

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



**GENOTOXICIDAD DEL ARSENICO. EFECTOS SOBRE CELULAS GERMINALES
EN RATON MACHO**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

BIOLOGO

p r e s e n t a :

MA. ALICIA VILLELA GONZALEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

R E S U M E N

El empleo de modelos animales para evaluar los riesgos para el ser humano derivados de la exposición a sustancias químicas potencialmente tóxicas es una práctica común. Es así que el empleo de la prueba para determinar anomalías en la morfología del espermatozoide ha sido incorporada entre los sistemas para detectar agentes genotóxicos.

En el presente estudio se empleó el análisis de la morfología del espermatozoide para evaluar el efecto del arsenito de sodio en células germinales de ratón. El interés en valorar la capacidad del arsénico de provocar daño en células reproductoras, deriva del hecho de existir una zona en la Comarca Lagunera de Durango y Torreón en la que poblaciones humanas se encuentran expuestas de manera continua a concentraciones elevadas de arsénico en el agua. Se sospecha que ello, además de provocar las alteraciones vasculares descritas en el arsenicismo crónico y favorecer el desarrollo de cáncer, puede también constituir un riesgo reproductivo.

Los resultados de este estudio señalan que el arsénico en forma de arsenito de sodio, al ser administrado por vía intraperitoneal a ratones macho provoca: una elevación en la frecuencia de anomalías de la morfología del espermatozoide, y alteraciones en la cuenta espermática a dosis altas.

O B J E T I V O S

Debido a que el aumento en el número de anomalías de los espermatozoides han tenido resultados positivos en la indentificación de diversos agentes tanto carcinógenos como de mutágenos (Wyrobek, et al,1983). Se ha señalado el uso de la misma por tener como ventaja su bajo costo y sencillez de manejo.

Se consideró por lo tanto adecuado utilizar esta prueba con el objetivo de evaluar el efecto genotóxico del arsénico en forma de Na_3As sobre las células germinales de ratón; como un indicador del riesgo asociado a la exposición de este metaloide que en ciertas regiones del país constituye uno de los principales contaminantes del agua y del aire.

Objetivos específicos son:

- 1.- Determinar el efecto de diferentes dosis de arsénico en un rango que comprende desde concentraciones que se encuentran dentro de los límites permisibles hasta una dosis cercana a la dosis letal media, en un régimen de dosificación subcrónica.
- 2.- Determinar las curvas dosis-respuesta para valorar la posible genotoxicidad de diferentes dosis de arsénico que se encuentren entre los límites permisibles hasta una dosis menor de la dosis letal media

GENERALIDADES SOBRE EL ARSENICO

Es un elemento que se encuentra en la naturaleza en diferentes estados: ya sea libre o combinado en un gran número de minerales. El arsénico inorgánico forma sales tri y penta valentes; mientras que el arsénico orgánico forma compuestos metilados.

Se encuentra como componente de los minerales sulfídicos, así como en asociación con el cobre, cobalto y níquel. En los procesos de fundición de los minerales citados existe liberación del arsénico al medio ambiente.

El trióxido de arsénico (AsO_3), es la forma toxicológicamente más activa de los derivados arsenicales, su aspecto es blanquecino y es muy soluble en agua.

El arsénico pentavalente o pentóxido de arsénico (As_2O_5) es el producto de la oxidación del trióxido (equilibrio redox), se obtiene también por la oxidación del ácido nitroso. Es altamente soluble en agua.

La estabilidad de los estados de óxido-reducción del arsénico en solución dependen de las características del medio. Un medio oxigenado y un pH alto favorecen a la forma pentavalente mientras que la acidificación del medio favorece el estado trivalente.

La arsina (AsH_3) es el más potente de los venenos arsenicales; es un gas con una actividad hemolítica intensa.

El arsénico mono y dimetilado se producen a partir de

procesos de biotransformación de los diferentes organismos, aunque la proporción de uno y otro puede variar entre especies animales y el hombre.

Durante los procesos de fundición a alta temperatura en los que se liberan los vapores y las pequeñas partículas de arsénico constituyen un riesgo para la salud del trabajador expuesto, ya que por su tamaño y solubilidad se inhalan y depositan en las partes profundas del tracto respiratorio.

La fundición de metales no ferrosos, el uso de fungicidas y herbicidas a base de arsénico y la manufactura del vidrio constituyen los principales liberadores del arsénico al medio ambiente (se calculan 10,000 toneladas anuales, el 50% provienen de fundiciones, 32% de pesticidas y fungicidas, y la manufactura del vidrio en un 70%). El arsénico proveniente de fuentes antropogénicas se dispersa en la atmósfera, -- mientras que disuelto en el agua se puede transferir a otros sedimentos. Su ciclo y transformación químico-biológica se presenta en varios compartimentos del medio ambiente.

El arsénico trivalente en la atmósfera o en las superficies acuosas puede oxidarse a su forma pentavalente, mientras que la forma pentavalente en presencia de material oxidable reacciona reduciéndose a la forma trivalente.

La transformación biológica del arsénico se lleva a cabo en bacterias sedimentarias y algas marinas. La reducción y la metilación de las formas inorgánicas del arsénico se llevan a cabo en grandes extensiones de los suelos.

Normalmente, el arsénico en el aire se adhiere fácilmente a las partículas sólidas, de ahí que en las inmediaciones de las áreas de fundición de metales, se llega a encontrar arsénico hasta 2 ó 3 km del sitio de emisión.

En los suelos no contaminados la concentración de arsénico es de 0.2 -4.0 mg/kg en tanto que en los contaminados - la concentración puede llegar a 500 mg/kg o más.

En el agua potable el nivel máximo permisible de arsénico es de 50 ppb (0.05 mg/l). Existen regiones en la tierra - que por sus características biogeoquímicas, presentan elevadas concentraciones de arsénico en los suelos y en el agua - como en los casos de Córdoba, Argentina, Torreón, México y - Chile en donde la concentración del arsénico en el agua es de 4-6 mg/l y en los suelos llegó hasta 20 mg/kg.

La principal ruta de absorción del arsénico en la población en general es la vía respiratoria y la gastrointestinal. Otra vía de exposición aunque menos importante es la piel.

El 40% del arsénico inhalado se deposita en los pulmones donde sólo el 75%-85% se absorbe lentamente durante varios días. Una fracción de arsénico se puede excretar rápidamente por la orina en tanto que una pequeña fracción se excreta lentamente iniciándose la excreción entre de 2 a 8 horas después de la exposición y requiriéndose de unos 10 días para eliminar el total administrado, lo que explica su actividad tóxica acumulativa.

El arsénico se distribuye entre los distintos comparti-

mentos corporales. El patrón de distribución es importante en relación a los efectos observados.

Los efectos tóxicos del arsénico han sido estudiados en el hombre, animales y en otros organismos sin embargo, se han encontrado inconsistencias en sus efectos en las diferentes especies, sobre todo en lo que se refiere a su capacidad de inducir cáncer.

La toxicidad crónica por el arsénico en el hombre produce una gran variedad de signos y síntomas, los primeros consisten en: Anorexia, debilidad, diarrea, constipación, náuseas y vómito, a medida que la intoxicación se incrementa los síntomas son más severos como edema selectivo especialmente de los párpados y lo tobillos, hiperpigmentación de la piel e hiperqueratosis, dermatitis exfoliativa, alopecia, etc. Además puede desarrollarse cáncer epidermoide.

Los efectos teratogénicos del arsénico han sido probados en hamster dorado, ratón, etc.; provoca principalmente malformaciones en tejidos blandos y defectos oculares.

La toxicidad aguda y crónica de este metal depende en cierta forma del estado físico-químico en que se encuentre. El trivalente inorgánico es más tóxico que el pentavalente.

Una vez en el organismo el arsénico se encuentra principalmente en: hígado, bazo, pulmón, y se deposita en mayor grado en riñón, hígado, pelo, uñas, piel y huesos. En el pelo se puede llegar a fijar durante muchos años.

Los síntomas agudos de intoxicación por arsénico en humanos se traducen en daño gastrointestinal severo, vómito, diarrea y problemas vasculares; llegando incluso a ocasionar la muerte (Holland, 1904, Done Peart, 1971). La sintomatología aguda asociada a la exposición a arsénico en el aire; se manifiesta en una severa irritación de la mucosa nasal, laringe y bronquios (Holmquist, 1951; Pinto McGill, 1953), también se han descrito efectos reversibles en los sistemas hematopoyético y vascular, así como alteraciones en los nervios periféricos.

En los animales de experimentación la dosis letal media (LD_{50}) varía en diferentes especies animales estando comprendida entre LD_{50} 45 mg/kg por vía oral en rata para trióxido de arsénico; LD_{50} 6 mg/kg para conejo y la L_{75} 14-18 mg/kg para el arsenato de sodio por vía intraperitoneal en ratones.

Los efectos observados en animales después de la exposición al arsénico son similares a los observados en la intoxicación en el humano en lo que se refiere a: gastroenteritis, diarrea y efectos cardiovasculares (Nelson, et al, 1971).

El arsénico trivalente se excreta más lentamente que el pentavalente y se combina más fuertemente en los tejidos.

1.- IMPORTANCIA DE LA MUTACION

A través de la evolución biológica, se han desarrollado diversos mecanismos que determinan las características propias de los organismos de cada especie. La recombinación génica, la mutación génica y los cambios ocurridos en la estructura y en el número de los cromosomas contribuyen a la variabilidad genética de los organismos. Por su parte, la selección natural y el aislamiento reproductivo constituyen los elementos necesarios para la adaptación. Ninguno de estos procesos es más importante que otro, ya que a través de la evolución su interrelación ha permitido el establecimiento de las especies, adecuadas perfectamente al medio ambiente a lo largo de miles y millones de años (G.L. Stebbins, - 1978).

Los mecanismos descritos anteriormente constituyen uno de los pilares fundamentales del concepto que engloba la Teoría Sintética Moderna de la Evolución.

En particular, en lo que se refiere a las mutaciones, éstas han sido objeto de estudio en las últimas décadas por la trascendencia que representa la posibilidad de inducir alteraciones en el contenido genético de las especies. Sin embargo, durante mucho tiempo se pensó que sólo podían presentarse en forma espontánea, hasta que H.J. Muller (1927), demostró que podían inducirse al exponer a moscas de la fruta (*Drosophila melanogaster*) a los rayos X; encontrándose que las mutaciones que se evidenciaban en las generaciones

posteriores, presentaban una frecuencia que rebasaba hasta en 150 veces la frecuencia de mutación espontánea.

Posteriormente, Auerbach y Robson (1944) experimentalmente produjeron mutaciones al tratar a moscas de la fruta con una sustancia química (gas mostaza); lo que marcó el inicio de las investigaciones en mutagénesis por efecto de sustancias químicas.

En la actualidad, a nivel mundial, la probabilidad de exposición del humano a compuestos químicos ha aumentado debido al proceso de desarrollo e industrialización proporcionados por el avance de la ciencia y la tecnología.

Hasta el momento se han identificado alrededor de 4×10^6 sustancias, de las cuales cerca de 70,000 se producen y se utilizan en la vida cotidiana. Además, alrededor de 1000 compuestos nuevos con usos muy variados como aditivos para alimentos, drogas, cosméticos, etc. se introducen anualmente al mercado mundial.

La posibilidad de que algunas de estas sustancias puedan interactuar con el ADN de las células somáticas y sexuales produciendo mutaciones que permitan el desarrollo de ciertos tipos de cáncer, o que influyan en la frecuencia de padecimientos genéticos, ha dado lugar al desarrollo de investigaciones tendientes a evaluar el impacto ocasionado por los contaminantes químicos en el hombre.

