

2ej
20



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

" ZARAGOZA "

EFFECTO DEL TEQUILA EN EL COMPLEJO SINAPTONEMICO
DE ESPERMATOCITOS DE RATONES TRATADOS CON DOSIS

AGUDAS SUBLETALES

T E S I S

Que para obtener el Título de :

BIOLOGO

P R E S E N T A :

LUIS FERNANDO TAPIA PASTRANA

México, D.F., febrero de 1991

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

ABREVIATURAS.....	I
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
HIPOTESIS DE TRABAJO.....	25
OBJETIVOS.....	26
METODOLOGIA.....	27
RESULTADOS.....	33
DISCUSION.....	39
CONCLUSIONES.....	49
BIBLIOGRAFIA.....	50

ABREVIATURAS

ADH	ALCOHOL DESHIDROGENASA
ADN	ACIDO DESOXIRIBONUCLEICO
ARN	ACIDO RIBONUCLEICO
CS	COMPLEJO SINAPTONEMICO
DHAL	DESHIDROGENASA ALDEHIDICA
DL ₅₀	DOSIS LETAL MEDIA
E. C.	ELEMENTO CENTRAL
E. L.	ELEMENTO LATERAL
H ₂ O ₂	PEROXIDO DE HIDROGENO
i. p.	INTRAPERITONEAL
Kd	KILODALTON
NAD ⁺	NICOTIN ADENIN DINUCLEOTIDO OXIDADO
NADH	NICOTIN ADENIN DINUCLEOTIDO REDUCIDO
NADP ⁺	NICOTIN ADENIN DINUCLEOTIDO FOSFATO OXIDADO
REDOX	ESTADO DE OXIDO REDUCCION
SMOE	SISTEMA MICROSOMICO DE OXIDACION DE ETANOL

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo determinar si una bebida alcohólica era capaz de provocar alteraciones citogenéticas en células germinales

A tres grupos de ratones se les inyectó tequila por vía i.p. en dosis única que corresponden a 1/8, 1/4 y 1/2 de la dosis letal media (DL₅₀ = 16.83 mg/kg); en el experimento se incluyó un grupo tratado con Ciclofosfamida (150 mg/kg), que fue utilizado para verificar la efectividad del sistema empleado, y otro sin tratamiento. A los cinco días se obtuvieron los espermatozoides. El Complejo Sinaptonémico se puso de manifiesto mediante una técnica argéntica. Se analizaron treinta núcleos paquítenicos por cada ratón.

Los resultados obtenidos en los animales tratados con tequila mostraron que el Complejo Sinaptonémico presenta rupturas, desinapsis y configuraciones multiaxiales. En la segunda dosis se observó un incremento significativo en la frecuencia de desinapsis al comparar con el grupo sin tratamiento. Estos datos sugieren que altas concentraciones de tequila inducen daño citogenético en células de la línea germinal.

INTRODUCCION

El estudio de civilizaciones antiguas muestra que el hombre hace uso de las bebidas alcohólicas desde periodos próximos a los 4000 años A. de C., obteniéndolas a partir de la fermentación de jugos de frutas y granos. Lo anterior permite suponer que los efectos del abuso de estas bebidas acompañan al hombre desde que se integraron las primeras comunidades, existiendo referencias de su consumo en Anatolia, Babilonia y Sumeria (13,23,81).

Las bebidas alcohólicas, en general, son mezclas complejas de diferentes tipos de alcoholes, aldehidos y ésteres, además de una amplia variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos (59,61).

Existen muchas definiciones para el alcoholismo, considerándolo como una enfermedad; de entre ellas destacan las propuestas por la O.M.S. (1952) y la del Doctor Mark Keller (1958) del Centro de Estudios sobre el alcohol de la Universidad de Rutgers, que en conjunto resumen a las demás. La primera señala: "El alcohólico es el bebedor excesivo cuya dependencia del alcohol es suficiente para afectar su salud física y mental, así como su comportamiento social y de su trabajo, o bien que presente los inicios de tales manifestaciones" (81). El Dr. Keller puntualiza: "El alcoholismo es una enfermedad crónica, un desorden de la conducta caracterizado por la ingestión repetida de bebidas alcohólicas,

hasta el punto que excede a lo que esta socialmente aceptado y que interfiere con la salud del bebedor, así como con sus relaciones interpersonales y con su capacidad de trabajo" (82).

Posteriormente en el año de 1977,(82) especialistas de la O.M.S. denominaron a esta enfermedad "Síndrome de dependencia del alcohol" y aunque la etiología no está bien definida, el síndrome es una realidad psicobiológica. Lo anterior queda enmarcado bajo las siguientes premisas:

- 1.- Se identifican un conjunto de síntomas y signos relacionados con lo que se conoce como alcoholismo.
- 2.- Este síndrome es multifactorial y existe en diferentes grados. El sujeto afectado manifiesta necesariamente alteraciones de la conducta, de la subjetividad y del organismo y sus funciones.
- 3.- En dicho síndrome interactúan factores ambientales y sociales con los que son meramente orgánicos y biológicos.

Lo anterior confirma la complejidad del problema sobre el abuso de las bebidas alcohólicas, tanto en países en vías de desarrollo como en los desarrollados. En México, el consumo excesivo de alcohol constituye un problema grave por las múltiples implicaciones que irremediablemente afectan al sujeto bebedor y a la sociedad en su conjunto. Estimaciones del "Programa contra el alcoholismo y el abuso de bebidas alcohólicas" de la Secretaría de

Salud (1984) indican que el alcoholismo es la principal causa de cirrosis hepática, la cual está entre las 10 primeras causas de muerte en la población en general y ocupa el primer lugar entre la población masculina cuyas edades fluctúan entre los 25 y 44 años. (37). Con base en datos de la misma fuente, en 1984 se estimó que en nuestro país el 5.7 % de la población mayor de 20 años (aproximadamente 1.7 millones de habitantes) podía ser considerada alcohólica, detectándose que el consumo de alcohol iba en aumento (2). El dato anterior, aunque puede diferir de otras muchas estimaciones que aseguran un menor o mayor porcentaje de individuos alcohólicos, sirve como referencia que pone de manifiesto la importancia y magnitud de esta enfermedad.

Los efectos de la ingesta crónica de alcohol se manifiestan en numerosos órganos y sistemas incluyendo al hígado, páncreas, cerebro, corazón, músculo esquelético, tracto gastrointestinal, sistema hematopoyético y eje hipotalámico-pituitario-gonadal (31,47,73,80).

1.2 ABSORCIÓN, DISTRIBUCIÓN Y METABOLISMO DEL ALCOHOL.

Al ingerir bebidas alcohólicas, el 20 % del alcohol se absorbe inmediata y directamente por las paredes del estómago; el restante 80% se absorbe más lentamente en el intestino delgado. De esta manera, el alcohol pasa al torrente sanguíneo, distribuyéndose por

todos los tejidos y líquidos del cuerpo (21,81).

Solo del 2 al 10 % del alcohol absorbido se elimina a través de los riñones y pulmones; el resto se oxida en el cuerpo, principalmente en el hígado, siendo mínimo su metabolismo extrahepático. La oxidación del etanol por el hígado incluye su conversión inicial a acetaldehído y posteriormente a acetato (47).

Los hepatocitos poseen tres vías principales para metabolizar el etanol, cada una localizada en diferentes compartimentos celulares: 1.- sistema de la alcohol deshidrogenasa -ADH- del citosol o fracción soluble de la célula, 2.- el sistema de oxidación microsómica, localizado en el retículo endoplásmico y 3.- mediante el sistema de la catalasa, localizado en los peroxisomas (4,47). A continuación se describirán dichos sistemas.

1.- La alcohol deshidrogenasa cataliza la conversión de etanol a acetaldehído en una reacción que requiere de NAD como cofactor. La oxidación de etanol genera un exceso de equivalentes reducidos como NADH en el citosol hepático. El acetaldehído producido en la reacción se convierte a acetato por la enzima aldehído deshidrogenasa localizada principalmente en las mitocondrias. En esta última reacción también el NAD actúa como cofactor y se forma NADH. El incremento en la producción de NADH/NAD señala alteraciones importantes del metabolismo hepático durante la

oxidación del etanol. El acetato se libera al torrente sanguíneo y pasa a los tejidos periféricos donde es oxidado a bióxido de carbono (CO₂) y agua (Fig. 1).

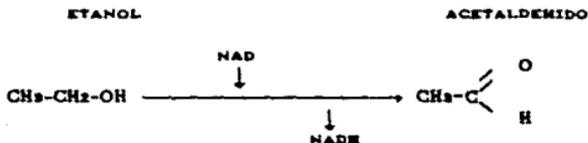


FIG 1. REACCION CATALIZADA POR LA ALCOMOL DESHIDROGENASA

2.-El sistema microsómico de oxidación del etanol (SMOE) depende del citocromo P-450; es una de las vías alternativas para la oxidación del etanol y está presente en el retículo endoplásmico. La participación de este sistema es probablemente menor en condiciones normales, sin embargo durante el consumo crónico se puede producir un incremento adaptativo del mismo.

El SMOE utiliza NADP⁺ y oxígeno y el incremento de su actividad durante la ingestión crónica de etanol está asociada con la proliferación del retículo endoplásmico liso. Comparado con el sistema ADH, el SMOE requiere niveles altos de etanol para la total saturación y máxima velocidad (Fig. 2).

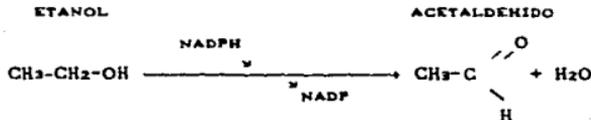


FIG. 2 REACCION CATALIZADA POR EL SISTEMA SMOE.

3.- la enzima catalasa también es capaz de oxidar etanol in vitro en presencia de un sistema generador de peróxido de hidrógeno H₂O₂ y por tanto, la contribución de este sistema en la oxidación in vivo no es significativa (Fig.3).

