, un tiburón, como sistemas de ensayo para la detección del daño y/o riesgo genético provocado por diferentes sustancias contaminantes, del macro y micro ambiente, a que estamos siendo sometidos en diferente medida todas las especies del planeta.

Si la contaminación abarca un ambiente amplio, como por ejemplo aire, agua o suelo, y no depende de una decisión individual, sino de la decisión política o reglamentación vigente, decimos que está contaminando el macro ambiente, si la contaminación al contrario afecta a un individuo o a un grupo cerrado como los obreros de una fábrica, por ejemplo, hablamos de micro ambiente.

Los contaminantes del macro o micro ambiente pueden inducir efectos tóxicos o

genotóxicos. Los primeros son los que produciendo alteraciones en el individuo que incluso pueden causarle la muerte no implican una alteración del genoma, en cambio, efecto genotóxico es aquel que produce alteración del genoma por interacción de la sustancia contaminante con el material genético.

¿Cómo se afecta el genoma, qué tipo de daño se induce, cuáles son las poblaciones más susceptibles o resistentes a la acción de estos agentes? Estos son algunos de los problemas que hay que resolver.

Al problema ¿cuáles son las poblaciones germinales más susceptibles a la acción genotóxica? podríamos proponer como hipótesis de trabajo tentativa: tres son las poblaciones de más alto riesgo en el testículo: 1) Espermatogonios por sus poblaciones en activo ciclo celular proliferativo; 2) Espermatocitos I, en los que ocurre la primera profase meiótica y en este momento a nivel de la cromatina hay modificaciones que la hacen susceptible a la interacción con otras macro moléculas y 3) Espermatidas, ya que durante la citodiferenciación se produce un recambio de histonas principalmente H₁ por protaminas.

RESULTADOS Y DISCUSION

Analizaremos algunos de los diferentes experimentos diseñados para contrastar esta hipótesis:

Nosotros hemos usado tres sistemas de ensayo biológico: *Schistocerca cancellata*, *Schroderychtis chilensis*, *Mus musculus*, y diferentes test de prueba, usando como agentes genotóxicos, CFA; Act. D; Adr. y 3 plaguicidas: Byt; Dpt y Cpt.

TABLA 1

Tipos de test y sistemas de ensayo usados

Test	Langosta <i>Sch.</i> <i>cancellata</i>	Tiburón <i>Sch.</i> <i>chilensis</i>	Ratón <i>M.</i> <i>musculus</i>
Micronúcleo			+
Citogenético	+		+
Teratospermia	+		+
Electroforesis proteínas nucleares (histonas)		+	

Schistocerca cancellata = (Serville)

El testículo de esta especie se presenta como un racimo de pequeños túbulos, los que tienen una organización pseudoquística, (Craig-Cameron, 1970 Cit. a White, 1983).

Los cistos están separados por células "septum" y van generándose de espermatogonias a espermatozoides desde la porción cefálica a la caudal del túbulo. Cada cisto contiene sólo un tipo de células germinales, lo que facilita el análisis.

En los túbulos del test de *Schistocerca cancellata* es posible observar una secuencia lineal de distintos estados de la espermatogénesis; espermatogonios, espermatoцитos I, II, espermátidas, y espermatozoides, en estas poblaciones es posible encontrar células en mitosis, meiosis y diferentes etapas de la citodiferenciación de las espermátidas (Jain y Sing, 1967).

Henderson (1963) y Westerman (1967) establecen el tiempo de duración de la espermatogénesis para *Schistocerca gregaria*, tiempo que hemos tomado como referencial para nuestros experimentos.

Hemos usado los cromosomas meióticos del Diplonema medio, como punto "0" para analizar los resultados.

Respecto a la cantidad de células dañadas, se aprecia que el momento de mayor susceptibilidad es el inicio de la meiosis, en la población de citos I a las 72 horas.

Hay algunas explicaciones para este hecho, ya que hay síntesis de ARNm en esta etapa, lo que haría más sensibles a las zonas de transcripción (Henderson 1971a, 1971b).

El efecto de la droga se observa como daño cromosómico de tipo fractura de cromosoma, y/o de bivalente en los autosomas y como variaciones de la frecuencia de quiasmas (Ellahueñe y Lafuente, 1981; Lafuente-Indo y cols., 1982).