Entre los propósitos generales que persiguen los diferentes grupos de investigación en esta área se encuentran:

- 1.- Determinar cualitativa y cuantitativamente la presencia de sustancias mutagónicas en el ambiente.
- 2.- Contribuir al análisis de la relación entre el riesgo y el beneficio que presenta cada compuesto químico para el control en su producción y consumo.
- 3.- Determinar el efecto genotóxico de las sustancias de mayor difusión en el ambiente y consumo, así como, de sus productos secundarios.

2.- GENERALIDADES SOBRE LOS SISTEMAS DE PRUEBA

Durante los últimos años, se han desarrollado pruebas de corta duración con el fin de establecer el posible riesgo de la exposición a sustancias químicas genotóxicas y evitar la actividad mutagénica y clastogénica de las mismas. Algunos de estos sistemas de corta duración incluyen: ADN aislado, bacterias, levaduras, hongos, plantas, insectos, células de mamífero en cultivo, linfocitos y mamíferos completos. Ninguno de los sistemas es infalible por sí sólo para determinar el riesgo de los agentes, ya que la susceptibilidad de los modelos biológicos a ciertos compuestos y la posible especificidad de las mutaciones inducidas por los compuestos difieren e indican la necesidad de utilizar una batería de pruebas (Committee 17, 1975) en las que se emplean una variedad de organismos.

En la tabla 1 se muestran algunos de los sistemas de prueba que más se utilizan en los laboratorios. Los requisitos que deben llenar las baterías de pruebas de corta duración son:

- A).- Contar con sistemas de prueba que evalúen la capacidad de las sustancias para inducir mutaciones génicas y alteraciones cromosómicas tanto en células somáticas como en germinales.
- B).- Los costos y el tiempo requerido para llevar a cabo la prueba deben ser económicamente aceptables.

T A B L A I

CARACTERISTICAS DE LOS SISTEMAS
BIOLOGICOS PARA IDENTIFICAR MUTAGENOS⁶,

SISTEMA	ALTERACION IDENTIFICADA	DURACION APROX. DE UNA PRUEBA.	FACTORES LIMITANTES
ADN	CAMBIOS DE LA MOLECULA	2 a 3 DIAS	COSTO DEL EQUIPO
VIRUS	MUTACIONES GENICAS INDUCCION DE PROFAGOS	2 a 3 DIAS	MINIMOS
BACTERIAS	MUTACIONES GENICAS	3 a 5 DIAS	MINIMOS
HONGOS	MUTACIONES GENICAS SEGREGACION CROMOSOMICA DEFECTUOSA.	1 a 3 SEMANAS	MINIMOS
ENSAYO VIA HOSPEDERO CON BACTERIAS, HONGOS Y CULTIVO DEL. DE MAMIFERO.	LAS CITADAS EN CADA UNO DE LOS ANTERIORES.	1 a 5 SEMANAS	REQUERIMIENTO DE BIOTERIO
PLANTAS	MUTACIONES GENICAS, ALTERACIONES CROMOSOMICAS, NUMERICAS Y ESTRUCTURALES.	1 a 5 SEMANAS	MINIMOS
INSECTOS	MUTACIONES GENICAS, ALTERACIONES CROMOSOMICAS, NUMERICAS Y ESTRUCTURALES.	2 a 7 SEMANAS	MINIMOS
CULTIVO DE CELULAS DE MAMIFERO.	MUTACIONES GENICAS, ALTERACIONES CROMOSOMICAS, NUMERICAS Y ESTRUCTURALES.	2 a 5 SEMANAS	COSTO ALTO DE MATERIAL Y DEL EQUIPO. USO DE TECNICAS LABORIOSAS.(MUTACIONES GENICAS), INTERPRETACION CITOGENETICA.
MAMIFEROS	MUTACIONES GENICAS, ALTERACIONES CROMOSOMICAS, NUMERICAS Y ESTRUCTURALES. TRANSMISION DE MUTACIONES A LOS DESCENDIENTES.	2 a 7 MESES	COSTO ALTO DE INVESTIGACION EN ALGUNAS PRUEBAS, REQUERIMIENTO DE BIOTERIO.
HUMANOS	C E SOMATICAS L U L GERMINALES A S ALTERACIONES CROMOSOMICAS NUMERICAS Y ESTRUCTURALES. CROMOSOMA "Y" EN EXCESO. TRANSMISION DE MUTACIONES A LOS DESCENDIENTES.	6 SEMANAS 1 a 2 AÑOS	CONTROL DE OTRAS VARIABLES OBTENCION DE DONADORES, - PROBLEMAS ETICOS. NECESIDAD DE ESTUDIOS EPIDEMIOLOGICOS.

C).- Los resultados obtenidos deben ser reproducibles en diferentes experimentos y laboratorios.

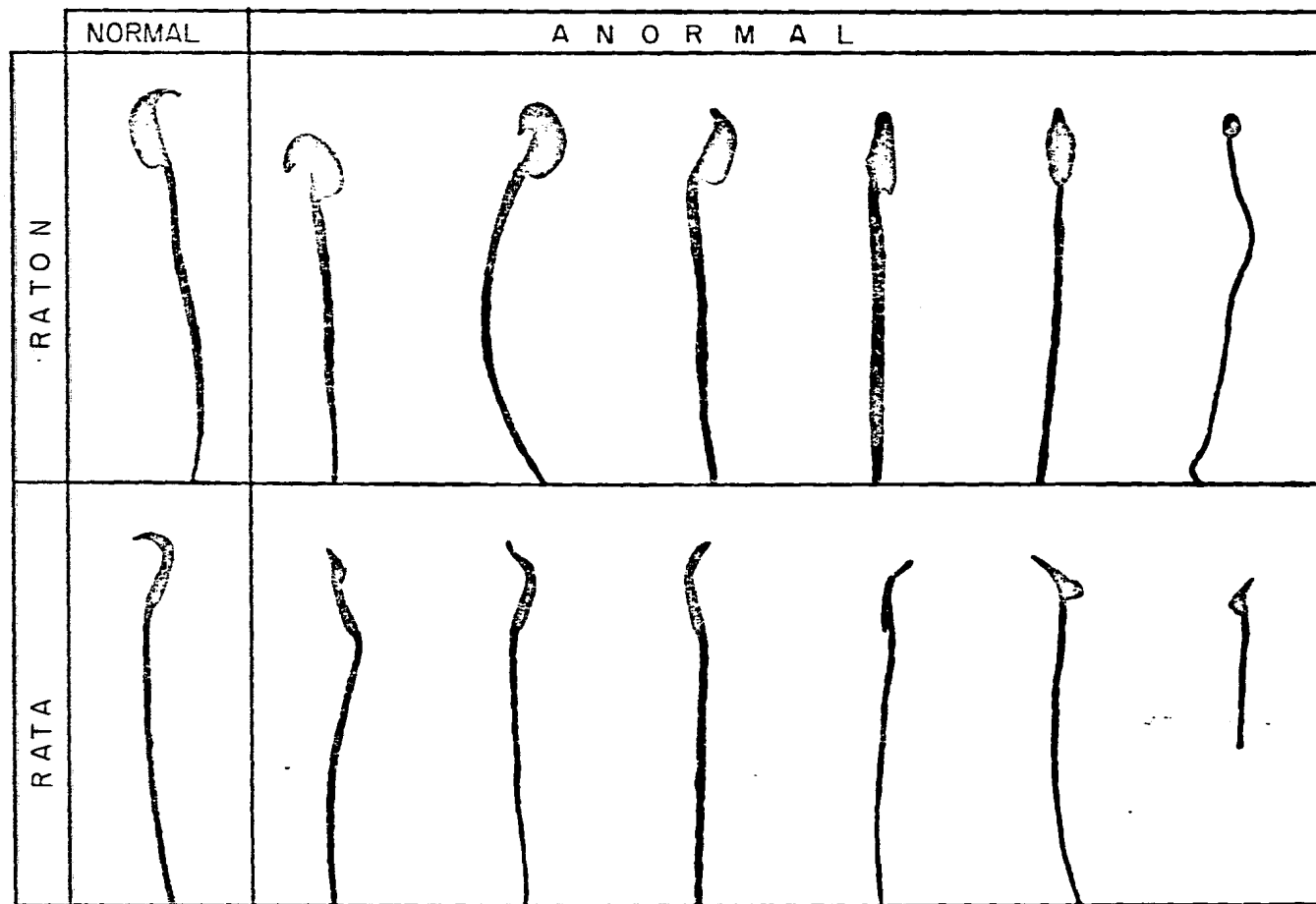
D).- Se debe establecer una relación dosis-respuesta para los compuestos probados.

3.- ANTECEDENTES DE LA PRUEBA DE INDUCCION DE ANOMALIAS EN LA MORFOLOGIA DEL ESPERMATOZOIDE DE RATON

Los sistemas de prueba que más se utilizan en mamíferos en la valoración de mutaciones génicas (locus específico) y de aberraciones cromosómicas en células germinales (dominantes letales, translocaciones heredables) requieren de un gran número de animales y presentan el inconveniente de tener un alto costo. Por ello J. Wyrobek y R. Bruce (1974), a partir de los estudios realizados en ratones expuestos a radiaciones ionizantes y observar el efecto producido en los espermatozoides en función de la dosis, propusieron el uso de la prueba de anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide, porque de forma sencilla permite cuantificar el posible daño ocasionado en el material genético de las células germinales por efecto de un agente químico o físico ambiental que interfiera en el proceso de diferenciación normal del espermatozoide. La razón que llevó a estos autores a considerar la inducción de anomalías en la morfología del espermatozoide como un indicador de daño genético fue que en el ratón se han identificado mutaciones que afectan la forma de los espermatozoides. Estas variaciones se presentan tanto de especie a especie como en el interior de las razas (figura 1), y se transmiten en forma hereditaria (Wyrobek, et al, 1983).

Inicialmente, 25 compuestos químicos conocidos por su actividad mutagénica, teratogénica y carcinogénica se evaluaron en relación con las anomalías producidas en el espermatozoide (Wyrobek y Bruce 1975).

figura 1



Los resultados mostraron diferencias significativas en los tipos de anormalidades producidas según el compuesto químico utilizado y de acuerdo al tiempo en el que se realizaba la exposición. La clasificación de los tipos de anomalías descritas por los autores, sólo se toma en cuenta la morfología de la cabeza (figura 2).

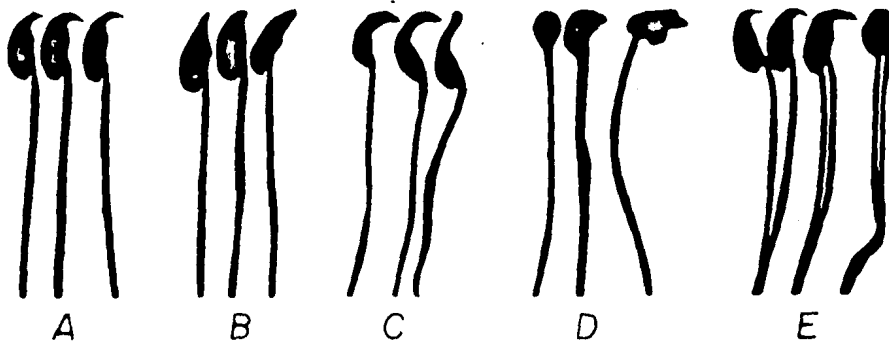
Las anormalidades del tipo (B) descritas por Wyrobek y Bruce (1975) se encontraron en tratamientos con metil metano sulfonato (MMS) y etil metano sulfonato (EMS). El tipo (C) denominado banana fue característico de la administración por hidroxiaurea y Mitomicina C.

Alrededor de 154 compuestos han sido probados en este sistema hasta 1982; de ellos 103 resultaron ser negativos (67 probados a dosis letales), 10 inciertos y 41 positivos.