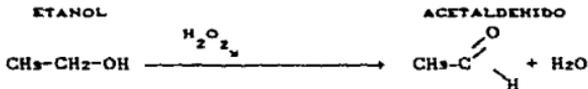


FIG. 3 REACCION CATALIZADA POR LA CATALASA

El acetaldehído que se genera en cualquiera de las reacciones enzimáticas previamente analizadas, se transforma en ácido acético mediante la acción de la enzima deshidrogenasa aldehídica (DHAL) y durante la reacción se genera NADH. La oxidación del etanol genera acetaldehído y acetato (Fig. 4), compuestos que afectan directamente diversos procesos metabólicos importantes para las mitocondrias y membranas biológicas, del hígado, el sistema nervioso central, el músculo, el páncreas y el intestino (23).

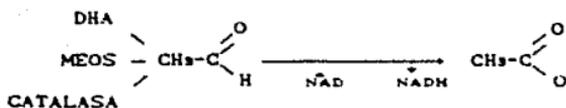


FIG. 4 REACCIÓN CATALIZADA POR LA DESHIDROGENASA ALDEHÍDICA

1.3 EFECTOS TERATOGENICOS, CARCINOGENICOS Y MUTAGENICOS PRODUCIDOS POR EL ALCOHOL.

Diversos estudios (12,42,62) han mostrado que el etanol es un agente teratogénico en el hombre; induce el síndrome fetal o embriopatía por alcohol. Las características de este síndrome son: defectos mentales y de desarrollo, retardo en el crecimiento intrauterino y post-natal, microcefalia, hiperactividad, anomalías típicas de la cara, hipoplasia de la mandíbula, bordes pequeños de los labios. También son frecuentes fallas en el corazón, anomalías de los genitales, articulaciones y pliegues palmares. En total son 25 las anomalías descritas en niños con este síndrome y su frecuencia en hijos de madres alcohólicas en fase crónica es aproximadamente 40 % .

Análisis epidemiológicos han demostrado una correlación entre el consumo de alcohol y cáncer en la cavidad oral, la faringe, la laringe y el esófago, y en menor grado en el hígado, el intestino, el páncreas y el pulmón. Sin embargo, aun no está claro si el

etanol actúa directa o indirectamente como un agente carcinogénico o co-carcinogénico (59,62).

En algunas plantas, el etanol induce rompimientos cromosómicos; células meristemáticas del haba (*Vicia faba*) tratadas con etanol muestran aberraciones cromosómicas del tipo cromatídico indicando que el compuesto actúa en las fases presintética (G₁) y sintética (S) del ciclo celular. Asimismo se ha visto que la frecuencia de aberraciones depende de la concentración. (17,62).

En bacterias, el etanol ha mostrado mutagenicidad en la prueba de corto plazo *E. coli* RK (36,59). Sin embargo, en estudios empleando la prueba de Ames, los resultados han sido negativos (59).

Los alcohólicos muestran incrementos de aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas, ambas pruebas consideradas como expresión del daño genético inducido por agentes químicos o físicos. No obstante, los estudios realizados en células de mamíferos *in vitro* muestran resultados contradictorios (60,61).

1.4 ALCOHOLISMO Y REPRODUCCION

En nuestro país se han realizado estudios que permiten calcular que entre el 70 y 80 % de la población varonil son bebedores y en

la población femenil de la misma edad, las cifras oscilan entre el 35 y 55 % . La edad a la que más se bebe varía entre los 30 y los 50 años (42).

Existen datos que señalan los efectos del alcohol sobre el aparato reproductor, tanto en animales de laboratorio como en el humano; el consumo crónico de alcohol provoca en las mujeres entre otras alteraciones ginecobstétricas las siguientes : - menopausia temprana, alteraciones menstruales, abortos repetidos, infertilidad y dificultades durante el parto . En animales experimentales se mencionan los siguientes cambios: atrofia de los ovarios, el útero y las trompas; desarrollo de folículos distróficos, cuerpos lúteos pequeños y hemorrágicos e inhibición de la ovulación (42).

Por lo que se refiere al aparato reproductor masculino, los alcohólicos crónicos con el hígado enfermo, comúnmente muestran hipogonadismo con atrofia testicular, impotencia, poco crecimiento de la barba y del vello púbico, próstata reducida de tamaño y ginecomastia, hipoandrogenización e hiperestrogenización. Los eyaculados pueden ser oligospermicos o azospermicos y la histología testicular muestra una reducción del diámetro de los túbulos seminíferos y fibrosis peritubular con células de Leydig de apariencia anormal. Asimismo, recientemente se han reconocido daños gonadales en individuos alcohólicos sin hígado cirrótico

como consecuencia del abuso de alcohol (31,62).

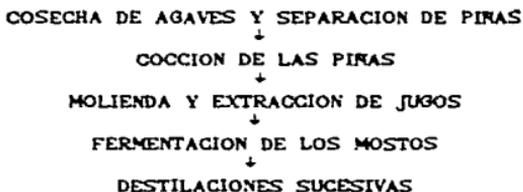
La ingesta de etanol en el hombre y en animales experimentales reduce los niveles de testosterona en plasma y si continúa en una fase crónica se asocia al desarrollo de atrofia testicular (31,80). El daño inducido en células de Leydig es similar al hallado en hepatocitos de animales tratados con alcohol, tanto morfológica como a nivel del equilibrio del estado REDOX, ofreciendo evidencia circunstancial de un mecanismo común para la toxicidad inducida por el alcohol en testículo e hígado(62).

Otros estudios han revelado que el consumo de alcohol conlleva a una reducción en la motivación y realización sexual, así como una disminución de la capacidad para fertilizar de los espermatozoides (8,9,31). También se ha mostrado que durante el consumo crónico se produce inhibición en la oxidación de retinol a retinal (sustancia esencial para la espermatogénesis). Probablemente esta inhibición se debe a la competencia entre el etanol y el retinol por la enzima ADH testicular (79).

1.4 PRODUCCION, CONSUMO Y ELABORACION DEL TEQUILA.

Actualmente el tequila ocupa el cuarto lugar entre las bebidas de mayor consumo en México. En 1975, la producción fue de 20 588 millones de litros, con un consumo *per capita* de 0.637 litros, mientras que en 1980 su producción fue de 41 927 millones de

litros y su consumo *per capita* fue de 1.090 litros (48) . A manera de definición se puede decir que el tequila es una bebida destilada que se obtiene a partir de las cabezas o pifias de Agave tequilana, aunque también se emplean otras especies y su elaboración, en forma general sigue este proceso (70):



1.5 GENOTOXICOLOGIA, CELULAS GERMINALES Y COMPLEJO SINAPTONEMICO.

Día a día se obtiene información sobre el peligro al que está sometido el hombre por exposición a diversos agentes físicos químicos y biológicos capaces de alterar su material genético involucrando no sólo la salud del individuo, sino también la de su descendencia (18,46). Para estudiar dicho riesgo la genética toxicológica desarrolla metodologías que permiten conocer el efecto de agentes potencialmente mutagénicos sobre el material hereditario, empleando para este fin una variedad de sistemas biológicos de prueba, que involucran desde el nivel molecular (ADN), hasta ensayos en organismos superiores, tratando de evaluar la importancia y riesgo real que representan para el hombre (56).

En general, los ensayos mutagénicos pueden clasificarse en cuatro grupos: 1.- Pruebas diseñadas para detectar lesiones inducidas a nivel molecular (toxicidad en ADN); 2.- Valoración de mutaciones en el nivel celular (usando microorganismos); 3.- Pruebas que estiman daño cromosómico (efecto clastogénico); 4.- Ensayos mutagénicos en organismos superiores completos (efectos sobre la prole) (56).

El estudio genotóxico se realiza en sistemas *in vivo* e *in vitro*, incluyéndose ensayos en células de la línea somática y en menor proporción en células germinales (46, 74). En relación a estas últimas, se han desarrollado diversas técnicas para evaluar el daño genético heredable en mamíferos expuestos a agentes químicos o sus derivados metabólicos. Este tipo de ensayos son de suma importancia, pues existe la posibilidad de daño genético, transmisible a la descendencia del individuo expuesto si se detectan alteraciones citogenéticas en sus células germinales. En este tipo de ensayos las condiciones experimentales incluyen el metabolismo, la farmacocinética, el transporte a las gónadas y así como la persistencia del daño luego de varias divisiones celulares y la fertilización (74).

Siguiendo esta línea, en años recientes se ha descrito una nueva metodología alternativa que evalúa el daño a una estructura conocida como Complejo Sinaptonémico (CS), la cual aparece durante

la profase meiótica. La meiosis es una división especializada durante la cual se efectúa la transición de la fase diploide ($2n$) a la fase haploide (n) del ciclo de vida de los organismos que se reproducen sexualmente. Una serie sincronizada de complejos rearrregios cromatínicos, preceden esta división luego de la fase S premeiótica, los cromosomas se condensan y los pares de cromosomas homólogos se aparean (sinapsis). posteriormente ocurre la formación de quiasmas que representan la recombinación genética y finalmente, los pares de cromosomas homólogos se segregan (fig 5). Todos estos rearrregios parecen estar mediados por el Complejo Sinaptonémico, ya que este organelo nuclear sufre una serie de cambios morfológicos que se correlacionan con los sucesivos rearrregios de cromatina (fig. 6), (39,46).

Durante el Cigoteno se produce el primer fenómeno esencial de la meiosis: Los cromosomas homólogos se alinean y se aparean, proceso que a menudo es denominado sinapsis. El apareamiento es muy específico y comprende la formación de estructuras especiales que se observan en microscopía de luz o electrónica y que corresponden al CS (33,39,65).