TABLA 2

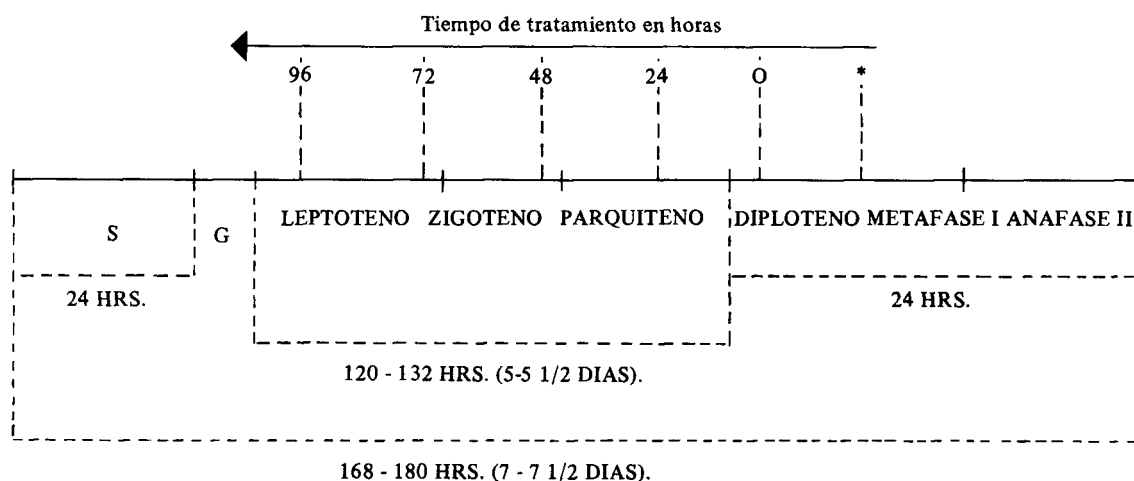


Diagrama: Tiempos aproximados de duración de la meiosis para *Sch. gregaria* según Henderson S.A., 1963 y Westerman, M., 1967.

O, *: Etapas analizadas.

TABLA 3

Tiempo de tratamiento con CFA	Número de células analizadas	Número de células dañadas	MODIFICACIONES				
			Quiebre de cromosomas	Quiebre de bivalentes	Total de quiebres	Frecuencia quiasmas control	Variaciones frecuencia de quiasmas
24 hrs.	150	73	10,3	2,3	15,0	19,2	23,2
48 hrs.	150	50	10,3	1,6	13,6	19,1	21,8
72 hrs.	150	88	26,6	3,3	34,0	19,2	21,6
96 hrs.	150	106	34,3	4,3	43,0	19,3	20,0

Al usar los plaguicidas: Cpt = 50 mg/Kg p.v.; Dpt = 3,5 mg/Kg p.v. y Byt = 10 mg/Kg p.v., en *Schistocerca cancellata* se demuestra actividad genotóxica para estos compuestos.

Los espermatoцитos de individuos tratados con cada uno de los tres pesticidas presentaron daño cromosómico y variaciones de la frecuencia de quiasmas. Estas alteraciones difieren significativamente del grupo control en un nivel de confianza de 0,5 (García y Lafuente-Indo, 1984).

Estos resultados corroboran lo señalado para la población de espermatoцитos de *Sch. cancellata*, como una población sensible, tanto al usar un agente genotóxico conocido como lo es la CFA, como al usar sustancias organo-cloradas, como lo son los pesticidas antes mencionados.

Los análisis de citotoxicidad con las mismas drogas demostraron como primera acción una desorganización del túbulo y a los citos y espermátidas como poblaciones más susceptibles al daño (Orellana *et al.*, 1983).

Es claro que todos los compuestos que inducen daño genético en las células germinales son citotóxicas, pero no todos los citotóxicos son genotóxicos.

Mus musculus

En este sistema biológico hemos trabajado con el test de Teratospermia para detectar daño. Soto (1983), estableció la frecuencia de teratospermia espontánea e inducida con CFA para las cepas: Balb, Balb/c y A/sw encontrando que las poblaciones más sensibles eran los espermatoцитos a 26 ds. y las espermatogonias a 36 ds. postratamiento, de acuerdo a los tiempos de Oackberg y Diminno (1960).

Hemos repetido la experiencia usando un híbrido Balb/c X Snell, y el mismo agente CFA, corroborando la sensibilidad para las mismas poblaciones, sólo que acá la frecuencia es significativamente menor que la encontrada para Balb/c. Balb/c = 34% Balb/c X Snell = 12%.