De los positivos, se evaluaron 30 clases de diferentes compuestos químicos, como: del tipo de aminas aromáticas (2 amino fluoreno); alquilalidos (ciclofosfamida); aromáticos policíclicos (benzo (a) pireno, 3 metil colantreno); ésteres-hipóxido y carbamatos (MMS, EMS, bileran); toxinas fungales y antibióticos (griseofulvina, mitomicina); compuestos nitrogenados (tio-tepa); compuestos azo (4 amino azobenceno); etc.

En total se revisaron 71 artículos que incluían: 29 estudios en ratón (4 de ellos en F₁), 42 en pequeñas especies de mamíferos no muridos así como, estudios realizados en el humano (Wyrobek y Bruce, 1975). Todos los organismos se expusieron *in vivo* y sólo se evaluó el efecto de com---

TIPOS DE ANOMALIAS DEL ESPERMATOZOIDE
(SEGUN WYROBEK Y BRUCE)



- A NORMAL
- B GANCHO LEVANTADO
- C BANANA
- D AMORFOS
- E DOBLE COLA

Figura. 2

puestos químicos. Además de conteo de los espermatozoides se determinó su: motilidad, morfología o anomalías acrosómicas; y se cuantificaron los espermatozoides provenientes de epidídimo o de vasos deferentes (los efectos a nivel histológico testicular o de fertilidad fueron descartados).

El Programa "Genetox" de la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de E.U.A. (Wyrobek, et al, 1983), señalan a partir de los datos obtenidos en esta prueba y su relación con otros sistemas *in vivo* que evalúan mutaciones también en células germinales, que el sistema propuesto por Wyrobek puede ser utilizado en la identificación de compuestos químicos que inducen alteraciones en la espermatogénesis y tal vez mutaciones heredables.

DESCRIPCION DEL METODO DE WYROBEK

La metodología para evaluar la inducción de anomalías morfológicas en la cabeza del espermatozoide de ratón - consiste básicamente en: exponer pequeños grupos (4,5) de ratones machos adultos al compuesto a probar, posteriormente - sacrificarlos por dislocación cervical 35 días después de haber iniciado el tratamiento, y finalmente cuantificar al microscopio el porcentaje de células anormales para elaborar - la curva dosis-respuesta. A continuación, se presentan los - criterios particulares establecidos para la elaboración de - esta prueba. (Fig. 5)

1.- Material Biológico

Se recomienda el uso de ratones machos híbridos F_1 (de 10 a 15 semanas de edad), las cepas más utilizadas han sido: $(C_{57}BL/6 \times C_3H) F_1$ ya que presentan una incidencia espontánea de espermatozoides anormales muy baja en comparación con las cepas singénicas y autogénicas - (Wyrobek, et al, 1983).

Los animales se aclimatan una o varias semanas antes de la administración del compuesto y la temperatura, luz higiene, etc. deben mantenerse constantes.

2.- Exposición

La sustancia química se administra diariamente durante cinco días consecutivos o al menos durante tres - (tratamiento subagudo). De cada compuesto se evalúa su

solubilidad y toxicidad. El aceite de maíz, DMSO y agua son los compuestos utilizados como vehículos. El volumen de inyección diaria debe limitarse a 0,1 ml (agua destilada o DMSO) del solvente que se utilice como vehículo.

3.- Dosis

Se recomienda utilizar de cuatro a cinco dosis -- por compuesto. La dosis total para los cinco días ^{no debe ser letal} puede ser letal para los animales. *La dosis letal Media (LD50)*

4.- Vía de Administración

Se recomienda la vía intraperitoneal, porque puede controlarse cuidadosamente y garantiza la entrada de los agentes en estudio al organismo. Algunos trabajos : han utilizado otras vías : como la inhalación, ingestión, contacto en la piel, etc. (Wyrobek, et al, 1983).

5.- Controles

En todos los estudios se incluyen controles positivos y negativos. Los negativos reciben el mismo volumen de solvente que el que se usa para disolver la sustancia a probar. Una dosis de 20 mg/kg de peso de MMS durante cinco días ha dado respuesta efectiva para los controles positivos.

6.- Sacrificio

Los ratones se sacrifican por dislocación cervical, a los 35 días de haber iniciado el tratamiento.

7.- Recolección de la Muestra

La muestra por lo general se toma de la cauda del epidídimo a los 35 días (5 semanas) de la primera inyección.

Am-
bos epidídimos se extraen y se cortan finamente en pequeñas porciones y se colocan en un medio isotónico (ejemplo 4 ml de buffer de fosfatos). Para excluir fragmentos de tejido se filtran con una malla de 80µm.

8.- Preparación de la Muestra

Tomando una alícuota de los espermatozoides en solución, se esparcen en las laminillas ya sea antes o después de la tinción de las células con eosina acuosa de aproximadamente 0.1%.

9.- Evaluación de Anomalías

Se codifican y evalúan las anomalías de la morfología de la cabeza del espermatozoide, examinándolas con un microscopio a 400X u 800X y con filtro azul o verde. Se leen de 200 a 500 células por ratón (6 1000 células por dosis), y se clasifican en base a los lineamientos descritos por Wyrobek y Bruce en 1975 (figura 2).

10.- Criterios Estadísticos

La evaluación estadística relaciona los datos de los controles negativos, positivos y los individuales de las dosis en los diferentes grupos. La incidencia de espermatozoides anormales en los grupos de controles negativos debe ser la de los valores históricos de los controles negativos para el laboratorio. La frecuencia de espermatozoides anormales en los grupos controles, se presenta en un rango de 1 en 100 ó de 1 en 500.

El incremento para el control positivo debe ser el rango esperado para el laboratorio y significativo estadísticamente si supera los valores del control negativo en $p < 0.01$. De no ser así, el experimento debe reevaluarse ya que quedan en duda parámetros tales como: conteo, administración, y otros aspectos técnicos.

Cada dosis se compara individualmente con el control negativo correspondiente, con la ayuda de procedimientos estadísticos no paramétricos, ejemplo Kolmogorov-Smirnov, Mann-Whitney U-Test, Wilcoxon-Rank Sum-Test.

Se debe considerar el control positivo de la muestra y el control negativo de la muestra.

Los compuestos se reevalúan cuando;

- a) Los datos obtenidos en la curva dosis-respuesta son inciertos,
- b) El incremento de las anormalidades sólo se ve en un nivel de las dosis.

La aseveración de que una respuesta es negativa para los compuestos de baja toxicidad se realiza en base a la máxima dosis probada.

SISTEMA REPRODUCTOR MASCULINO DEL RATÓN

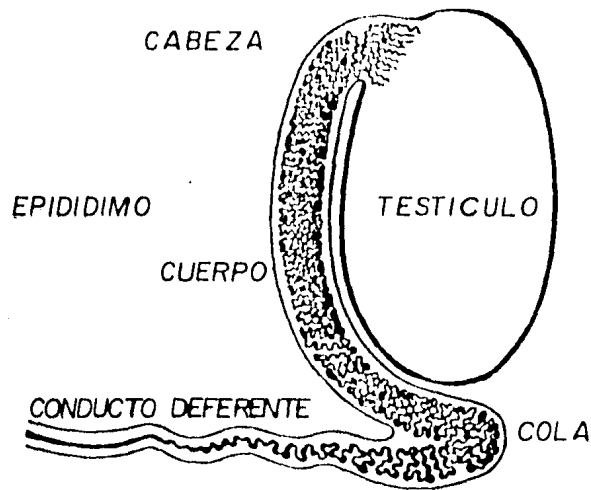
El aparato reproductor masculino del ratón está constituido por: testículos, saco que los envuelve, el escroto, - vasos deferentes que constan del epidídimo, canal eferente, y uretra, y de un órgano copulador, el pene.

1.- Testículos

Los testículos están cubiertos por un tejido conectivo fibroso denominado túnica albugínea cuyas prolongaciones o septos delgados se proyectan dentro del testículo y lo dividen en lóbulos. Estos lóbulos a su vez se empaquetan y se alinean formando los túbulos seminíferos - donde se producen las células germinales masculinas (figura 3a).

Una porción de la túnica se proyecta al interior de los testículos y permite el paso de arterias testiculares. Células de sostén o células de Sertoli, los túbulos seminíferos contienen las células sexuales en diferentes etapas de su desarrollo entre las cuales se encuentran - una células de gran tamaño, las células de sostén o de Sertoli cuyo citoplasma facilita la difusión de las sustancias que se liberan durante la ospermatogénesis.

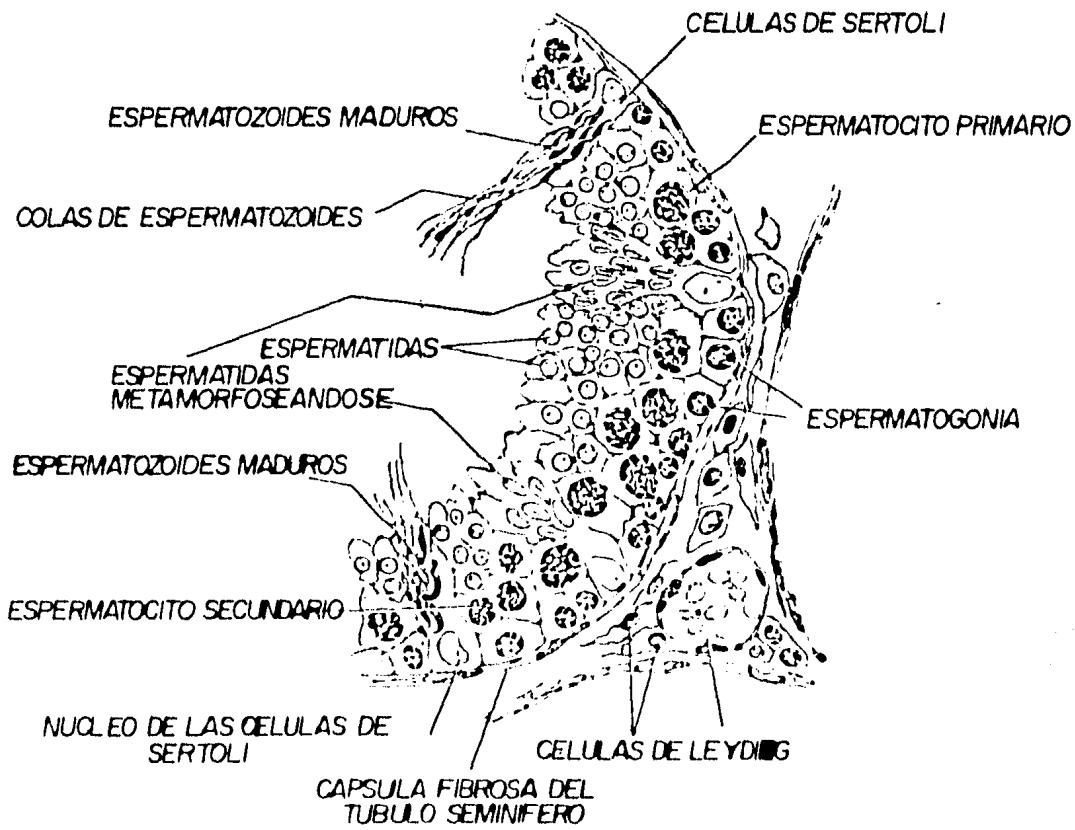
Los túbulos seminíferos están embebidos en el estroma del testículo que está formado por un tejido conjuntivo irrigado por capilares sanguíneos. Dicho estroma contiene células intersticiales o células de Leydig cuya -- función esencial es la síntesis de la hormona masculina



'A'

DIAGRAMA DEL TESTICULO Y DEL EPIDIDIMO

FIGURA 3



'B'

MADURACION DEL ESPERMATOZOIDE EN EL RATON

testosterona.