Cuando el apareamiento comienza, el acortamiento de los cromosomas ya es pronunciado y existe por lo menos una relación 300/1 entre el largo del ADN y la longitud de aquellos. Esto implica que sólo el 0.3 % del ADN de los cromosomas homólogos se

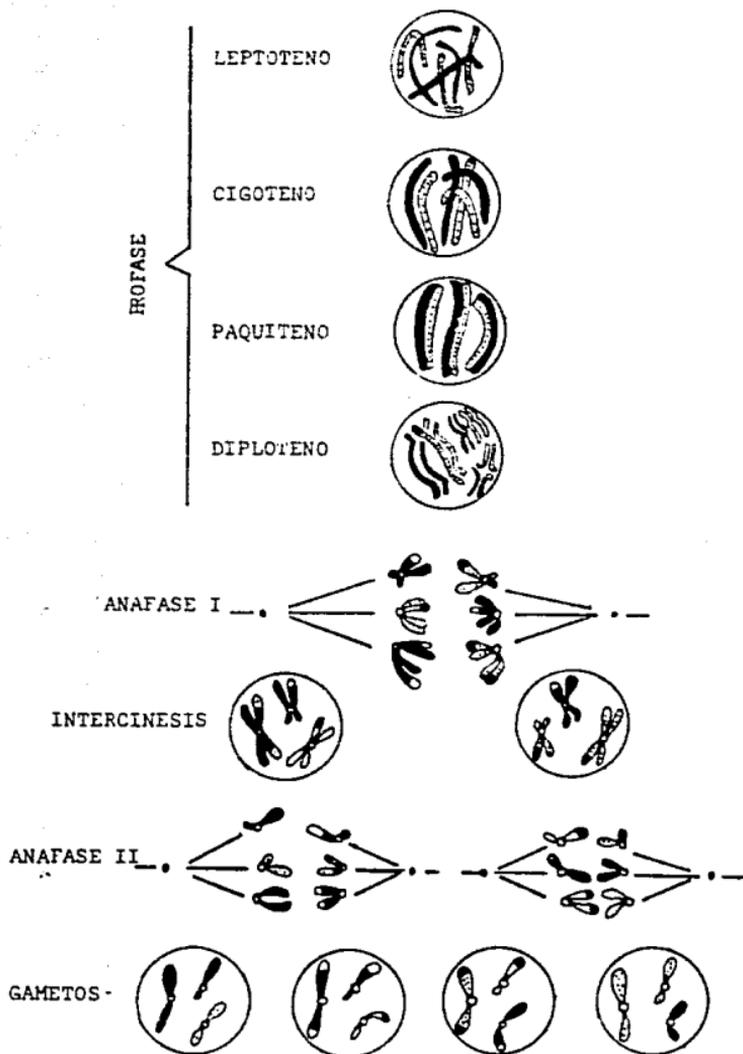


FIG. 5 Esquema general de la meiosis que ilustra la unión, intercambio y separación de los cromosomas .

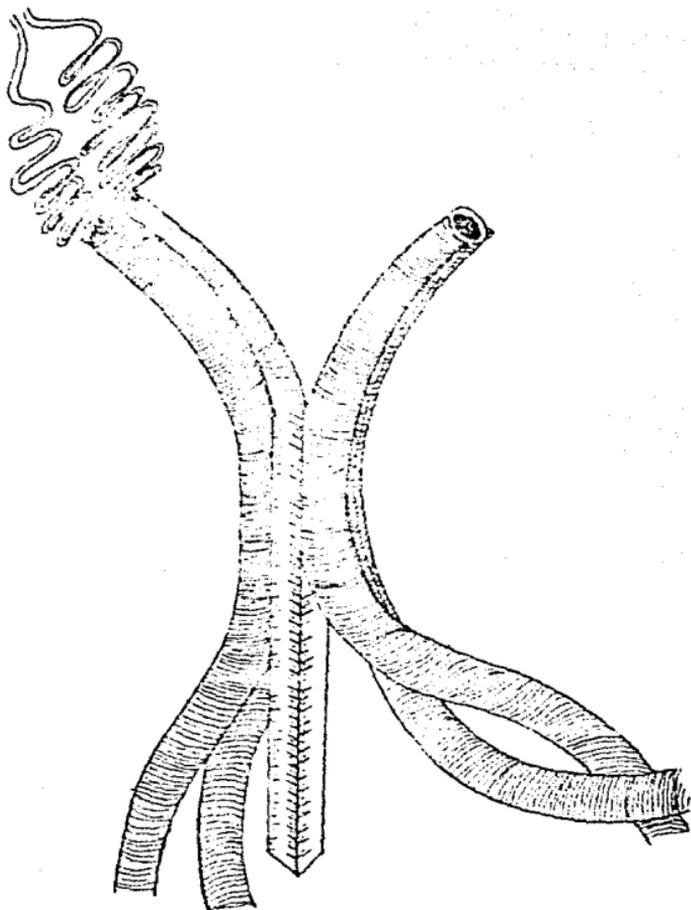


FIG. 6 ESQUEMA TRIDIMENSIONAL DEL COMPLEJO SINAPTONEMICO EN DISTINTOS ESTADIOS DE LA PROFASE MEIOTICA (De Robertis, 1981).

halla en contacto con el componente lateral del Complejo Sinaptonémico. Para explicar esto, se piensa que la unidad de la fibra de los cromosomas forma asas, que sólo en un punto se unen al CS, estos puntos funcionarían en el alineamiento sináptico de los cromosomas. Por lo tanto se supone que la condensación precigoténica es un proceso muy ordenado, que sigue un patrón semejante en ambos homólogos. De esta manera la sinapsis es específica para el correspondiente grupo de genes (22,77).

El apareamiento puede comenzar en cualquier sitio del cromosoma. En algunos casos se unen por sus extremos polarizados y continúan apareándose hacia el otro extremo; en otros casos, la fusión tiene lugar simultáneamente en varios puntos a lo largo del cromosoma. Los dos homólogos no se fusionan durante el apareamiento, puesto que permanecen separados por un espacio de 0.15 a 0.2 micras, mismo que es ocupado por el CS (22,64).

1.6 ESTRUCTURA Y FUNCION DEL COMPLEJO SINAPTONEMICO

El Complejo Sinaptonémico es una estructura protéica tripartita; mediante pruebas bioquímicas e inmunológicas se ha demostrado que está constituido por polipéptidos con pesos moleculares que van desde 30 hasta 100 Kd, mismos que se sintetizan de novo durante la profase meiótica (38,39).

Visto al microscopio electrónico, el CS está formado por dos

elementos laterales (E.L.) y uno central (E.C.), que se forma al aparearse los elementos laterales (fig. 7). Estos últimos varían en diámetro, desde 30 a 65 nm y el elemento central está entre 12 y 50 nm. El ancho total del CS varía entonces entre 160 y 240 nm (75,84).

El elemento central del CS está unido a los laterales por medio de filamentos transversales finos, que sirven para alinear y unir a los cromosomas homólogos, vía los elementos laterales, y para estabilizarlos a una distancia de separación fija. Los filamentos transversales son fibras de proteínas finas (1.5 - 2.0 nm) que se originan en los elementos laterales, tienen una longitud constante y se unen en la región central de modo complejo, donde forman el elemento central junto con material protéico adicional. El Complejo Sinaptonémico se forma probablemente por la auto reunión de proteínas específicas (fig. 7). (39,75).

El ensamble del CS se realiza por etapas y en correlación con los estadios de la profase meiótica, pudiendo describirse de la siguiente manera : 1.- Formación de un brazo proteínico delgado a lo largo de cada cromosoma homólogo (estadio de leptoteno); 2.- Alineamiento de los brazos de los cromosomas homólogos por la formación de filamentos transversales. Dichos brazos se convierten en los elementos laterales del estadio de Cigoteno; 3.- Formación de un elemento central entre los elementos laterales (estadio de

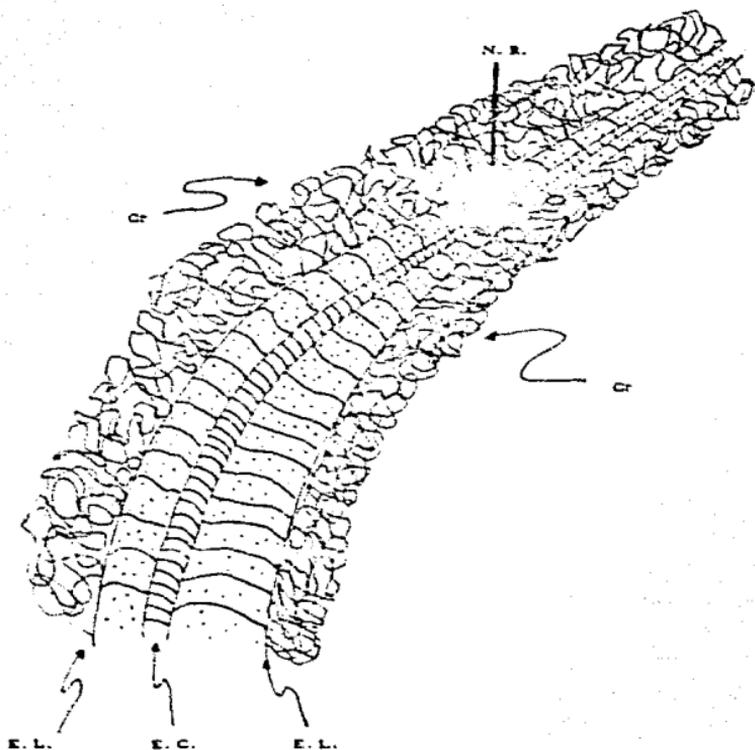


FIG. 7 DIAGRAMA DE UN BIVALENTE PACHITENICO CON COMPLEJO SINAPTONEMICO. N. R. = NODULO DE RECOMBINACION; C = CROMATINA; E. L. = ELEMENTO LATERAL; E. C. = ELEMENTO CENTRAL (Carpenter: A. T. C. 1988).

Cigoteno/Paquiteno). La recombinación probablemente tiene lugar cuando el apareamiento cromosómico se completa (estado de Paquiteno); 4.- Posteriormente, los cromosomas recombinantes se separan y ocurre entonces la desintegración del CS, excepto en los lugares donde se desarrollaron los quiasmas como resultado del entrecruzamiento (38).

Puesto que los quiasmas se originan del CS y de los nódulos de recombinación (probables sitios de recombinación), se ha postulado que el CS forma un armazón estructural alrededor del cual se organiza la cromatina que no está implicada directamente en la recombinación genética. La cual queda detenida en la superficie externa de los elementos laterales. Sólo penetran a través de los mismos, segmentos seleccionados de cromatina (secuencias homólogas de nucleótidos) que entran en el espacio central donde se aparean y recombinan a nivel molecular (apareamiento efectivo), teniendo lugar el intercambio genético (fig. 8),(75,77).

La universalidad de la ocurrencia del Complejo Sinaptonémico en organismos eucariotes, la estabilidad evolutiva de su organización estructural y su papel en la formación de quiasmas, permiten suponer que el CS es una estructura esencial, aunque no única en la recombinación genética (33,54,84).