Si en este sistema se analizan los efectos citotóxicos se observa, al igual que en *Schistocerca*, desorganización del túbulo lo que indicaría una lesión a nivel de la célula

Septum, lo que no es de extrañar, ya que ella mediatiza las sustancias que llegan a las células germinales.

Se advierte una disminución de las poblaciones de citos y espermátidas, lo que de acuerdo a los tiempos de observación, 14-26 y 36 días, indicaría daño en espermátidas, citos y gonios B (Orellana *et al.*, 1983).

Como se deduce de lo anterior las poblaciones más sensibles a la citotoxicidad parecen ser citos I/y Gonios B.

En este sistema biológico, durante los últimos 40 años se han estudiado muchos compuestos químicos que causan genotoxicidad en diferentes cepas de *Mus*, y en él se han probado sustancias contaminantes como benzopireno, cafeína, etc., drogas como Adr., CFA o Act. etc., o sustancias genotóxicas como EMS o ENU, etc., que han demostrado la sensibilidad de las poblaciones de las células germinales en el test del ratón. Para probar los efectos genotóxicos se han usado diferentes test como "Dominantes letales", "Translocaciones heredables" o "Locus específicos". Obviamente muchos son los trabajos que demuestran estos efectos (Ehling, 1974, 1977; Generoso y Russell, 1960; Generoso, 1980, 1984; Russell y Hunsicker, 1980; Russell *et al.*, 1979).

Con el test de dominantes letales y usando MMS, EMS se encuentra un claro efecto a nivel de espermatozoides espermátidas y citos I (Ehling *et al.*, 1969; Ehling, 1974). Estos datos también han sido corroborados por Generoso (1980), usando el test de translocaciones heredables.

Si se comparan con los datos para genotoxicidad en ratón obtenidas por Ehling usando varios agentes mutagénicos, en que encuentra como estados más sensibles los postmeióticos, espermátida y espermatozoides usando EMS, MMS y CFA y la población de citos utilizando Myleran e isopropyl-methanosulfonato, no encontrando con ninguno de ellos sensibilidad en las espermatogonias, se podría decir que las poblaciones más sensibles son los citos, espermátidas y en menor proporción las espermatogonias B; no apareciendo con estos test las gonias A.

TABLA 4

Comparación entre efecto citotóxico y teratospermia

Tiempo en semanas y días *	Población celular del teste de ratón (músculos)**	Efectos citotóxicos por CFA (200 mg x kg p)**	Teratospermia por CFA (200 mg x kg p)***
1ª semana 1 - 7 días	Espermatozoides Epidídimo		
2ª semana 8 - 14 días	Espermatozoides testiculares Espermátidas tardías	+	+
3ª semana 15 - 21 días	Espermátidas Tempranas	+ (Δ)	+ (Δ)
4ª y 5ª semanas 22 - 28 días 29 - 35 días	Espermatocitos	+ (Δ)	+ (Δ)
6ª semana 36 - 42 días	Espermatogonios Tipo -B	+	+

* Oackberg y Diminno (1960).

** Lafuente-Indo, datos no publicados.

*** Soto (1983).

Δ : Significativamente más alto que las otras poblaciones celulares.

Estos autores, usando variados agentes, han obtenido una variedad de resultados que demostrarán que los estados postmeióticos son más susceptibles que los espermatogoniales (Lyon, 1981).

Russell (1984) ha propuesto un nuevo test de locus específico para espermatogonias troncales, usando ENU y demuestra una relación lineal entre dosis-respuesta para éstas células.

Schroederychtis chilensis (Springer)

También hemos trabajado con un tiburón de nuestras costas conocido vulgarmente como "Pinta roja", perteneciente a la familia Scyliorhinidae y como tal los machos poseen una gónada de organización ampular, cada ampula contiene una sola y sincronizada población germinal (Lafuente-Indo *et al.*, 1982; Lafuente-Indo, 1980).

Esta gónada es muy apropiada para hacer análisis moleculares de la cromatina, de las diferentes poblaciones celulares durante la espermatogénesis. Olivares (1978), estableció el patrón normal de histonas para gonios-citos y espermátidas, encontrando en la población de citos I una variación de

la H₁ una microheterogeneidad respecto a la H₁ somática.