La estructura general de los testículos en las especies es muy parecida al esquema presentado y sólo varía en relación al tamaño, forma y localización.

2.- Espermatogénesis

Las células germinales primordiales en el macho se presentan desde los ocho días después de iniciada la gestación (aproximadamente 100 células), y se originan del saco vitelino en la base del pedúnculo alantoiideo de donde migrarán hacia las crestas genitales mediante movimientos amiboides (11-12 días después de la gestación). Durante este lapso, las células proliferan considerablemente por mitosis (aproximadamente 5,000). La espermatogénesis se inicia a partir de las espermatogonias. Estas células se dividen mitóticamente y originan a los espermatocitos primarios que contienen doble cantidad de ADN (4n). Al dividirse los espermatocitos primarios (primera división meiótica, reduccional), originan los espermatocitos secundarios, en los que el contenido de ADN se redujo a la mitad (2n) y así como el volumen general de la célula (figura 3b).

Los espermatocitos secundarios se dividen a su vez (segunda división meiótica, ecuacional) para dar

lugar a las espermátidas cuyo contenido de ADN resulta haploide (n). Finalmente las espermátidas ya no se dividen pero experimentan un notable proceso de diferenciación nuclear y citoplasmático denominado espermiogénesis que origina a los espermatozoides y que va acompañado de una drástica reducción del volumen nuclear.

Existen diferencias notables sobre todo en el tamaño de las células testiculares que permiten identificarlas fácilmente en los cortes histológicos. Las espermátogonias pueden ser de tres tipos: tipo A, Intermedio y el tipo B.

Durante cada ciclo de multiplicación mitótica de las espermátogonias se forman nuevas células del tallo germinal para reemplazar a las que se diferencian en espermátocitos.

Las espermátogonias del tipo A presentan gránulos finos de cromatina, estas células aparecen en los tres días después del nacimiento, como resultado del incremento en número de las células primordiales germinales (en el ratón se han identificado del tipo A1 al A4). Las espermátogonias intermedias son células caracterizadas por cromosomas metafásicos muy largos y anchos. También las espermátogonias del tipo A se dividen y se multiplican originando las células del tipo B. Estas células comienzan a alejarse de la membrana basal, y se ensanchan indicando la formación de un espermátocito primario. Estos espermátocitos entran en división meiótica, se parecen a las espermátogonias del tipo B

sólo que su tamaño es más pequeño.

Finalmente los espermatoцитos primarios se dividen en dos pequeños espermatoцитos secundarios, que se vuelven a dividir en cuatro espermátidas. La separación de los cromosomas sexuales en la primera división meiótica origina dos categorías de espermatozoides, los portadores del cromosoma X y los portadores del cromosoma Y.

La síntesis premeiótica del ADN ocurre en el espermatoцитo primario, en la fase premeiótica y finaliza antes de la profase meiótica. No hay síntesis de ADN en los estados posteriores de la espermatogénesis.

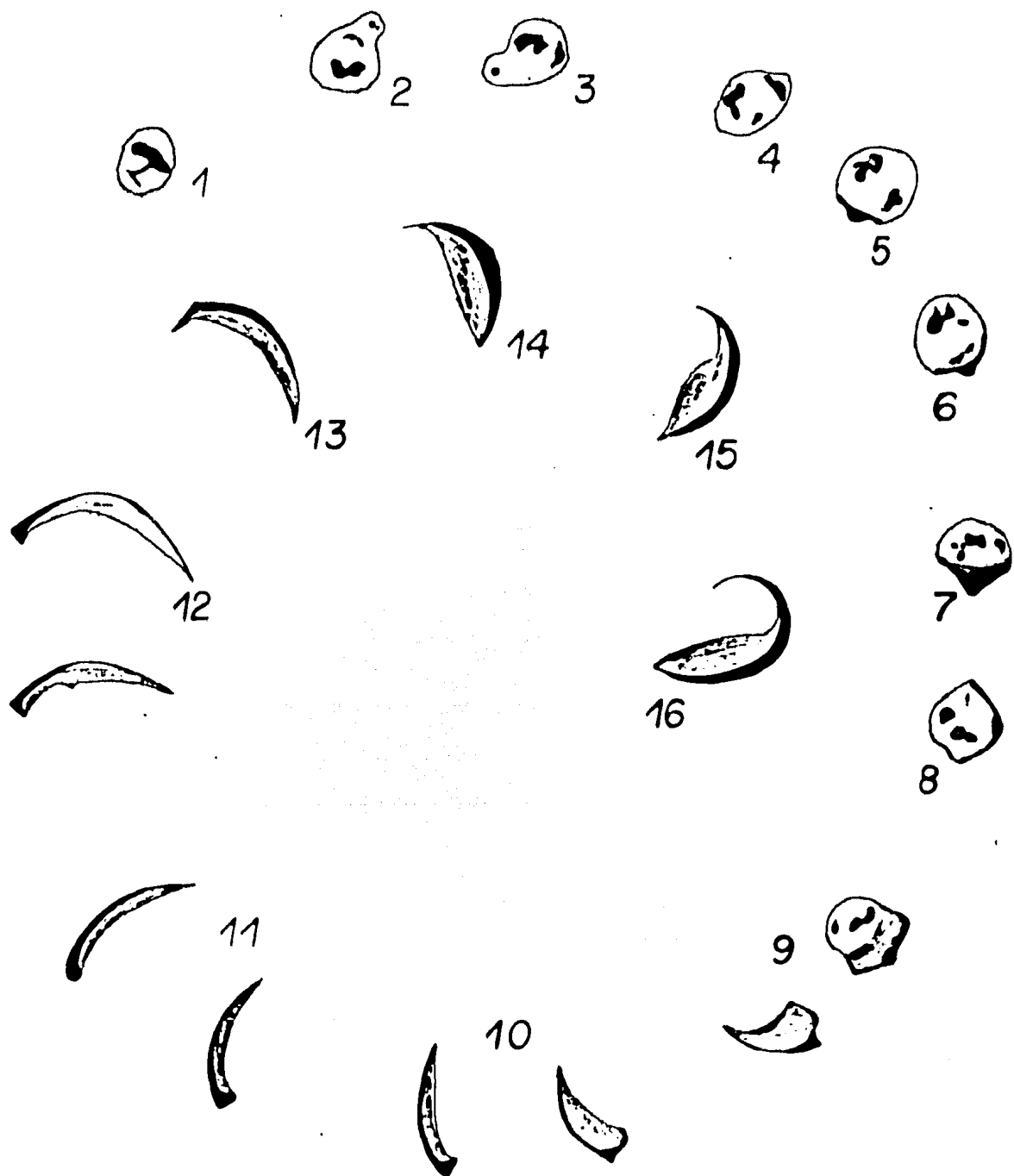
En la transformación de espermátidas y espermatozoides no se lleva a cabo ninguna división celular; pero sí se manifiestan profundas transformaciones morfológicas que caracterizan las fases de la espermiogénesis.

3.- Espermiogénesis

Este proceso se ha dividido en cuatro fases: la primera denominada de Golgi; la segunda fase de Casquete; la tercera Acrosómica y la última fase de Maduración (figura 4).

En la de Golgi, los gránulos proacrosómicos coalescen hasta que forman el gránulo acrosómico contenido en la vesícula acrosómica.

ESTADIOS DE LA ESPERMIOGENESIS



1-3 FASE GOLGI
4-7 FASE CASQUETE
8-12 FASE ACROSOMICA
13-16 FASE DE MADURACION

Figura. 4

En la segunda fase, la vesícula acrosómica se expande sobre el núcleo formando un casquete que lo llega a cubrir hasta en dos tercios. Un cuerpo llamado diplosoma migra al polo opuesto del acrosoma, a partir del cual se forman dos centriolos: el centriolo proximal guarda una posición perpendicular con respecto al eje del espermatozoide e intervendrá en la formación del huso acromático durante la primera segmentación del huevo. Después de la fecundación el centriolo distal que se encuentra en el eje del espermatozoide, funciona como cuerpo basal y origina el flagelo que se rodea de una membrana plasmática.

En la fase acrosómica, el núcleo se desplaza del centro, se elonga y aplana y su cromatina se condensa. En este momento la espermátida gira hacia la pared del túbulo seminífero, las mitocondrias migran hacia el flagelo y forman la vaina mitocondrial.

En la fase de maduración, se completa la transformación de la espermátida. El núcleo y el acrosoma toman la forma característica de cada especie. Al terminar la espermiogénesis la mayor parte del citoplasma se elimina formando el cuerpo residual.

El espermatozoide varía en cuanto a longitud, espesor y forma, en los diferentes grupos de ratones. Generalmente su posición anterior tiene forma de hoz, mide 0.0080 mm de longitud y 0.1226 mm incluyendo el flagelo.

El proceso de la espermatogénesis en el ratón es muy similar a la de cualquier otro mamífero. Un ciclo en el epitelio seminífero se lleva a cabo en 207 hrs. aproximadamente y la producción de espermatozoides maduros a partir de una espermatogonia se realiza en 5 - semanas.

4.- Conductos

Lo constituyen la rete testis que prolonga los tubos sominíferos y se encuentra dentro del testículo.-- Fuera del testículo se prolonga por el epidídimo (cabeza, cuerpo y cola), los conductos deferentes. Todas -- las estructuras son pares. El epidídimo es un conducto largo y plegado que conecta los vasos eferentes y los conductos deferentes. La cabeza del epidídimo está -- aplicada al mismo polo del testículo por donde pene--- tran nervios y vasos. El epidídimo sirve de reservorio en la maduración de los espermatozoides. Los conductos deferentes por su parte permiten la expulsión de los - espermatozoides desde el epidídimo hasta el conducto - eyaculador.

El conducto deferente sale de la porción distal - del epidídimo, atraviesa el conducto inguinal y se dirige a la región caudal. Finalmente desemboca en la -- uretra por debajo de la vejiga.

5. - Glándulas Accesorias

No contienen células germinales; su función más -- bien es de transporte ya que se sintetizan el elemento líquido del semen. So incluyen aquí las vesículas seminales, glándulas prostáticas. Las glándulas bulbo-ure---trales, glándulas ampulares y glándulas prepuciales, tie ne una función lubricante que favorece la cópula.

6. - Uretra

Récorre toda la longitud del pene y se abre en el - extremo de éste por un pequeño orificio uretral externo.

7. - Pene

Consiste de un cuerpo cavernoso que rodea la uretra.

MATERIAL Y METODOS

A.- Material

1).- Biológico

Ratones machos híbridos de la cepa B₆D₂F₁ - - -
(C₅₇Bl/6N X DBA/2N cox) de 10 a 12 semanas de edad,
suministrados por el bioterio del Instituto de Inves-
tigaciones Biomédicas, U.N.A.M. y provenientes de - -
The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine.

Los ratones se encontraban a temperatura ambien-
to (20°C) con ciclos de luz y oscuridad regulados;
fueron alimentados con Purina chow y agua ad libi-
tum.

2.- Químico

a).- Substancias

Arsenito de sodio (Na₃As), Metil metano sulfona-
to (MMS) y eosina de los laboratorios SIGMA.

Fosfato dibásico de sodio (Na₂HPO₄) y ácido - -
acético de los laboratorios BAKER.

Etanol y metanol de los laboratorios MERCK.

b). - Soluciones

I. - Solución amortiguadora de fosfatos

(0.066 M) pH 7

Solución a) fosfato dibásico de sodio, --
0.9465 g disuelto en 100 ml.

Solución b) fosfato monobásico de potasio,
0.9072 g disuelto en 100 ml.

Se tomó 62 ml de la solución a y 38-
ml. de la solución b, se mezclaron y se
ajustó al pH a 7 con HCL.