A partir del descubrimiento y descripción del CS (51) se han

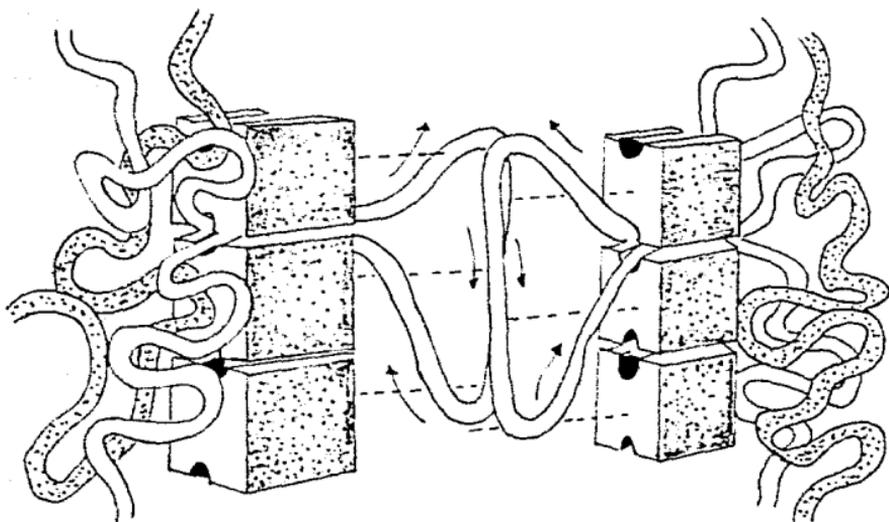


FIG. 8. POSIBLE FUNCIÓN DEL COMPLEJO SINAPTONÉMICO EN LA RECOMBINACIÓN GENÉTICA. DESPUÉS DEL APAREAMIENTO INICIAL, A PARTIR DE LOS CROMOSOMOS HOMÓLOGOS SURGEN LAZOS QUE SE EXTIENDEN HACIA EL ELEMENTO CENTRAL, QUEDANDO ALINEADAS SOLO REGIONES HOMÓLOGAS, OCURRIENDO LA RECOMBINACIÓN MOLECULAR (Wolfe, S., 1977).

realizado numerosos estudios sobre su estructura y función, empleando microscopía de luz y electrónica, los cuales han servido para describir el apareamiento y sinapsis de complementos cromosómicos normales en espermatozoides y ovocitos de varias especies (24,25,29,63,64), así como para caracterizar sinapsis en complementos con translocaciones, inversiones, irregularidades en el par XY y defectos en la segregación cromosómica normal (30,55,58,65,66). También han sido asociadas anomalías en el CS y la presencia de problemas de fertilidad tanto en humanos como en animales experimentales (30,40,44,78). Existen estudios que demuestran que el CS es dañado por agentes de reconocida potencialidad mutagénica, tanto físicos como químicos (fig. 9) por lo que ha últimas fechas el análisis del CS se ha convertido en un ensayo genotóxico sencillo, rápido y sensible, capaz de evidenciar con fidelidad alteraciones tales como defectos de apareamiento de cromosomas homólogos que no son comúnmente detectados mediante pruebas citogenéticas convencionales (análisis de Diacinesis/Metáfase I), (5,11,16,43). Por otro lado, en nuestro país el empleo de técnicas para mostrar al CS como un parámetro para evaluar genotoxicidad no ha recibido atención y prácticamente no se realiza, a pesar de presentarse como una alternativa para dilucidar los efectos mutagénicos en células germinales, producidos por diversos agentes químicos o bien por sustancias tóxicas socialmente aceptadas como lo son las bebidas alcohólicas. Es de interés por tanto, ensayar este tipo de sustancias empleando

los métodos citogenéticos clásicos así como las nuevas metodologías a fin de evaluar el tipo y extensión del daño potencialmente heredable y los mecanismos involucrados en su manifestación.

AGENTE	DOSIS	MICROSCOPIA
MITOMICINA	0.05-5.0 mg/Kg	LUZ Y ELECTRONICA
CICLOFOSFAMIDA	30-300 mg/Kg	LUZ Y ELECTRONICA
m-AMSACRINA	10-25 mg/Kg	LUZ Y ELECTRONICA
VINBLASTINA	0.5-50 μ g	LUZ Y ELECTRONICA
COLCHICINA	0.02-50 μ g	LUZ Y ELECTRONICA
RAYOS γ	5 Gy	ELECTRONICA
RAYOS X	1.5 Gy	LUZ Y ELECTRONICA

FIG. 9 AGENTES QUIMICOS Y FISICOS QUE AFECTAN LA ESTRUCTURA Y MORFOLOGIA DEL COMPLEJO SINAPTONEMICO.

HIPOTESIS DE TRABAJO

Si la ingesta de bebidas alcohólicas provoca trastornos orgánicos y funcionales en testículo, los cuales se pueden manifestar como oligospermia y azoospermia, aunado a su probada genotoxicidad en células somáticas, entonces la administración de una bebida alcohólica a ratones machos podría provocar efectos en las células germinales durante la meiosis, mismos que se reflejarán como alteraciones observables en el Complejo Sinaptonémico, estructura necesaria para el desarrollo normal de la espermatogénesis, evidenciando así, efecto genotóxico y por tanto riesgo genético heredable.

OBJETIVOS

La asociación del consumo de alcohol con fallas reproductivas está bien reconocida, sin embargo cuestiones concernientes al nivel y duración de la exposición requerida para dicha asociación, así como el mecanismo por el cual el alcohol ejerce su efecto tóxico sobre el aparato reproductor permanecen sin resolver; igualmente no existen datos suficientes que permitan una conclusión respecto a la capacidad del alcohol para inducir mutaciones heredables, por tanto, como una contribución al conocimiento de la interacción entre una bebida alcohólica y las células germinales los objetivos de este trabajo son :

a) Determinar las posibles implicaciones citogenéticas del tequila en espermatoцитos de ratón. En particular se observará la morfología del CS de ratones tratados en forma aguda y con dosis subletales.

b) En caso de presentar un efecto positivo, determinar si existe una relación dosis-respuesta.

METODOLOGIA

Se utilizaron 25 ratones machos de la cepa NIH con peso de 25-30 g separados en grupos de 5 ratones cada uno. Los animales se mantuvieron con alimento (Purina) y agua *ad libitum* antes y durante el experimento.

El grupo 1 se consideró como testigo positivo y se administró a cada ratón 150 mg/kg de Ciclofosfamida. A los ratones de los grupos 2, 3 y 4 se les administró 2.1, 4.2 y 8.4 g/kg de tequila respectivamente, dosis que corresponden en el mismo orden a 1/8, 1/4 y 1/2 de la dosis letal media (DL50) que previamente fue determinada en el Laboratorio de Genética de la E.N.C.B. del I.P.N. El grupo 5 comprende a los testigos negativos a los cuales se les inyectó 0.4 ml de agua destilada. Todas las sustancias fueron inoculadas en dosis únicas y por vía intraperitoneal. En los grupos 1,2,3 y 4 tanto la Ciclofosfamida como las dosis de tequila se llevaron hasta un volumen de 0.4 ml con agua destilada.

Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical 5 días después de cada tratamiento y los testículos se extrajeron quirúrgicamente. La obtención de células germinales, así como las preparaciones meióticas se realizaron de acuerdo a las metodologías descritas en otras investigaciones (19,49,65) y que se describe en los siguientes pasos :

Los testículos se depositan sobre un vidrio de reloj y se les retira la túnica albugínea, colocando el material testicular en un vaso de precipitados que contiene 2 ml de solución hipotónica KCl 0.075 M y se dispersa mecánicamente con la ayuda de tijeras de disección. El sobrenadante se recoge con pipeta Pasteur y se coloca en un tubo de centrifuga, repitiendo esta operación 4 ó 5 veces y agregando en cada ocasión 2 ml de la solución hipotónica. Posteriormente, el tubo conteniendo a las células germinales se ponen en una estufa a 37 grados centígrados durante 40 minutos. Pasado este tiempo se centrifuga a 1500 rpm durante 10 minutos, se retira el sobrenadante y el botón celular se resuspende nuevamente en solución de KCl. Este proceso se repite 2 veces más. Hecho lo anterior se procede a fijar las células para lo cual se agrega al botón celular 7 ml de mezcla fresca metanol-ácido acético 3:1, dejando reposar 15 minutos antes de centrifugar durante 10 minutos a 1500 rpm. La operación se repite 2 veces más, retirando en cada ocasión el sobrenadante. Las preparaciones con los espermatozoides se hacen dejando caer sobre un portaobjetos previamente desengrasado 3 gotas del botón celular y se dejan secar al aire.

La impregnación argéntica de las preparaciones se realizó de acuerdo a los protocolos descritos en otros ensayos (14,28,67) con algunas modificaciones introducidas en este trabajo detallándose a continuación el desarrollo de la misma :

Las laminillas se sumergen en una solución amortiguadora de boratos pH 9.0 (con la finalidad de hidrolizar el DNA) y se colocan en una estufa a 60 grados centígrados durante 2 horas. Realizado lo anterior, se lavan profusamente con agua destilada y se secan en una estufa a 37 grados centígrados durante 24 horas. Luego, las laminillas se tratan con 3 gotas de solución $AgNO_3$ al 50 %, se les coloca un cubreobjetos y se exponen a la luz de un reflector eléctrico (super blanca 125 V) durante 30 minutos, tratando de mantener las preparaciones entre 50-60 grados centígrados. El cubreobjetos se retira sumergiendo la laminilla en agua destilada y se deja secar al aire. Enseguida, a cada laminilla se le agregan 6 gotas de plata amoniacal (2 g de $AgNO_3$ disueltos en 2.5 ml de agua destilada + 3.5 ml de NH_4OH), y sobre estas se colocan 3 gotas de formalina (0.9 ml de formaldehído + 30 ml de agua destilada. Neutralizar con acetato de sodio hasta pH 7.0 y añadir ácido fórmico hasta un pH 5.0-6.0), cubriendo rápidamente con un cubreobjetos. en el momento en que la preparación se torna amarillo ámbar (0-60 seg) se sumerge en agua destilada para retirar el cubreobjetos y el exceso de colorante. La laminilla se deja secar al aire. La fig. 10 ilustra el procedimiento antes descrito.