Pensamos que al exponer al tiburón a la acción de CFA y ADR, drogas alquilantes, podríamos probar la sensibilidad de la población de citos y ver si las histonas son modificadas en sus patrones electroforéticos.

Al usar 200 mg/Kg p.v. de CFA y 10 mg/Kg p. de ADR, se comprobó una modificación de la banda H₁ de citos I, perdiendo su microheterogeneidad normal y presentándose como una pequeña banda densa.

Esta variación del patrón electroforético de la H₁ se encuentra asociada a la modificación del patrón normal de empacamiento de la cromatina, observación hecha al MET (Lafuente-Indo *et al.*, 1982).

Estos resultados en langosta-tiburón y ratón indicarían como poblaciones más sensibles a la población de citos y espermátidas, siendo las poblaciones pre-meióticas, gonios B y A. más resistentes a esta acción.

Ultimamente se está usando la capacidad de reparación no programada del ADN para medir indirectamente el daño genético, siendo éste un sistema muy eficiente (Sega, 1980).

TABLA 5

Cuadro resumen de cito (+) y genotoxicidad +

Droga	Gonios			Citos			Espermátidas			Espermatozoides		
	L	T	R	L	T	R	L	T	R	L	T	R
CFA (200 mg x kg p)	(+)		(+)	+(+)	+	(+)	+(+)		+(+)	+	+	+
MC (60 mg x kg p)				+			+			+		
A. Dr. (10 mg x kg p)					+	+						
L = Langosta T = Tiburón R = Ratón												

Resumen de la acción genotóxica inducida por CFA, evidenciada en diploteno

Tiempo de tratamiento con CFA	Nº de células analizadas	Nº de células dañadas	Promedio y desviación estándar
24 horas	50	26	24,33 ± 2,08
	50	25	
	50	22	
48 horas	50	18	16,66 ± 3,21
	50	13	
	50	19	
72 horas	50	25	29,33 ± 3,78
	50	32	
	50	31	
96 horas	50	33	35,33 ± 3,21
	50	39	
	50	34	

Así parece ser que la capacidad de reparación jugaría un rol importante frente a los agentes genotóxicos y desde un punto de vista teleológico es obviamente más importante la capacidad de reparación de las células germinales que las somáticas y dentro de las germinales las células troncales tendrían una mayor y más efectiva capacidad de reparación ante la acción genotóxica (Russell, 1984).

Después de esta exposición, podríamos concluir que la sensibilidad de las células germinales dependería de:

1. La calidad del agente, diferentes agentes producen diferentes efectos.
2. La sensibilidad para pesquisar el daño en cada población depende de la capacidad del test usado.

3. Y concordante a lo propuesto por Russell, la sensibilidad de cada población estaría en relación inversa a su capacidad de reparación.

REFERENCIAS

- ASHBY, J. (1985) Gonadal Genotoxicity assays as practical surrogates for germ-cell mutagenicity assays *Environ. Mutagenesis* 7: 236-266.
- AUERBACH, C. (1949) Chemical mutagenesis. *Biol. Rev. (Cambridge)* 24: 355-391.
- CATTANACH, B.B. (1957). *Nature (London)* 180: 1364-1365.
- CRAIG-CAMERON, T.A. (1970) Actinomycin-D and chiasma frequency in *Schistocerca gregaria*, *Chromosoma (Berl.)* 30: 169-179.
- EHLING, U.H. (1974) Differential spermatogenic response of mice induction of mutations by antineoplastic drugs. *Mutation Res.* 26: 285-295.