II. - Fijador de Laminillas. - Se mezclan:

Metanol 85 ml

Formaldehído 10 ml

Acido acético 5 ml

III. - Colorante para las laminillas

Solución de Eosina al 5%. Se pesó 5 g de
Eosina y se disolvió en agua bidestilada,

B. - Métodos

I. - Administración de las sustancias problema y control

A grupos de 4 a 6 ratones, de 10 a 12 semanas de edad, se les administró por vía intraperitoneal, arsenito de sodio en diferentes dosis: 100, 250, 500, 750 μ m por kilo de peso y de 1, 3, 5, 7, 9 y 10 mg/kg de peso.

Las dosis se administraron diariamente durante cinco días consecutivos.

En forma paralela, se les administró intraperitonealmente en dosis de 80, 90, 100 y 120 mg/kg de peso y el control positivo, metil metano sulfonato (MMS); agua bidestilada como control negativo porque fue el vehículo empleado en la dilución del arsenito. (fig. 5)

II. - Obtención de la muestra de espermatozoides

Los ratones se pesan y se sacrifican por dislocación cervical a los 35 días de iniciada la primera administración del compuesto. Se extiran ambos testículos junto con los epidídimos y se separan las caudas del epidídimo liberándose de todo exceso de material graso. Los testículos se pesan, los epidídimos se cortan finamente mientras se bañan con la solución amortiguadora de fosfatos y la suspensión formada se filtra a través de una malla de 80 μ m.

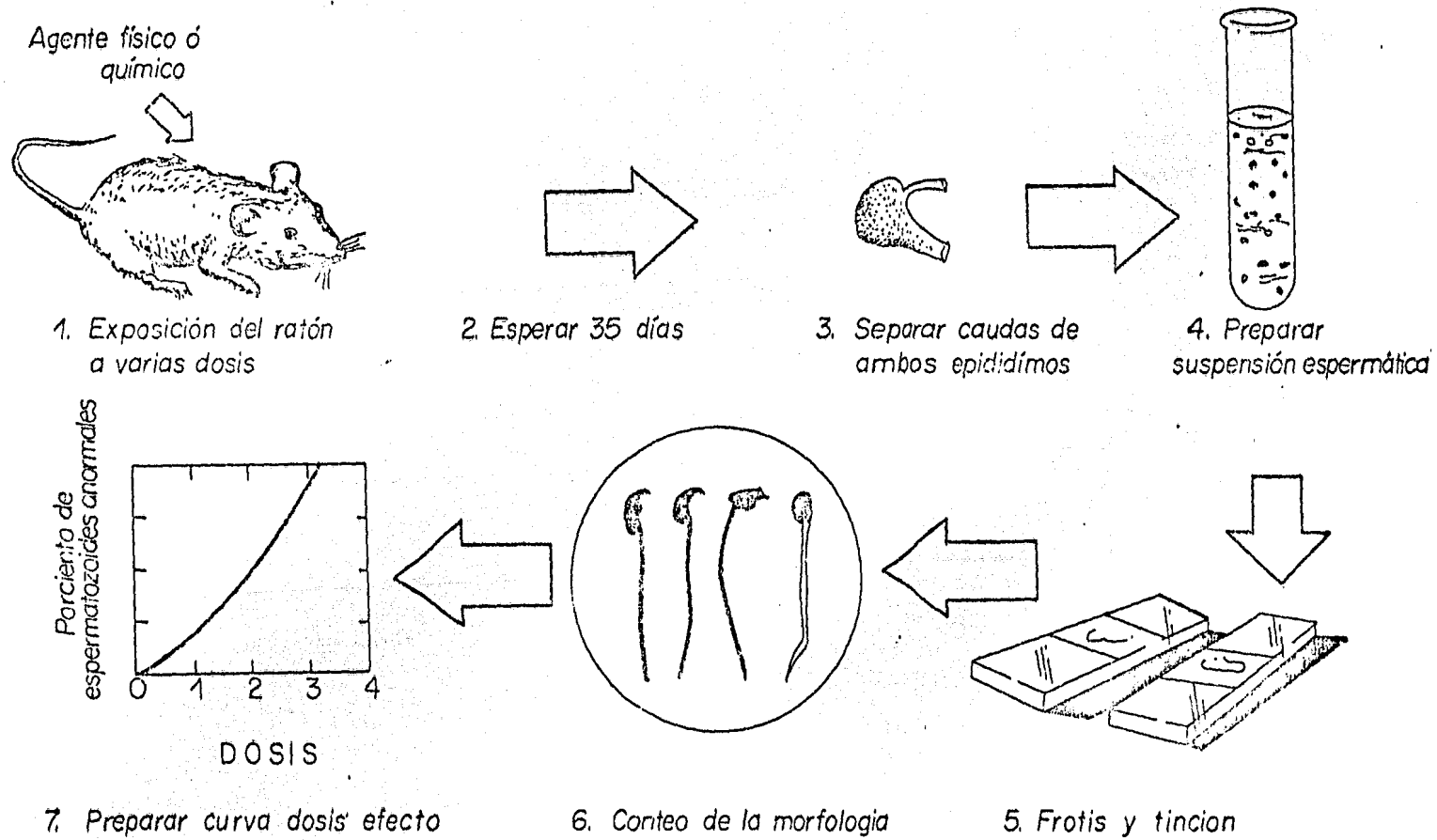


FIGURA 5

Al filtrado se le agrega solución de fosfatos -- hasta obtener una suspensión de 0.6 ml.

III.- Cuantificación del espermatozoide

De la suspensión de espermatozoides se toma una alícuota de 0.05 ml y se diluye con el buffer a 2 ml, una gota de esta dilución se monta en un hemocitóme--tro NEUBAUER, se cuentan las esferas en los ocho cua--drantes de las rejillas en el microscopio CARL ZEISS a una amplificación de 40X.

IV.- Determinación de las Anomalías Espermiáticas

a).- Fijación y Tinción de los espermatozoides

De la suspensión de espermatozoides se toma una alícuota y se preparan frotis en laminillas esmeriladas (previamente desengrasadas con eta--nol).

Se deja secar de 2 hrs. a 1 al día. Se fija durante una hora y se lava con agua destilada. Se tiñe con eosina al 5% durante una hora, deján--dose secar a temperatura ambiente un día y se la--va sucesivamente con etanol hasta que la lamini--lla pierda el exceso de colorante. Se preparan - cuatro laminillas por cada ratón.

b).- Análisis al Microscopio

Las laminillas se analizaron con un microscopio CARL ZEISS con una amplificación de 40X y se observaron 1,200 espermatozoides por ratón (300/laminilla).

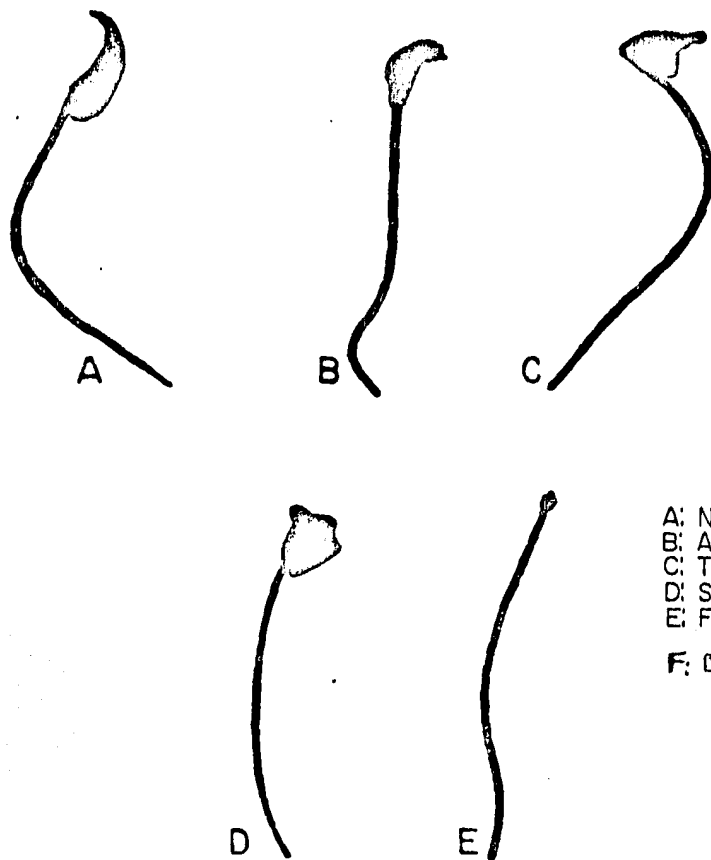
La clasificación de anomalías espermáticas se hizo según los lineamientos generales del método descrito por Wyrobek y Bruce (1975), y las del laboratorio (figura 6). Con el fin de evitar variables subjetivas atribuibles al lector, se leyeron "a ciegas", sin conocer la procedencia de las mismas laminillas.

c).- Análisis Estadístico

Wyrobek y Bruce (1978), recomendaron usar pruebas no paramétricas en la evaluación de los resultados obtenidos con los compuestos probados. Utilizamos la Prueba de Wilcoxon-Rank, que se usa para probar si dos grupos independientes y diferentes han sido tomados de la misma población. En la actualidad se utiliza como alternativa ante las pruebas paramétricas de T.

Para aplicar la prueba se combinaron las observaciones de los grupos control y tratado, para cada dosis asignándose los rangos algebraicos y en números crecientes y donde la suma de rangos de referencia fue la del grupo control. La estadística de prueba que se tomó fue:

FIGURA 6



A: NORMAL
B: AMORFO
C: TRIANGULAR
D: SIN GANCHO
E: FILAMENTOSO
F: DOBLES

TIPOS DE
ESPERMATOZOIDES NORMALES Y ANORMALES OBSERVADOS
Y CUANTIFICADOS EN EL ANALISIS DE ESTE ESTUDIO, CON
SIDERANDO SOLO LA MORFOLOGIA DE LA CABEZA.

$$T = \sum_{i=1}^n R(x_i)$$

Posteriormente, este número (n) obtenido de la suma de rangos se comparan con la ecuación:

$$W_p = n(n+m+1) - W_{1-p}$$

donde: n = control

m = tratado


a un $p < 0.05$

y con un valor asignado en las tablas de referencia (Siegel, S., 1985).

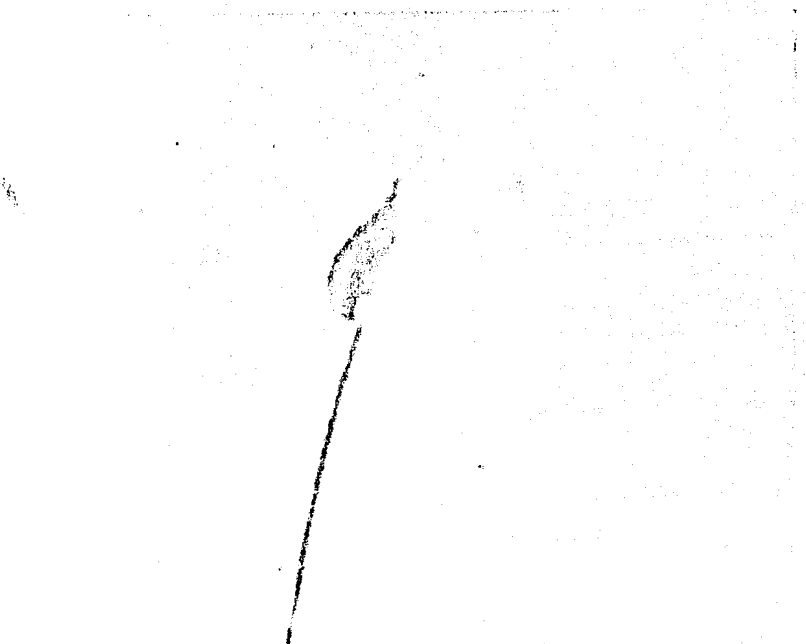
Esto permitió obtener la significancia estadística del efecto ocasionado por el arsenito de sodio en las células germinales del ratón en relación al efecto ocasionado en los grupos controles positivos y negativos respectivamente permitiéndonos rechazar o aceptar la hipótesis nula según fuera el caso.