El complejo sinaptonémico se observó empleando microscopia de luz. Se analizaron 30 núcleos paquítenicos por cada ratón, totalizando 750 células. Los espermatoцитos estudiados fueron

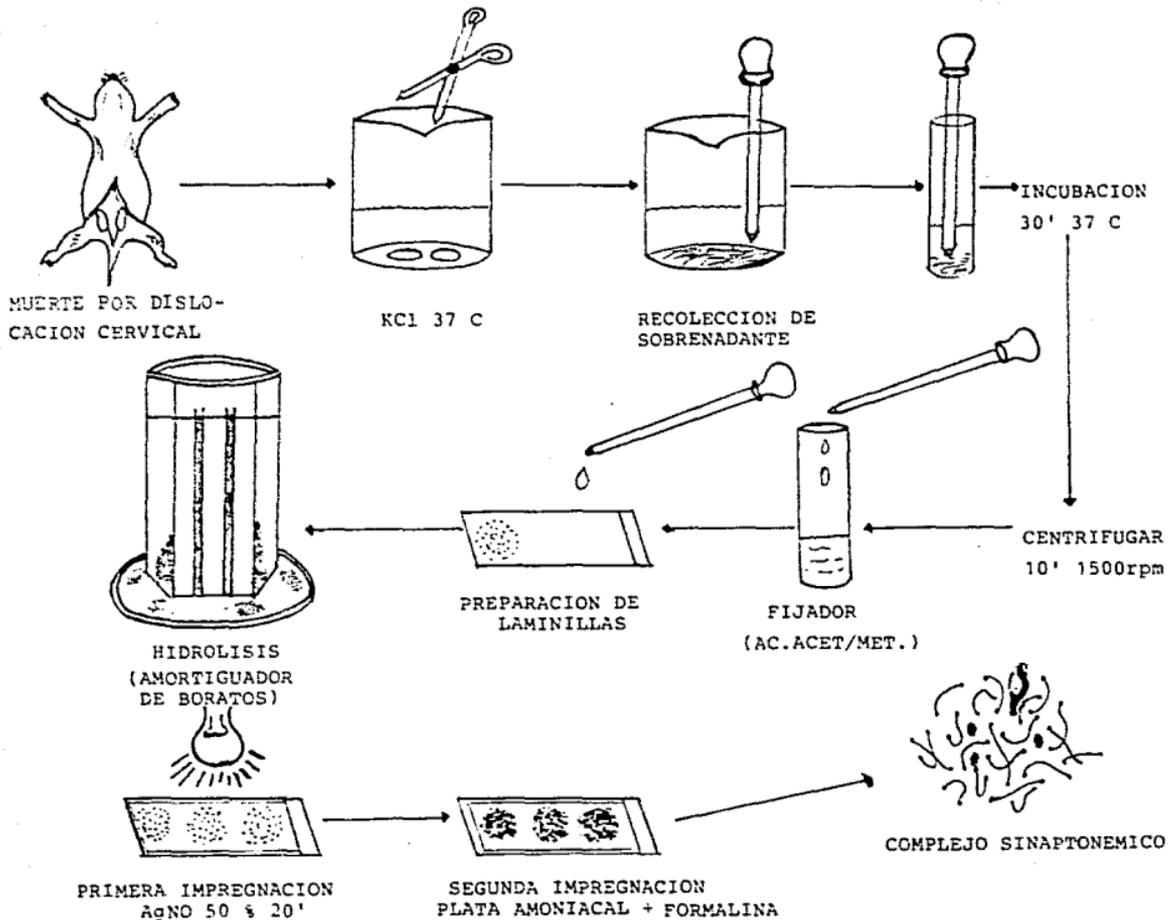


FIG. 10 PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA VISUALIZACION DEL COMPLEJO SINAPTONEMICO.

sólo aquellos representados en el estadio de paputemo III, de acuerdo a la división propuesta por Greenbaum et al. en 1986 (34), la cual se basa en la morfología de diversos componentes nucleares incluyendo configuración, grado de apareamiento y compactación del par XY y de los elementos autosómicos, así como la presencia de nucleolos. Las alteraciones estructurales que fueron registradas y que coinciden con aquellas reportadas previamente por Cawood y Breckon en 1985, Allen et al. en 1987 y Backer et al. en 1988 (16.5.11) fueron las siguientes. A) Desinapsis, B) Rupturas y C) Multiaxiales. (Fig.11).

A) DESINAPSIS: FALLAS EN EL APAREAMIENTO DE LOS ELEMENTOS LATERALES (INTERSTICIAL O TERMINAL).

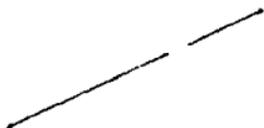


INTERSTICIAL



TERMINAL

B) RUPTURAS: FRAGMENTOS DE COMPLEJO SINAPTONEMICO SOBRE EL MISMO EJE O FUERA DE ESTE.



SOBRE EL EJE



FUERA DEL EJE

C) MULTIAXIALES: EL RESULTADO DE RUPTURA Y REARREGLO O APAREAMIENTO INDEBIDO ENTRE BRAZOS NO HOMOLOGOS



TRIAXIALES



TETRAXIALES

FIG. 11 . ALTERACIONES OBSERVADAS EN COMPLEJO SINAPTONEMICO LUEGO DEL TRATAMIENTO CON TEQUILA.

RESULTADOS

Bajo el microscopio de luz, el Complejo Sinaptonémico tiene la morfología previamente detallada en otras investigaciones, en las que se utilizaron ratones como sistema de prueba y se analizó el subestadio de Paquitenio III (25,28,34). Dichas estructuras se visualizan nitidamente en forma de hebras oscuras consistentes, dispuestas sobre un fondo ámbar claro, la envoltura nuclear, y distribuidos homogéneamente (fig. 12).

En cada núcleo se identifican 19 CS autosómicos y un sexual, que corresponde al par XY. Los primeros se alinean uniformemente y se aprecian en sus extremos puntos que indican los sitios de adhesión a la membrana nuclear. En contraparte, el CS del par sexual se distingue fácilmente por ser en general, más grueso, heteropícnótico positivo y presentar un apareamiento parcial, el cual corresponde a las regiones homólogas en los cromosomas sexuales, además adopta configuraciones muy diversas y está generalmente contenido en la llamada vesícula sexual. Los nucleolos que también se tiñen fuertemente se reconocieron como pequeños cuerpos circulares en número de 2 ó 3 por núcleo. Entre los subestadios celulares que acompañaban a los paquitenos destacaron por su frecuencia las configuraciones cigoténicas.

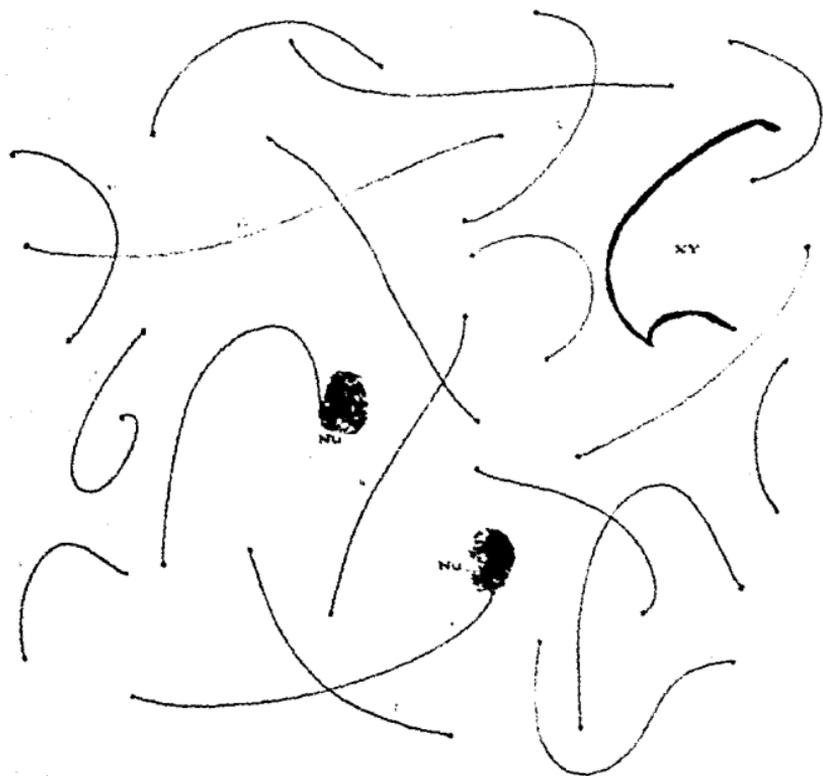


FIG. 12. ESQUEMA DE UN COMPLEMENTO NORMAL DE COMPLEJO SINAPTONEMICO. XY= PAR SEXUAL. NU.= NUCLEOLOS. LOS PUNTOS OSCUROS AL INICIO Y FINAL DE CADA HEBRA SENALAN LOS SITIOS DE ADHESION A LA ENVOLTURA NUCLEAR.

En la tabla No.1 se presentan los resultados del efecto que indujeron sobre el CS tanto la administración de Ciclofosfamida así como las diferentes dosis de tequila. El tratamiento con Ciclofosfamida (150 mg/kg), indujo aumento estadísticamente significativo de los tres tipos de alteraciones estructurales del CS consideradas con respecto al grupo testigo negativo (prueba de Wilcoxon con aproximación normal $\alpha = 0.01$). (45). Este fármaco indujo en mayor cantidad alteraciones cuantificadas como rupturas, en segundo término las configuraciones multiaxiales y finalmente fallas de apareamiento expresadas como desinapsis.

Por otra parte, en la tabla No. 2 se observa que los tratamientos con tequila ejercieron un efecto diferente, ya que la mayor proporción de alteraciones estuvo representada por desinapsis, mientras que las rupturas y configuraciones multiaxiales fueron escasas. La aplicación de la prueba de Kruskal Wallis ($\alpha = 0.01$) demostró que de las alteraciones consideradas, la única que presentó diferencia significativa al compararse con el grupo testigo negativo fue la correspondiente a las desinapsis, pues aunque el tratamiento con 8.4 g/kg incrementó el número de rupturas, éste no alcanzó un nivel de significancia estadística. Se utilizó el análisis de comparaciones múltiples (con un error por tratamiento $\alpha = 0.02$ y un error experimental $\alpha = 0.08$) para determinar a partir de cuál dosis de tequila la frecuencia de desinapsis presentaba diferencia estadística significativa. Con

este análisis se encontró diferencia significativa a partir de la dosis de 4.2 g/kg, en tanto que la siguiente (8.4 g/kg) no difirió significativamente de aquella, por lo que no se corroboró el efecto dosis-respuesta al menos con las concentraciones de tequila utilizadas en el presente experimento.