- EHLING, U.H. (1977) Dominant lethal mutation in male mice. *Ach. Toxicol.* 38: 1-11.
- EHLING, U.H. (1978) Specific locus mutation in mice, en: A. Hollaender (Ed.), *Chemical Mutagens*, Vol. 5, Plenum, New York, pp. 233-256.
- EHLING, U.H.; CUMMING, R.B.; MALLING, H.V. (1969) Induction of dominant lethal mutation by alkylating. *Mutation Research* 5: 417-428.
- ELLAHUENE, M.; LAFUENTE, N. (1981) Clastogenia inducida en la primera profase meiótica en *Schistocerca cancellata* mediante ciclofosfamida. *Arch. Biol. Med. Exp.* 14 (1): R 53.
- GARCIA, M.T.; LAFUENTE-INDO, N. (1984) Evaluación de efectos genotóxicos inducidos por pesticidas, mediante dos sistemas de prueba, *Arch. Biol. Med. Exp.* Vol. 17 (2): R 114.
- GENEROSO, W.M.; RUSSELL, W.L. (1960) Strain and sex variations in the sensitivity of mice to dominant-lethal induction with ethyl methane-sulfonate. *Mutation Res.* 8: 589-598.
- GENEROSO, W. (1980) Heritable translocation test in mice. *Mutation Res.* 76: 191-215.
- GENEROSO, W. (1979) Relative Rates at which Dominant-Lethal and heritable translocation are induced by alkylating chemicals in post-meiotic male germ cells of mice.
- GENEROSO, W.M. (1984) Dominant-lethal mutation and heritable translocation in mice, en: *Mutation cancer and malformation*. Ed. Ernest H. Y Chu and Generoso W., Plenum Publishing Corporation, 1984.
- GENEROSO, W.M.; HUFF, S.W. and CAIN, K.T. (1979b) Relative rates at which dominant-lethal mutations and heritable translocations are induced by alkylating chemicals in post-meiotic male germ cells of mice. *Genetics*, 93: 163.171.
- HENDERSON, S.A. (1963) Temperature and chiasma formation in *Schistocerca gregaria*, *Heredity* 18 (Part 1): 77-94.
- HENDERSON S. A. (1971a) Grade of chromatid organization in mitotic and meiotic chromosomes. I. The morphological feature. *Chromosoma (Berl.)* 35: 28-40.
- HENDERSON S. A. (1971b) Grade of chromatid organization in mitotic and meiotic chromosomes. II. Their interpretation in term of a master/slave model. *Chromosoma (Berl.)* 35: 41-56.
- LAFUENTE, N. (1980) Un modelo ampular en la gametogénesis. *Arch. Biol. Med. Exp.* 13: 171.
- LAFUENTE-INDO, N.; ELLAHUENE, M.; GARCIA, M.T.; VALDIVIA, R. (1982) Modificaciones de la fibra de cromatina en células germinales por la acción de agentes químicos, Actas V Congreso Latinoam. Genética, pp. 226-242.
- LYON, M. (1981) Sensivity of various germs-cell stages to environmental mutagens. *Mutation Research* 87: 323-345.
- OACKBERG, E.F.; DIMINNO, R.L. (1960) X-Ray sensitivity of primary spermatocytes of the mouse. *Int. J. Radiat. Biol.* 2: 196-209.
- OACKBERG, E.F. (1984) Germ cell toxicity mutation, cancer and malformation Plenum Publishing, Corporation.
- OLIVARES, C. (1978) "Caracterización de proteínas nucleares básicas durante las diversas etapas de la gametogénesis masculina de *Schroederychthis chilensis*". Tesis de Licenciado en Biología. Universidad de Chile, Sede Valparaíso.
- ORELLANA, M.; ELLAHUENE, M.; LAFUENTE-INDO, N. (1983) Citotoxicidad de ciclofosfamida sobre las poblaciones celulares del testículo de *Schistocerca cancellata*. *Arch. Biol. Med. Exp.* 16 (2): R 174.
- RUSSELL, W.L.; KELLY, E.M.; HUNSICKER, P.R.; BANGHAM, J.W.; MADDUX, S.C. and PHIPPS, E.L. (1979) Specific-locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse. *Procl. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76: 5818-5819.
- RUSSELL, W.L. and HUNSICKER, P.E. (1980) Possible effect of age at injection on mutation induction by ethylnitrosourea in the mouse. *Genetics* 94: 90-91.
- SEGA, G.A. (1980) Relationship Between Unscheduled DNA Synthesis and Mutation Induction in male mice, en: *DNA Repair and Mutagenesis in Eukaryotes*, W.M. Generoso, M.D. Shelby and F.J. de Serres, Ed., Plenum Press, New York.
- SEGA, A.G. (1982) Germ Cell Effects. DNA repair in Spermatocytes and Spermatids in mouse. Indicators of Genotoxic Exposure. *Cold Spring Harbor Laboratory*.
- SOTO, B.G. (1983) Efecto de agentes genotóxicos en la morfología de la cabeza del espermatozoide de ratón. Tesis de Licenciado en Biología, Universidad de Valparaíso, Chile.
- WESTERMAN, M. (1977) The effect of X irradiation on male meiosis in *Schistocerca gregaria*. I. Chiasma frequency response, *Chromosoma (Berl.)* 22: 401-416.