F O T O

MORFOLOGIA DE LA CABEZA DE ESPERMATOZOIDES
DE RATON (B₆ D₂ F₁)



ANORMAL Na₃ As (40x)

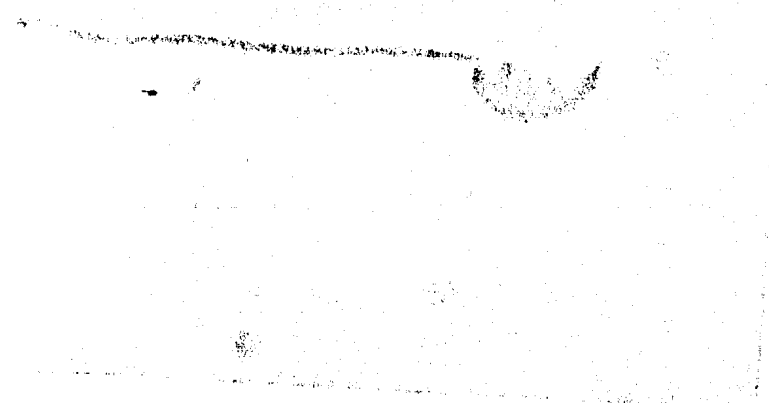


ANORMAL POR EFECTO
DE MMS (40x)


F O T O

MORFOLOGIA DE LA CABEZA DE ESPERMATOZOIDES
DE RATON (B₆ D₂ F₁)

NORMAL (40x)

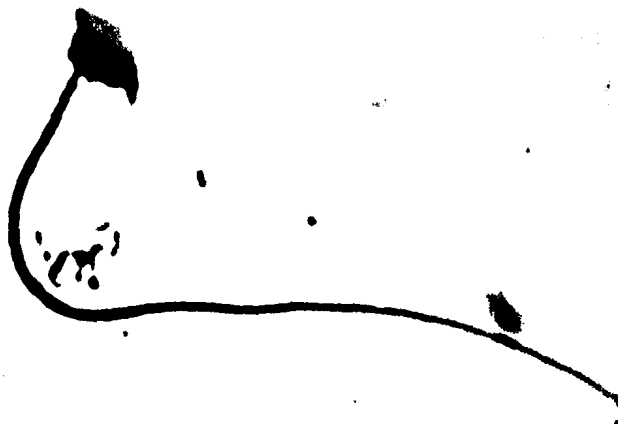
A black and white micrograph showing a single sperm head. The head is roughly oval-shaped and appears to have a distinct, slightly textured surface. It is positioned in the upper right quadrant of the frame.

ANORMAL POR EFECTO
DE MMS (40x)

A black and white micrograph showing a single sperm head. The head is elongated and appears to have a more irregular, possibly fragmented or distorted shape compared to the normal specimen. It is positioned in the lower left quadrant of the frame.

F O T O

MORFOLOGIA DE LA CABEZA DEL ESPERMATOZOIDES
DE RATON (B₆ D₂ F₁)




ANORMAL Na₃As (40x)



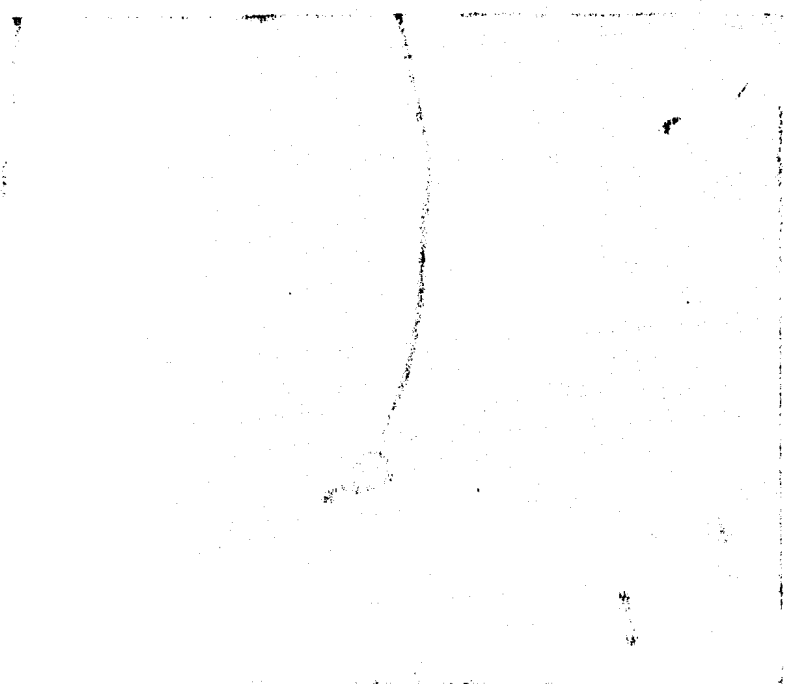
NORMAL (40x)

F O T O

MORFOLOGIA DE LA CABEZA DE ESPERMATOZOIDES
DE RATON ($B_6 D_2 F_1$)



ANORMAL ($Na_3 As$) y
NORMAL (40x)



ANORMAL POR EFECTO DE
MMS (40x)

R E S U L T A D O S

En la tabla 2 se muestran los efectos producidos a dosis bajas por el arsenito de sodio sobre el peso del testículo, la cuenta espermática epididimal y porcentaje de espermatozoides anormales.

Al analizar estos resultados y utilizar la prueba de Wilcoxon, se encontró que en general ninguna de las variables estudiadas mostró un efecto en relación a los valores obtenidos con el grupo control.

En relación a la cuenta espermática epididimal se observaron modificaciones con respecto a los resultados obtenidos en el grupo control; sin embargo, en ninguno de estos casos se encontró una dosis-respuesta, la tendencia mostró descenso en la cantidad de espermatozoides. Al utilizar la estadística para estos valores se encontró un efecto altamente significativo; pero sin relación dosis-respuesta. (Fig. 7)

En la tabla 3 en donde se analizaron efectos similares a concentraciones mayores de arsenito de sodio al evaluar estos resultados utilizando también la prueba de Wilcoxon observamos que para el caso de cuenta espermática epididimal los resultados mostraron diferentes significancias, sin embargo, en ninguno de estos casos hubo efecto dosis-respuesta y sólo en dosis aisladas se encontró una diferencia significativa en relación con el valor obtenido -

para el grupo control.

Cuando se mide el efecto del arsenito de sodio en relación con el incremento en las anomalías espermáticas, observados que para las dosis (1,3,5, mg/kg/día) no hubo una respuesta tabla .

En tanto que para las concentraciones mayores (7,9,10 mg/kg/día) se muestra un efecto altamente significativo.

La gráfica correspondiente en donde se utilizan las dosis de 1 a 10 mg, sí muestra una relación dosis-efecto. fig.(8)

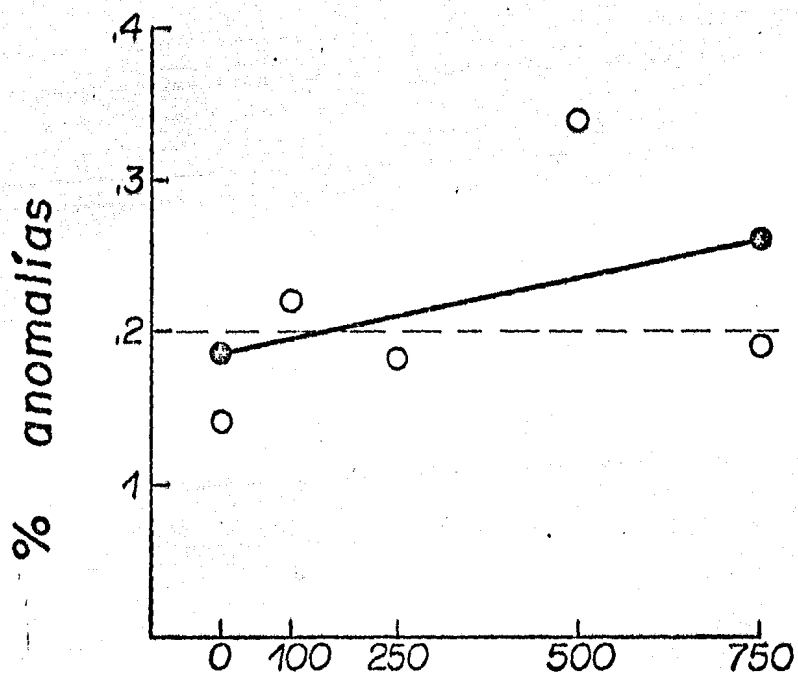
En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos con el control positivo, metil metano sulfonato (MMS) para su efecto sobre cuenta espermática epididímal, peso de testículo y porcentaje de anomalías. Los resultados confirman en todas las dosis la relación dosis respuesta, ver tabla 4 y FIG.9.

La tabla 5 corresponde a los resultados obtenidos durante el período comprendido: mayo 1983-julio 1984, para el control histórico de la cepa BxDeF. Tabla 5, fig.10

T A B L A 2

EFEECTO DEL ARSENITO DE SODIO EN EL PESO DEL TESTICULO, CUENTA ESPERMATICA EPIDIDIMAL Y PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES ANORMALES EN RATONES DE LA CEPA B₆D₂F₁

DOSIS TOTALES ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$)	No. DE ANIMA LES	PESO DE LOS TESTICULOS (gr)		CANTIDADES DE ESPERMATOZOIDES (10^6)		ANOMALIAS	
		\bar{X}	DS	\bar{X}	DS	\bar{X}	DS
0	4	0.2545	± 0.02	14.58	± 1.91	0.14	± 0.1
100	5	0.2506	± 0.02	6.72	± 2.02	0.22	± 0.09
250	4	0.2386	± 0.01	9.88	± 3.85	0.18	± 0.10
500	5	0.2068	± 0.01	11.27	± 3.57	0.34	± 0.15
750	3	0.1750	± 0.07	6.0	± 3.98	0.19	± 0.05