TABLA No.1 EFECTO DE LA CICLOFOSFAMIDA SOBRE EL COMPLEJO SINAPTONEMICO DE RATONES NIH

TRATAMIENTO	RATONES	CELULOS	DESINAPESIA	RATOSFAL	MULTIAJIALES
T(+) CICLOFOSFAMIDA 150 mg/kg	5	150	15 *	150 *	20 *
T(-) H ₂ O DESTILADA 0.4 ml	5	150	0	5	1

* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA. PRUEBA DE WILCOXON CON $\alpha = 0.01$ vs T(-).

TABLA No. 2 EFECTO DEL TEQUILA SOBRE EL COMPLEJO SINAPTONEMICO EN ESPERMATOCITOS DE RATON NIH

	TESTIGO (-)			2.1 g/Kg			4.2 g/Kg			8.2 g/Kg					
	D	R	M	D	R	M	D	R	M	D	R	M			
r1	0	1	0	r1	1	0	0	r1	4	1	0	r1	10	3	1
r2	1	3	0	r2	1	1	0	r2	10	3	0	r2	11	2	0
r3	1	0	0	r3	0	0	0	r3	10	0	0	r3	8	0	1
r4	1	1	1	r4	1	0	0	r4	2	0	1	r4	7	3	1
r5	0	0	0	r5	0	2	0	r5	5	2	1	r5	9	0	0
TOTAL	3	5	1		3	3	0		31*	6	2		45*	8	3

* = RATON; D = DESINAPSIS; R = RUPTURAS; M = MULTIAJIALES
 P. 01 vs T (-) PRUEBA DE KRUSKAL WALLIS.

DISCUSION

En los animales de reproducción sexual, la fertilidad depende en gran parte de la producción de gametos funcionales. Luego de una serie de mecanismos y rearrreglos cromosómicos complejos, las células germinales basales dan origen a óvulos y espermatozoides, que una vez ocurrida la fecundación forman un nuevo organismo, el cual alcanza toda su potencialidad biológica si las condiciones para su desarrollo y la información genética que porta son óptimas (44).

Sin embargo, en sociedades como la nuestra, la población está expuesta a numerosos agentes químicos presentes en el medio ambiente, que son capaces de producir alteraciones ya sea en el genoma, en el metabolismo de ácidos nucleicos o bien en estructuras accesorias participantes en el proceso meiótico, lo cual puede traducirse en la inducción de abortos repetidos, problemas de fertilidad, enfermedades transmisibles a la progenie y en algunos casos, la muerte del organismo afectado (7,20,87). El argumento anterior justifica la necesidad de contar con metodologías para efectuar ensayos citogenéticos a nivel de células germinales, cuyo objetivo sea detectar sustancias peligrosas para el desarrollo del proceso meiótico normal.

El mejoramiento de las técnicas citogenéticas ha conducido a un mayor conocimiento de la estructura y conducta de los cromosomas mitóticos y meióticos. La introducción de un método de secado al aire para la observación de cromosomas meióticos en mamíferos (27,49) así como el desarrollo de procedimientos de impregnación argéntica que permiten la visualización, mediante microscopía óptica y electrónica del Complejo Sinaptonémico (19,24,25,56) han contribuido a un mejor entendimiento de eventos tales como el apareamiento, entrecruzamiento y segregación cromosómica.

En general para el análisis del Complejo Sinaptonémico se han aplicado dos métodos :1.- Aquellos en que se emplean reconstrucciones tridimensionales de secciones seriadas (50,84) y 2.- El extendimiento en superficie de los espermatocitos (24,25,35). Este último es el más practicado por la facilidad y rapidez con que se logra el análisis de dicha estructura, mismas razones por lo que fue elegida para el desarrollo de la presente, investigación.

La metodología aquí presentada se desarrolló en algunos pasos por ensayo y error, y las modificaciones introducidas sobre la metodología original incluyeron un aumento en el tiempo de hidrólisis al que fueron sometidas las preparaciones, el secado en estufa luego de la misma y un mayor tiempo de exposición bajo la luz del reflector eléctrico durante la primera impregnación.

argentina. Lo anterior contribuyó a montar una metodología reproducible para el estudio del Complejo Sinaptonémico y estructuras acompañantes utilizando un microscopio óptico.

Además de las ventajas ya señaladas, esta metodología permite evaluar el daño inducido en un periodo de tiempo corto ya que solo se requiere que las células dañadas en la última fase S premeiótica avancen a la profase meiótica, pudiéndose analizar una gran cantidad de células cuyos núcleos aparecen intactos y donde el subestadio de Paquiteno se presenta en abundancia (5,6).

La Ciclofosfamida, el fármaco que se empleó en el grupo control positivo, es una droga utilizada ampliamente en el tratamiento de Cáncer y como la mayoría de las drogas que pertenecen al mismo grupo, también es un potente agente tóxico que requiere de activación metabólica para ejercer su acción biológica (10). Es un clastogeno S-dependiente que induce aberraciones cromosómicas estructurales, intercambio de cromátidas hermanas (ICH) y aneuploidias en células germinales de mamífero (7,11). También se ha mostrado su acción sobre el Complejo Sinaptonémico de roedores (5,6,11).

Como se observa en la tabla No. 1, la Ciclofosfamida manifestó su genotoxicidad al incrementar la frecuencia de desinapsis, rupturas y configuraciones multiaxiales. Todas ellas indicadores

de daño a la integridad del CS y su capacidad para formar sinapsis homólogas adecuadas (5,11). Mediante estudios autorradiográficos de cinética de la profase celular en el ratón, se ha sugerido que dichas alteraciones se inducen en la última fase S premeiótica (5). Existen además correlaciones positivas entre las distintas alteraciones provocadas por esta sustancia y alteraciones cromosómicas en Metafase I y II (11), lo cual constituye un importante argumento para interpretar las anomalías al CS como indicadores del daño genotóxico y en otro aspecto, para el uso de la Ciclofosfamida como testigo positivo. Este resultado confirma lo esperado para esta sustancia y demuestran la eficacia del procedimiento usado.

Respecto al etanol, principal componente de las bebidas alcohólicas, también se ha mostrado que presenta actividad mutagénica (59,60,62). Es capaz de inducir mutaciones dominantes letales en algunas especies de roedores, así como aneuploidias (41,59) Existe evidencia, en animales experimentales tratados con etanol del deterioro en la capacidad del espermatozoide para fertilizar a los óvulos y de la producción anormal de espermatozoides (9). Sin embargo, hasta ahora no se había estudiado el efecto en CS de una bebida alcohólica que constituye una compleja mezcla de compuestos. El análisis de los resultados (tabla No. 2) se muestra que dicha bebida indujo principalmente alteraciones en el apareamiento de los elementos laterales del CS mismas que fueron

observadas y cuantificadas como desinapsis y que como su nombre lo indica son regiones en donde no se realizo el evento de sinapsis, o bien, que habiendose realizado, se termina precozmente. En este sentido cabe señalar que en pacientes subfértiles o infértiles se ha observado una alta proporción de desinapsis, estando asociada esta alteración con interrupción del progreso de la gametogénesis (detonamiento meiótico) lo cual se considera consecuencia de una separación cromosómica prematura (40,44). Asimismo, las desinapsis se asocian a errores en la segregación cromosómica normal durante la meiosis. A este respecto Rasmussen y Holm (68) señalan que un prerrequisito fundamental para una adecuada disyunción es la formación completa del bivalente y su conservación hasta la anafase I cuando ocurre su separación física; la no disyunción en anafase I puede ocurrir entonces por fallas en el apareamiento inicial o bien por un error que impide que se conserve esta condición (desinapsis precoz). En consecuencia los resultados obtenidos en esta investigación sugieren la posibilidad de que las desinapsis también se presenten en aquellos pacientes alcohólicos con problemas de fertilidad.

Aunque no se conoce el mecanismo involucrado en este y otros tipos de perturbaciones del CS (5,11), se sabe que el acetaldehído es el primer producto específico de la oxidación del etanol por medio de la enzima alcohol deshidrogenasa, la cual está localizada solamente en el hígado sino también en otros órganos tales como el

ovario y el testículo -células de Leydig, espermatogonias, epitelio de los tubulos seminiferos, células intersticiales y epididimo- (31,59,80). Diversos experimentos han puesto de manifiesto al acetaldehído como un compuesto genotóxico capaz de inducir aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas y aneuploidia (59,69), y no obstante que las bebidas alcohólicas contienen numerosas sustancias algunas de las cuales son potencialmente genotóxicas. los datos experimentales son consistentes en que el acetaldehído es el metabolito genotóxico del etanol (17,59).

En relación al efecto del acetaldehído sobre la función reproductiva, en numerosos trabajos se ha evidenciado la presencia de una ADH funcional en testículo de ratas luego de la ingesta de etanol (59,80). Puesto que esta sustancia alcanza a las gónadas se puede anticipar que el acetaldehído se produce ahí, siendo potencialmente capaz de alterar las células germinales (1,59,62). Si este es el caso. las alteraciones inducidas sobre el CS después de la administración de una dosis subletal de tequila son evidencia de daño en la línea germinal atribuible a la presencia del acetaldehído en el testículo y a su interacción con el origen y/o naturaleza proteica del CS :

A pesar de que no se descarta la acción de otras sustancias tóxicas presentes en el tequila, aquí se proponen dos posibles

explicaciones del incremento de desinapsis observado luego de la administración de dicha bebida alcohólica:

a) El acetaldehído, así como otros aldehídos, actúa interfiriendo las actividades enzimáticas que son esenciales para las funciones del DNA y en experimentos con mamíferos tratados con dosis agudas o crónicas se ha observado una disminución o inhibición de la síntesis de ARN y proteínas (59,62,73,83). Por otra parte se ha demostrado que una pequeña cantidad de síntesis de ADN (0.3-0.4 % del total) ocurre en la profase meiótica; parte de ésta durante el cigoteno temprano y el resto en Paquiteno. Esta síntesis de ADN está implicada claramente en el proceso de apareamiento, asimismo se ha evidenciado que todos los intervalos de la Profase meiótica dependen de la síntesis continua de proteínas, de tal modo que una sustancial inhibición de la misma durante un subestadio resultaría en alteraciones tales como defectos de apareamiento, disminución en el número de quiasmas, disociación precoz del bivalente y disrupción del CS (6,51,71,77).

b) Alternativamente, Sorrell y Tuma (76) proponen que las alteraciones inducidas por el acetaldehído se deben a la reactividad química del mismo y sugieren la formación de productos acetaldehído-proteínas durante la oxidación del etanol, originando principalmente bases de Schiff, que resultan de la reacción del carbón carbonil del acetaldehído con el grupo α -amino de la

Lisina, principal aminoácido que participa en la unión del

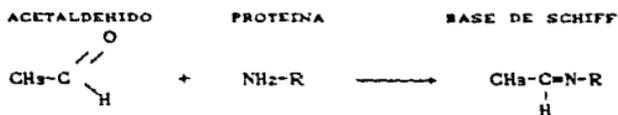


FIG. 13. REACCIÓN ENTRE EL ACETALDEHIDO Y UNA PROTEINA PARA FORMAR UNA BASE DE SCHIFF.

Existe evidencia que sugiere que la actividad biológica de las proteínas que poseen residuos de Lisina son especialmente susceptibles a ser alteradas al interactuar con el acetaldehído. A este respecto ya se ha mencionado que el CS es una estructura proteica sintetizada *de novo* durante la profase meiótica y en cuyos elementos laterales se ha detectado la presencia de proteínas ricas en Lisina (26.53.85) y que la regulación en la formación del CS puede ser alterada por defectos en sus componentes estructurales (77). Allen et al., (6) afirman que los efectos sobre varios elementos asociados con el desarrollo del CS, por ejemplo las proteínas meióticas o bien sobre el metabolismo general pueden promover daño al CS. Así, el daño inducido en la profase relaciona aspectos metabólicos y estructurales alterados lo cual resulta en la pérdida del control genético esencial para la coordinación y realización de un apareamiento cromosómico efectivo. Considerando los fundamentos

anteriores se podría suponer que las alteraciones al CS manifestadas como desinapsis son provocadas por la acción del acetaldelido sobre las proteínas que son los constituyentes principales del CS.

En otra investigación donde con un tratamiento crónico de tegulla no se produjo un incremento en la frecuencia de mutaciones dominantes letales utilizando la misma cepa de ratón (3), se sugirió que el resultado se podría atribuir a la eliminación o reparación de las células dañadas inclusive aun después de ocurrida la fertilización (32). Estos mismos mecanismos también podrían efectuarse durante el largo proceso de la espermatogénesis (11), por lo que es necesario realizar otros estudios en la perspectiva de determinar si el daño inducido en el CS es heredable.

Finalmente, el CS se ha visto como un concomitante morfológico de numerosas actividades metabólicas y reguladoras dirigidas a asegurar la sinapsis, recombinación y segregación adecuada de los cromosomas homólogos. Diversas reacciones de citotoxicidad química pueden converger durante su formación hasta que finalmente el daño se visualiza como una alteración en su morfología normal (7); si tales perturbaciones tienen implicación genéticamente heredable no está aun corroborado como tampoco lo está el hecho de que las bebidas alcohólicas induzcan daño transmisible a la descendencia.

Sin embargo el presente trabajo evidencia que el tequila administrado en dosis altas afecta el patrón de apareamiento normal del CS, lo cual ofrece una posibilidad de riesgo genético para el humano.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES

1.- La técnica para la visualización del Complejo Sinaptonémico con las modificaciones hechas en esta investigación es fácil de montar, relativamente rápida, siendo los resultados reproducibles y por tanto confiables.

2.- La ciclofosfamida, en dosis de 150 mg/kg incrementa significativamente las desinapsis, las rupturas y las configuraciones multiaxiales en el CS.

3.- El tequila no incrementa la frecuencia de configuraciones multiaxiales ni de rupturas, sin embargo el incremento de desinapsis se muestra como evidencia de daño en un estadio particular de la profase meiótica.

4.- Los resultados obtenidos así como el intento por explicar su causa son una alternativa a considerar, sin excluir otras posibilidades, para entender la interacción entre una bebida alcohólica y las células germinales.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Adler, I.D., 1989. The present lack of evidence for unique rodent germ-cell mutagens, *Mutat. Res.*, 212, 55-56.
- 2.- Aguilar, M.A., 1987, Alcoholismo y Vicio o enfermedad ?, *Información Científica y Tecnológica*, 124, 28-31.
- 3.- Aguirre, V.B., Madrigal, E., Chazorro, y Madrigal, G., 1987, Ensayo de dominantes letales en ratones intoxicados con tequila. *Memorias del XI Congreso Nacional de Farmacología*, Tlaxco, Gro. Mex.
- 4.- Ahumada, A.M., *Fisiología y metabolismo del etanol*, En: *Alcoholismo. Visión integral*, Velasco, F.R., Ed. Trillas, Mexico 1988, p. 113-118.
- 5.- Allen J.W De Wesse, G.K., Gibson, J.B., Poorman, F.A., and Moses, M.J., 1987. Synaptonemal complex damage as a measure of chemical mutagen effects on mammalian germ cell, *Mutat. Res.*, 190, 19-24.
- 6.- Allen, J.W., Gibson, J.B., Poorman, F.A., Becker, L.C., and Moses, M.J., 1988. Synaptonemal complex damage induced by clastogenic and antimitotic chemicals: implications for non disjunction and aneuploidy, *Mutat. Res.*, 201, 313-324.
- 7.- Allen, J.W., Liang, J.C., Carrano, A.V., and Preston, J., 1986. Review of literature on chemical-induced aneuploidy in mammalian male germ cells, *Mutat. Res.*, 167, 123-137.
- 8.- Anderson, R.A., Beyler, S.A., and Zanaveld, L.J., 1978, Alterations of male reproduction induced by chronic ingestion of ethanol: development of an animal model, *Fertility and Sterility*, 30, 103-105.
- 9.- Anderson, R.A., Willis, R.R., Oswald, C., and Zanaveld, L.J., 1983. Ethanol-induced male infertility: Impairment of spermatozoa, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 225, 479-486.
- 10.- Au, W., Sokova, C.I., Koppin, E., and Arrighi, F.E., 1980, Cytogenetic toxicity of cyclophosphamide and its metabolites in vitro, *Cytogenet. Cell Genet.*, 26, 109-116.

- 11.- Backer, L.C., Gibson, J.B., Moses, M.J., and Allen, J.W., 1988, Synaptonemal complex damage in relation to meiotic chromosome aberrations after exposure of male mice to ciclophosphamide, *Mutat. Res.*, 203, 317-330.
- 12.- Benavides, G., 1979, Alcoholismo y genética, *Rev. Med. Hosp. Gral.*, 42, 133-135.
- 13.- Berruecos, V.L., El alcoholismo en México: situación actual, En: *Alcoholismo. Visión integral*, Velasco, F.R., Ed. Trillas, Méx., 1988, p. 74-92.
- 14.- Bloom, S.E., and Goodpasture, C., 1976, An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer region in human chromosomes. *Hum. Genet.*, 34, 199-206.
- 15.- Carpenter, T.C.A., thoughts on recombination nodules, meiotic recombination and chiasmata, in: *Genetic recombination*, Kucherlapati, R., and Smith, G.R. (Eds) A.S.M., Washington D.C., 1988, p.529-548.
- 16.- Cawood, A.H., and Breckon, G., 1985, Induced structural changes in chromosomes of the syrian hamster after X-irradiation of spermatogonia: Comparison of dose-response curves derived from synaptonemal complexes and from air-dried preparations of metaphase I, *Mutat. Res.*, 144, 19-21.
- 17.- Cortés, F., Mateos, S., and Escalza, P., 1986, Cytotoxic and genotoxic effects of ethanol and acetaldehyde in root-meristem cells of *Allium cepa*, *Mutat. Res.*, 171, 139-143.
- 18.- Cortinas de Nava, C., Galvan, S.C., y Galindo, C., 1980, El riesgo genético de los compuestos químicos, *Ciencia y Desarrollo*, 31, 200-207.
- 19.- Counce, S.J., and Meyer, G.F., 1973, Differentiation of the Synaptonemal Complex and the kinetochore in *Locusta* spermatocytes studied by whole mount electron microscopy, *Chromosoma*, 44, 231-253.
- 20.- Chandley, A.C., 1979, The chromosomal basis of human infertility, *Brit. Med. Bull.*, 35, 181-186.

- 21.- Chapa, A. M., Alcoholismo y nutrición. En: Alcoholismo. Vision integral, Velasco, F.R., Ed. Trillas, Mexico, 1988, p. 243-257.
- 22.- De Robertis, E., y De Robertis, E.M., Biología celular y molecular, 1981, Ed. El Ateneo, B. A., Argentina, 377-394.
- 23.- Levor, E.J., and Cloninger, C.R., 1989, Genetics of alcoholism Ann. Rev. of Genetics, 23, 19-36.
- 24.- Dietrich, A.J., and Mulder, R.J., 1981, A light microscopic study of the development and behaviour of the synaptonemal complex in spermatocytes of the mouse. Chromosoma, 83, 409-418.
- 25.- Dresser, M., and Moses, M., 1979, Silver staining of synaptonemal complexes in surface spreads for light and electron microscopy, Exp. Cell Res., 121, 416-419.
- 26.- Esponda, F., 1981, El complejo sinaptonémico y la estructura del cromosoma meiótico. P. Boletín Genética 77, 85-123.
- 27.- Evans, E.P., Brackon, G., Ford, C., 1964, An air-drying method for meiotic preparations from mammalian testes, Cytogenetics 3, 289-294.
- 28.- Fletcher, J.M., 1979, Light microscope analysis of meiotic prophase chromosomes by silver staining, Chromosoma, 72, 255-261.
- 29.- Forejt, J., and Goetz, P., 1979, Synaptonemal complexes of mouse and human pachytene chromosomes visualized by silver staining in air-dried preparation, Chromosoma, 73, 255-261.
- 30.- Forejt, J., Gregorová, S., and Goetz, P., 1981, XY pair associate with the synaptonemal complex of autosomal male-sterile translocations in pachytene spermatocytes of the mouse (*Mus musculus*), Chromosoma, 82, 41-53.
- 31.- Gavaler, S.J., and Van thiel, D.H., 1987, Reproductive consequences of alcohol abuse: males and females compared and contrasted, Mutat. Res., 186, 269-277.
- 32.- Generoso, W.M., Cain, K.T., Krishna, M., and Huff, W.S., , Genetic lesions induced by chemicals in spermatozoa and spermatide of mice are repaired in the egg, Proc. Natl. Acad. Sci., 76, 435-437.