DOSIS $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$

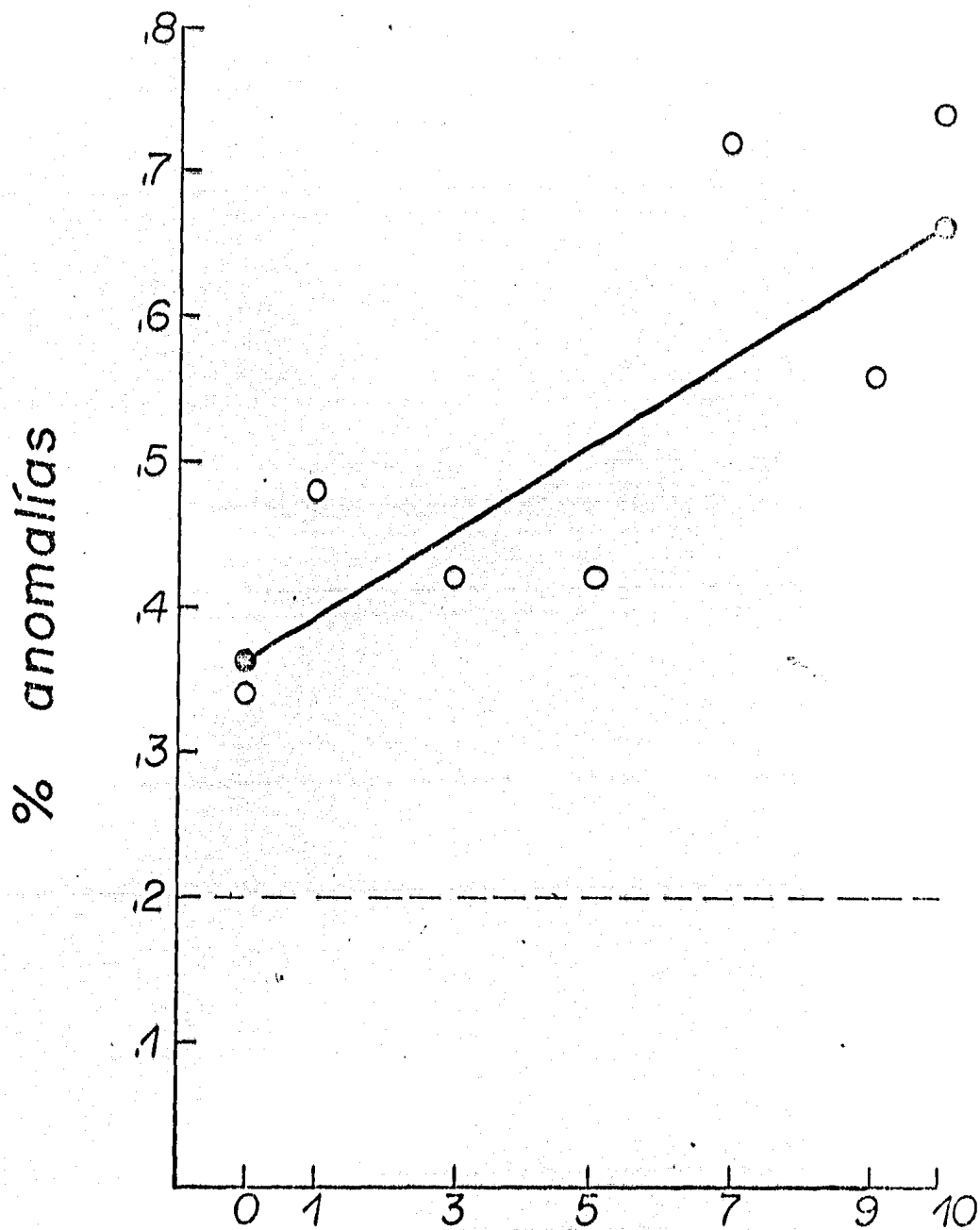
FIGURA 7

RELACION DOSIS-RESPUESTA PARA LAS ANOMALIAS ESPERMATICAS INDIVIDUALES por Na_3As A DOSIS BAJAS EN LOS RATONES --- $B_6D_2F_1$. CADA PUNTO REPRESENTA LA MEDIA DEL %.

TABLA 5

RESULTADOS OBTENIDOS POR EFECTO DEL ARSENITO DE SODIO EN EL PESO DEL TESTICULO, CANTIDAD DE ESPERMATOZOIDES EN EPIDIDIMO Y EN LA MORFOLOGIA DE LA CABEZA DEL ESPERMATOZOIDE. RATONES DE LA CEPA B6D2F₁

DOSIS (mg/kg/día)	No. ANIMALES	PESOS DE TESTI CULOS (gr) \bar{X}	CANTIDAD DE ESPERMATOZOIDES \bar{X} (10 ⁶)	% ANOMALIAS
0	9	0.1840 ± 0.02	17.20 ± 5.32	0.34 ± 0.18
1.0	5	0.1895 ± 0.01	2.92 ± 3.22	0.48 ± 0.20
3.0	6	0.2016 ± 0.01	5.18 ± 3.29	0.42 ± 0.20
5.0	6	0.1653 ± 0.02	1.83 ± 1.53	0.42 ± 0.20
7.0	4	0.1805 ± 0.02	18.71 ± 8.74	0.72 ± 0.31
9.0	5	0.2005 ± 0.01	13.01 ± 6.70	0.56 ± 0.03
10.0	6	0.204 ± 0.01	13.13 ± 11.19	0.74 ± 0.19



DOSIS mg/kg/día.

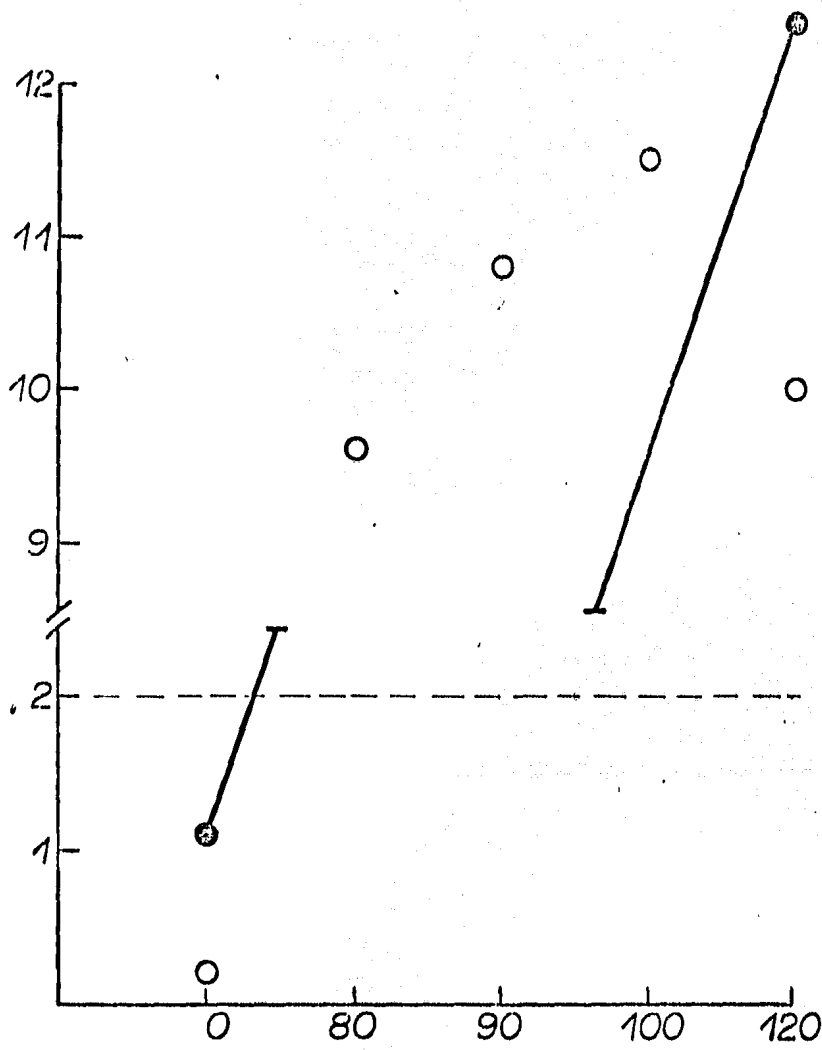
FIGURA 8

RELACION DOSIS-RESPUESTA PARA LAS ANOMALIAS ESPERMATICAS INDIVIDUALES POR Na_7As A DOSIS ALTAS EN LOS RATONES -- $\text{B}_6\text{D}_2\text{F}_1$. CADA PUNTO REPRESENTA LA MEDIA DEL % .

T A B L A 4

EFFECTO DEL METIL METANO SULFONATO EN EL PESO DEL TESTICULO, CUENTA ESPERMATICA Y PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES DE ANORMALES EN RATONES DE LA CEPA B₆D₂F₁

DOSIS (mg/kg/día)	No. ANIMALES	PESOS DE TESTICULOS (gr)		CANTIDAD DE ESPERMATOZOIDES (10 ⁶)		ANOMALIAS	
		\bar{X}	DS	\bar{X}	DS	\bar{X}	DS
0	4	0.1986	± 0.02	20.13	± 6.48	0.33	± 0.21
80	6	0.1986	± 0.02	20.13	± 6.48	9.6	± 3.4
90	5	0.1762	± 0.03	3.89	± 1.9	10.86	± 2.6
100	5	0.1560	± 0.01	1.34	± 1.7	11.54	± 5.0
120	3	0.1347	± 0.01	0.56	± 0.32	10.02	± 1.13



DOSIS mg/kg/día.

FIGURA 9
RELACION DOSIS-RESPUESTA PARA LAS ANOMALIAS ESPERMATICAS
INDIVIDUALES POR MMS EN LOS RATONES $B_6D_2F_1$. CADA PUNTO
REPRESENTA LA MEDIA DEL %.

T A B L A 5

RESULTADOS OBTENIDOS EN EL CONTROL HISTORICO DE LA CEPA B₆D₂F₁

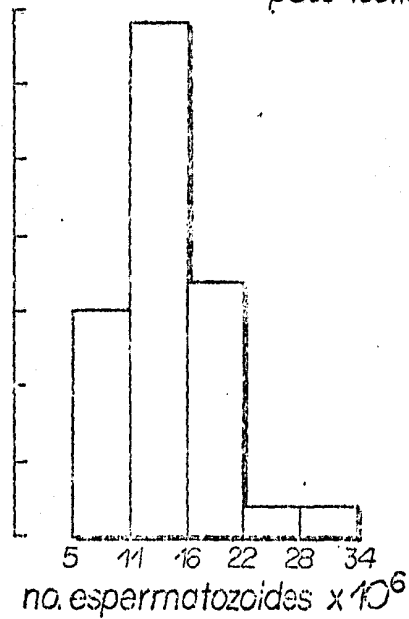
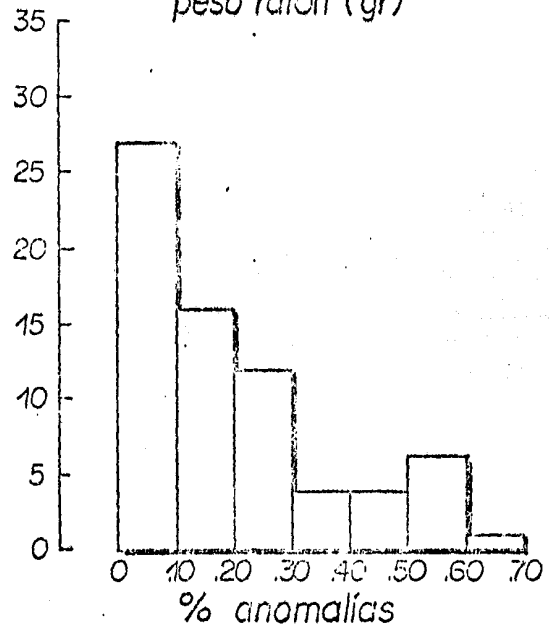
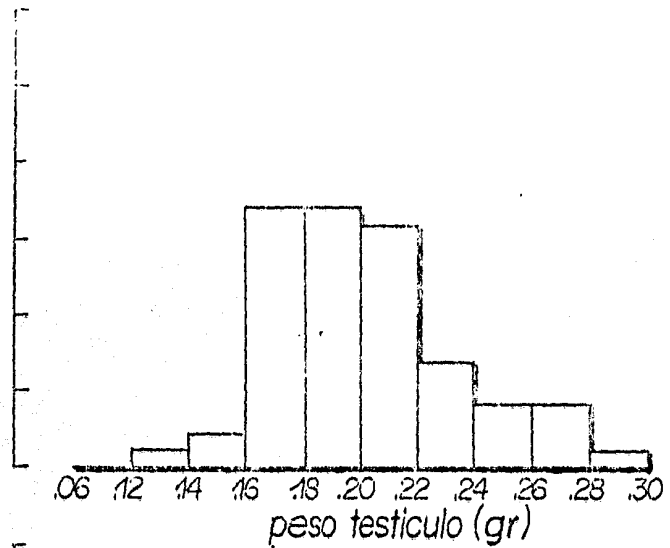
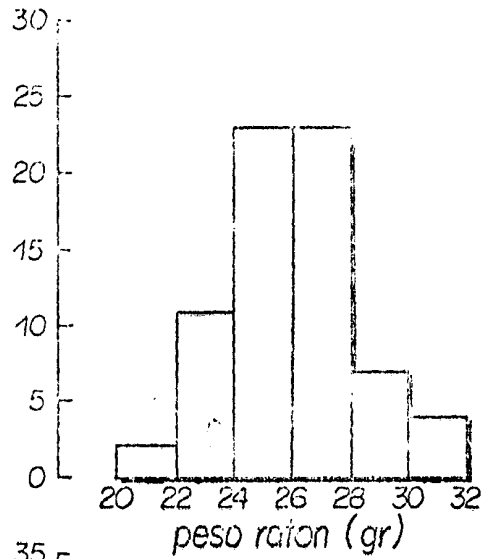
DOSIS	No. ANIMALES	PESO RATON (gr)		PESO TESTICULO (gr)		CANTIDAD DE ESPERMATO- ZOIDES 10 ⁶ (gr)		% ANOMALIAS
		\bar{X}	DS	\bar{X}	DS	\bar{X}	DS	
0	70	25.16	± 2.23	0.1977	± 03	14.64	± 4.67	$\bar{X} = 0.20$