- 33.- Gillies, C.B., 1975. Synaptonemal complex and chromosome structure, *Ann. Rev. Genet.*, 9, 91-109.
- 34.- Greenbaum, I.F., Hale, D.W., and Fuxa, K.P., 1986, The mechanism of autosomal synapsis and the subtaging of zigonema and pachynema from deer mouse spermatocytes, *Chromosoma*, 93, 203-212
- 35.- Guitart, M., Coll, M., Ponsa, M., and Egozcue, J., 1985, Sequential study of synaptonemal complexes in mouse spermatocytes by light and electron microscopy, *Genetica*, 67, 21-30.
- 36.- Hayes, S., 1985, Ethanol- induced genotoxicity, *Mutat. Res.*, 143, 23-27.
- 37.- Herrera, N., 1987, ¿ Bebedor o alcohólico ?, *Información Científica y Tecnológica*, Vol. 9, 124, 23-26.
- 38.- Heyting, C., Dettmers, R.J., Dietrich, A.J., Redeker, E.J., and Vink, A., 1988. Two major components of synaptonemal complexes are specific for meiotic prophase nuclei, *Chromosoma*, 96, 325-332.
- 39.- Heyting, C., and Dietrich, A.J., 1989. Synaptonemal complex proteins, *Genoma*, 31, 81-87.
- 40.- Hulten, M., Solari, A.J., and Skakkebaek, N., 1974, Abnormal synaptonemal complex in an oligochiasmatic man with spermatogenic arrest, *Hereditas*, 78, 105-116.
- 41.- I.C.P.E.M.C., 1987, Conclusions on the genotoxicity of alcohol and recommendations for further work, *Mutat. Res.*, 186, 175-176
- 42.- Jurado, G., Efectos del etanol en el proceso de la reproducción humana, en: *Alcoholismo. Visión integral*, Velasco, F., Ed. trillas. Méx., 1988, p. 226-242.
- 43.- Kalikinskaya, E., Kolomiets, O., Shevchenko, V., and Bogdanov, Y., 1986, Chromosome aberrations in F₁ from irradiated male mice studied by their synaptonemal complexes, *Mutat. Res.* 174, 59-65.
- 44.- Koulischer, L., Schuysman, R., et Gillerot, Y., 1982, Chromosomes meiotiques et infertilité masculine: évaluation des résultats *J. Genet. Hum.*, 30, No. 2, 81-89.

- 45.- Leach, C.. Fundamentos de estadística. enfoque no paramétrico para ciencias sociales. Ed. Limusa. Mex., 1982, p. 77-141, 199-223.
- 46.- Liang, J., and Pacchierotti, F., 1988. Cytogenetic investigation of chemically-induced aneuploidy in mouse spermatocytes, *Mutat. Res.*, 201, 325-335.
- 47.- Lieber, C., Baraona, E., Leo, M., and Garro, A., 1987. Metabolism and metabolic effects of ethanol. including interaction with drugs, carcinogens and nutrition, *Mutat. Res.*, 186, 201-203.
- 48.- Madrigal, B.E., Rosas, A., Ramos, C., Rosas, E., and Diaz Barriga, S. 1990, Mouse bone marrow cytogenetic damage produced by residues of tequila. *Mutat. Res.*, 241, 133-137.
- 49.- Meredith, R., 1969, A simple method for preparing meiotic chromosomes from mammalian testis. *Chromosoma*, 28, 254-258.
- 50.- Moens, P.B., 1974. Quantitative electron microscopy of chromosome organization at meiotic prophase, *Cold Spring Harbor Symp. Quant.*, 38, 99-107.
- 51.- Monesi, V., 1965. Synthetic activities during spermatogenesis in the mouse, *Exp. Cell Res.*, 39, 197-224.
- 52.- Moses, M.J., 1956, Synaptonemal Complexes. *Biophys. Biochem. Cytol.*, 2, 215-218.
- 53.- Moses, M.J., 1968, Synaptonemal complex *Ann. Rev. Genet.*, 2 363-412.
- 54.- Moses, M.J., 1979, The synaptonemal complex as a indicator of chromosomal damage, *Genetics*, 92s, 73-82.
- 55.- Moses, M.J., and Poorman, P.A., 1981, Synaptonemal complex analysis of mouse chromosomal rearrangements. II Synaptic adjustment in a tandem duplication, *Chromosoma*, 81, 519-535.
- 56.- Moutschen, J., Introduction to genetic toxicology, John Wiley and sons (Eds), 1985, Great Britain. p. 1-16.
- 57.- Navarro, J., Vidal, F., Guitart, M., and Egozcue, J., 1981, A method for the sequential study of synaptonemal complexes by light and electron microscopy, *Human Genet.*, 59, 419-421.

- 58.- Navarro, J., Vidal, F., Templado, C., Benet, J., Pomerol, J.M., Marina, S., and Egozcue, J., 1986, A new synaptic anomaly: irregular synaptonemal complexes, *Human Genet.*, 72, 272-274.
- 59.- Obe, G., and Anderson, D., 1987, Genetic effects of ethanol, *Mutat. Res.*, 186, 177-200.
- 60.- Obe, G., and Herha, J., 1975, Chromosomal damage in chronic alcohol users, *Humangenetik*, 29, 191-200.
- 61.- Obe, G., and Ristow, H., 1977, Acetaldehyde but not alcohol induces sister chromatid exchanges in chinese hamsters cells in vitro, *Mutat. Res.*, 56, 211-213.
- 62.- Obe, G., and Ristow H., 1979, Mutagenic, Carcinogenic and teratogenic effects of alcohol, *Mutat. Res.*, 65, 229-259.
- 63.- Pathak, S., and Hsu, T.C., 1979, Silver-stained structures in mammalian meiotic prophase, *Chromosoma*, 70, 195-203.
- 64.- Pathak, S., Lau, Y., and Drwga, H., 1979, Observations on the synaptonemal complex in armenian hamster spermatocytes by light microscopy, *Chromosoma*, 73, 53-60.
- 65.- Poorman, P., Moses, M., Russell, L.B., and Cacheiro, N., 1981, Synaptonemal complex analysis of mouse chromosomal rearrangements. I Cytogenetic observations on a tandem duplication, *Chromosoma*, 81, 507-518.
- 66.- Poorman, P., Moses, M., Davison, M., and Roderick, T., 1981, Synaptonemal complex analysis of mouse chromosomal rearrangements. III Cytogenetic observations on two paracentric inversions, *Chromosoma*, 83, 419-429.
- 67.- Quack, B., and Noel, B., 1977, The XY chromosome pair in mouse and human spermatocytes, visualized by silver staining, *Nature*, 267, 431-433.
- 68.- Rasmussen, S.W., and Holm, P.E., 1980, Mechanics of meiosis, *Hereditas*, 93, 187-216.
- 69.- Ristow, H., and Obe, G., 1978, Acetaldehyde induces cross-link in DNA and causes sister chromatid exchange in human cells, *Mutat. Res.*, 59, 115-119.

- 70.- Rivera,C.J., 1988, Los agaves mazcaleros en México. Tierra de maqueyes. Información Científica y Tecnológica, Vol.10, 147, 5-8.
- 71.- Roth.T., and Ito.M., 1967, DNA dependent formation of the synaptonemal complex at meiotic prophase, J. Cell Biol., 35, 247-255.
- 72.- Rothschild.M., Gratz.M., and Schreiber,S., 1987, Effects of ethanol on protein synthesis, Ann. N.Y. Acad. Sci., 492, 233-244.
- 73.- Rubin,E., 1987, Preface, In: Alcohol and the cell, Ann. N.Y. Acad. Sci., 492.
- 74.- Russell,L.B., and Shelby,M.D., 1985, Test for heritable genetic damage and for evidence of gonadal exposure in mammals , Mutat. Res., 154, 69-84.
- 75.- Solari,A.J, and Moses,M., 1973, The structure of the central region in the synaptonemal complexes of hamster and cricket spermatocytes , J. Cell Biol., 56, 145-152.
- 76.- Sorrell,M., and Tuma,D., 1987, The functional implications of acetaldehyde binding to cell constituents, Ann. N.Y. Acad. Sci., 492, 50-60.
- 77.- Stern,H., and Hotta,Y., 1973, Biochemical control of meiosis, Ann. Rev. Genet., 7, 37-66.
- 78.- Templado,C.,Vidal,F.,Marina,S., and Egozcue, 1984, Meiotic studies and synaptonemal complex analysis in two infertile males with a 13/14 balanced translocation, Hum. Genet.,67 162-165.
- 79.- Van Thiel, D., Gavaler, J., and Lester, R., 1974. Ethanol inhibition of vitamin A metabolism in the testes: possible mechanism for sterility in alcoholics, Science, 186, 941-942.
- 80.- Van Thiel,D.,Gavaler,J.,Rosenblum,E., and Eagon,P., 1987, Effects of ethanol on endocrine cells: Testicular effects, Ann. N.Y. Acad. Sci., 492, 287-302.
- 81.- Velasco,F.R., Esa enfermedad llamada alcoholismo, Ed. Trillas Méx., 1984, p. 11-30.

- 82.- Velasco, F.R., El abuso del alcohol: sus causas, en: Alcoholismo. Visión integral, Velasco, F.R., Ed. Trillas, Mex., 1986, p. 17-38.
- 83.- Volentine, G.D., Tuma, D.J., and Sorrell, M.F., 1984, Acute effects of ethanol on hepatic glycoprotein secretion in the rat in vivo, Gastroenterology, Vol. 86, No. 2, 225-229.
- 84.- von Wettstein, D., Rasmussen, S.W., Holm, P.B., 1984, The synaptonemal complex in genetic segregation, Ann. Rev. Genet. 18, 331-413.
- 85.- Westergaard, M., and von Wettstein, D., 1972, The synaptonemal complex, Ann. Rev. Genet. 6, 71-110.
- 86.- Wolfe, S.L., Biología de la célula, Ed. Omega, Barcelona, 1977 p. 389-438.
- 87.- Zimmermann, F., 1988, Chromosomal malsegregation and aneuploidy Mutat. Res., 201, 253-259.