LABORATORIO DE MUTAGENOS AMBIENTALES
 INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
 UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

50

HISTOGRAMAS DE FRECUENCIA EN LOS CONTROLES NEGATIVOS

FRECUENCIA



D I S C U S I O N Y C O N C L U S I O N E S

Los datos obtenidos con esta prueba muestran que para concentraciones muy altas de arsenito se puede detectar un aumento en el porcentaje de anomalías espermáticas que si bien es cierto, es estadísticamente significativo en relación al porcentaje normal de anomalías sin embargo, sólo muestra un cambio muy pequeño comparado al producido por uno de los mutágenos más conocidos (MMS). Es decir, si se compara su capacidad para producir alteración en la morfología del espermatozoide con la del mutágeno, la del arsénico es muy débil. Se debe tomar en cuenta también que las concentraciones de arsénico utilizadas en donde se encontró una respuesta significativa, son concentraciones muy altas desde el punto de vista del efecto producido sobre otros parámetros biológicos.

Una de las posibles explicaciones, sería la no accesibilidad del arsénico a las gónadas; pero existen diversos estudios, en donde se demuestra que aunque a concentraciones bajas el arsénico si logra atravesar la barrera hematotesticular por lo que se descarta esta suposición.

En un trabajo llevado a cabo en este Laboratorio, se demostró que el arsénico radioactivo administrado a concentraciones muy bajas tenía acceso al testículo en ratón.

De lo expuesto anteriormente se concluye que:

- a).- En concentraciones bajas de arsénico no hay efecto.

- b).- En concentraciones altas existe una respuesta estadísticamente significativa de acuerdo a los lineamientos establecidos para esta prueba (Wyrobek, 1979), considerados como positivos sin embargo, al comparar su actividad con la de un mutágeno conocido (MMS); esta actividad es muy baja y dudosa desde el punto de vista de su significancia biológica.

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

- Albores, A., Cebrián, M. E., Telloz, I. y Valdéz, B. Estudio-Comparativo de Hidroarsenicismo en dos comunidades - rurales de la región lagunera de México. Bol of --- Sanit. Panam. 86 (3): 196-205. (1979).
- Austin, C. y Short R. Células Germinales y Fertilizantes. Procesos de Reproducción en los Mamíferos. 1. La Prensa-Médica Mexicana, México, 141 p.p. (1982)
- Bencko, V. Carcinogenic, Teratogenic, and Mutagenic effects - of Arsenic. Environ Health Persp. 19: 179-182. (1977).
- Brachet, J. Introducción a la Embriología Molecular: Blume -- Ediciones. España. 79-91. (1975).
- Bruce, W. R., Furrer, R. and Wyrobek, A. J. Abnormalities in- the shape of Murine Sperm after acute Testicular --- X-irradiation. Mut. Res. 23: 381-386. (1974).
- Brusick, D. y Auletta, A. Developmental status of Biossays in Genetica Toxicology. A. Report of Phase II of the -- U. S. Environmental Protection Agency Gene-tox Pro-- gram. Mut. Tes. 153: 1-10. (1985).
- Castro, J. A. Efectos Carcinogénicos, Mutagénicos y Teratogé- nicos del Arsénico. Acta Bioquímica Clínica Latinoame- ricana 21 (1): 3-17. (1982).
- Cortinas, de N., y Ostrosky, P. Manual de Métodos para la Iden- tificación de Mutágenos y Carcinógenos Químicos Am-

bientales, Inst. Invest. Biomédicas U.N.A.M. 1.
México, 146 p.p. (1980).

Charbonneau, S. M., Hollins, J. G., Tam, G.K.H. et al Metabo-
lism of Orally Administered Inorganic Arsenic in
the Dog. Tox. Let. 3: 107-113. (1979).

Charbonneau, S. M., Hollins, J. G., Tam, G.K.H. et al Whole--
Body Retention, Excretion and Metabolism of ---
(⁷⁴As_ Arsenic Acid in the Hamster. Tox. Let. 5:
175-182. (1980).

Dobzhansky, T. Genética del Proceso Evolutivo. Extemporaneos-
S. A. México. 463 p.p. (1975).

Doohar, G. and Bennett, D. Abnormal Microtubular Systems in -
Mouse Spermatids Associated with a Mutant Gene at --
the Tlows. J. Embryol. Exp. Morph. 32 (3): 749-761. -
(1974).

Drake, J. W., Abrahamson, S., Crow, J. F. et al Environmental
Mutagenic Hazards. Science 187: 503-513. (1975).

Dowie, N. M. y Heath, R. W. Métodos Estadísticos Aplicados. -
281-291. (1973).

Dubinín, N. P. Mutágenos Ambientales. Genética General 2: --
171-222. (1981)

Dutkiewicz, T. Experimental Studies on Arsenic Absorption Rou-
tes in Rats. Environ. Health Persp. 19: 173-177.
(1977).

- Fabricant, J. D. y Parkening, T. A. Sperm Morphology and ---
Cytogenetic Studies in Ageing C57BL/6 mice. J. Re-
prod. Fert. 66: 485-489. (1982).
- Fahmy, O. and Myrtle, J. Gene Elimination in Carcinogenesis:
Reinterpretation of the Somatic Mutation Theory. Cancer
Research. 30: 195-205. (1970).
- Fawatt, W., Anderson, W. A. and Phillips, D. M. Morphogenetic-
Factors Influencing the Shape of the Sperm Head. Deve-
lopmental Biology. 26: 220-251. (1971).
- Fisbein, L. Sources, Transport and Alterations of Metal Com-
pounds: An Overview I. Arsenic, Beryllium, Cadmium,
Chromium, and Nickel. Environmental Health Perspecti-
ves 40: 43-64. (1981).
- Franson, R. F., Witten, E. H. Anatomía y Fisiología de los
Animales Domésticos. 406-417. (1984).
- Heindorff, K., Aurich, O., Michaelis, A. et al Genetic Toxo-
cology of Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA).
Mut. Res' 115: 149-173. (1983).
- Hollaender, A. y Serres de, F. Principles and Methods for --
Their Detection. Chemical Mutagens. 5 Hollaender
and F. J. de Serres. U.S.A. (1978).
- Hollstein, M. and Mc Cann, J. Short-Term Tests for Carcinogens
and Mutagens. Mut. Res. 65: 133-226. (1979).

Hood, R. D., Thacker, G. T., y Patterson, B. L, Effects in the Mouse and Rat of Prenatal Exposure to Arsenic, Environ. Health Persp. 19: 219-222, (1977)

Howillon, Ch. Sexualidad, 13-16. (1971).

Komatsu, H., Kakizoe, T., Nijima, T. et al Increased Sperm Abnormalities due to Dietary Restriction, Mut. Res 93: 439-446. (1982).

Ledyard, S. Procesos de la Evolución Orgánica, Prentice/Hall Internacional. España, 199 p.p. (1978).

Leonard, A. y Lauwerys, R. Carcinogenicity, teratogenicity -- and Mutagenicity of Arsenic, Mut. Res. 75: 49-62. -- (1980).

Martell, A. Chemistry of carcinogenic metals. Environ. Health Persp. 40:207-226. (1981).

** (2)

Mezquita, C. Espermatogénesis. Scientific American 52: 6-18. (1981).

Oakberg, E. F. Description of Spermatogénesis in the Mouse -- and its use in Analysis of the Cycle of the Seminiferous Epithelium and Germ Cell Renewal. Amer. J. Anat. 99: 391-413. (1956)

Pershagen, G. The Carcinogenicity of Arsenic. Environmental - Health Perspectives 40: 93-100. (1981).

Rall, P. Role of Metals in Carcinogenesis, Environmental Health Perspectives 40. (1981)

Roosen, R. The Process of Spermatogenesis in Animals. U.S.A. - 214 p.p. (1977).

Russell, W. L. The Role of Mammals in the Future of Chemical - Mutagenesis Research. Arch. Tox. 38: 141-147. (1977).

Selby, L. A., Case, A., Osweiler, G. et al Epidemiology and -- Toxicology of arsenic poisoning in domestic animals. -- Environ. Health. Persp. 19: 183-189. (1977).

Siegel, S. Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta. 143-155. (1985).

Sobels, F. Chemical Modification toward les pf ,itagenie activity as an alternative to problems involved in risk -- assesment. Mut. Research. 102: 305-307. (1982).

Szmerc, G. y Chandley, C. Trisomy and Triploidy Induced by -- X-irradiation of mouse spermatocytes. Mut. Res. 33: -- 229-238. (1975).

Tabor, H. y Whitte, C. Preparation and Purification of ⁷⁴As-labeled Arsenate and Arsenite for use in Biological Experiments. Anal. Biochemis. 78: 557-560. (1977).

Topham, J. C. Chomically-induced Transmissible abnormalities - in sperm-head shape. Mut. Res. 70: 109-114. (1980).

- Vega, S. Evaluación Epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales. Centro Panamericano de Ecología humana y salud org. panamericana de la salud OMS 6: 2-6. (1985).
- Wetterhahn, K. The Role of Metals in Carcinogenesis Biochemistry and Metabolismo Envir. Health Persps. 40: 233-252. (1981).
- Wyrobek, A., Gordon, L., Burkhart, J. et al An Evaluation of the Mouse Sperm Morphology Test and other sperm tests in nonhuman mammals. Mut. Res. 115: 1-73. (1983).
- Wyrobek, A., The induction of Sperm-Shape Abnormalities in Mice and Humans.
- Wyro, J. and Bruce, W. R. Chemical induction of sperm abnormalities in mice. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72 (11): 4425-4429. (1975).
- Zeimmermann, F. Can we determine mutagenicity or only a mutagenic potential? Mut. Res. 92: 3-7. (1982).
- Environmental Mutagenic Hazards. Environmental. Mutagens Society. Science 187: 503-514. (1976).
- Handbook of Physiology Endocrinologi. Vol 5 Secc. 7. 1975
- Health assement documental for inorganic arsenic. EPA. (1983).
- Identifying and estimating the genetic impact of chemical mu-

tagens, Commilte on Chemical Envirenmental Health Lazards --
comission on Life Sciences Natural Research Council, National
Academy press, 315p,p, (1982).

*1Cortinas de Nava, C., Ostrosky, p. y Galván, S. C. Principios
de Mutagénesis y su relación con Carcinogénesis y Te
ratogénesis. Instituto de Investigaciones Biomédicas
U.N.A.M. (1979).

**2Nordstrom, L. Beckman, Nordenson, I. Occupational and environ
mental risks. in and around a smelter in northern
Sweden. Hereditas 88:51-54. (1978).