



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

29  
2es.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "CUAUTITLAN"

INDUCCION DE INTERCAMBIO DE CROMATIDAS  
HERMANAS POR EL BENZO [α] PIRENO EN  
ESPERMATOGONIA DE RATON

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
P R E S E N T A :  
**DANIEL GONZALEZ SAMANO**

DIRECTORA: M. en C. SANDRA DIAZ BARRIGA ARCEO

CODIRECTOR: DR. EDUARDO MADRIGAL BUJAI DAR

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

257710



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVANZADA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de  
Exámenes Profesionales

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Inducción de Intercambio de Cromátidas Hermanas por el Benzo(a)pireno  
en espermatogonia de ratón

que presenta el pasante: Daniel González Sámano  
con número de cuenta: 8802620-4 para obtener el TITULO de:  
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautilán Izcalli, Edo. de Méx., a 31 de Octubre de 1997.

PRESIDENTE	Q.F.I. Leticia Zúñiga Ramírez	<i>Leticia Zúñiga Ramírez</i>
VOCAL	Q.F.B. Idalia Avila Miyasawa	<i>Idalia Avila Miyasawa</i>
SECRETARIO	M. en C. Sandra Díaz Barriga Arceo	<i>Sandra Díaz Barriga Arceo</i>
PRIMER SUPLENTE	Q.F.B. Ma. Virginia Olive Arellano	<i>Ma. Virginia Olive Arellano</i>
SEGUNDO SUPLENTE	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	<i>Rosalba Bonilla Sánchez</i>

# AGRADECIMIENTOS

A la M. en C. Sandra Díaz Barriga Arceo por su tiempo, ayuda y amistad que me dedicó, pero sobre todas las cosas por la grandiosa oportunidad que me brindó de realizar el servicio social y la tesis dentro del maravilloso campo de la Genética.

Al Dr. Eduardo Madrigal Bujaidar por haberme abierto las puertas, así como a todos, de su laboratorio sin importar la procedencia; también por la amistad y el gran sentido del humor que mantiene.

A la Q. F. B. Alejandra Hernández Ceruelos por haber compartido los tips y el conocimiento, así como la amistad.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme formado profesionalmente todos estos años y haberme dado la oportunidad de conocer a tan buenos amigos.

Al Instituto Politécnico Nacional por haberme dado la oportunidad de realizar esta investigación.

Al Instituto Nacional de Higiene por la valiosa donación de los ratones.

Pero sobre todos al pueblo mexicano, porqué gracias al sudor de su trabajo, traducido en impuestos, hicieron posible mi educación.

¡A TODOS USTEDES MIL GRACIAS !

# DEDICATORIAS

**A mis padres:** por haberme dado la grandiosa oportunidad de vivir

**A toda mi familia:** porqué gracias al haber sido el menor heredé de ustedes todo lo que soy.

**De mi padre:** por enseñarme que sin importar las carencias y el medio en que se nace, deben construirse los sueños para ser más de lo que nos correspondía.

**De mi madre:** por la infinita paciencia, el valor del sacrificio y sobre todo el sentido de la justicia.

**De mis hermanos:**

**Yolanda:** por todo el apoyo y ayuda brindada en mi infancia y adolescencia, pero sobre todo por la *importancia de la responsabilidad*.

**Emilio:** por el gran espíritu de aventura y la valentía para enfrentar la vida solo.

**Samuel:** por estar siempre atento a la familia, así como el constante interés por conservarnos unidos.

**Guadalupe:** porqué a pesar de las enfermedades hay que vivir sencilla, desenfadada y alegremente la vida

**Esther:** por el coraje y orgullo para hacer de nuestra vida lo que queremos.

**Gabriel:** por haber sido el hermano con el que crecí, pero ante todo por el nunca darse por vencido.

**A mis sobrinos:**

**Alvaro, Sandra, Marisol, Laura, Tania, David, Carlos, Angel y Josefina,** así como todos aquellos más que el destino mande: deseo que al leer esta tesis entiendan que la grandeza de triunfar en la vida no es el tener una carrera profesional, sino más bien, es el tener sueños para llevarlos a la realidad

**PORQUE PARA ESTE MOMENTO REQUERI  
DE LA EXPULSION EN LA ESCUELA,  
ESA MISMA TARDE MEDITAR EN UNA BANCA  
DE LA ESTACION DEL METRO PORTALES  
Y FINALMENTE DE 10 AÑOS DE ALUCINANTE OBSESION.**

# INDICE

INDICE.....	1
INDICE DE FIGURAS, ESQUEMAS, TABLAS Y GRAFICOS.....	2
I.-INTRODUCCION.....	3
I.1.-ANTECEDENTES.....	4
I.2.-EL BENZO(a)PIRENO.....	7
I.2.1.-EL BENZO(a)PIRENO ENTRE LOS HIDROCARBUROS POLICICLICOS AROMATICOS.....	7
I.2.2.-METABOLISMO DEL BENZA(a)PIRENO.....	10
I.2.3.-MECANISMO DE ACCION DEL BENZO(a)PIRENO.....	15
I.3.-EL INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS.....	18
I.3.1.-GENERALIDADES DEL INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS.....	18
I.3.2.-EL INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS EN ESPERMATOGONIA DE RATON.....	24
I.4.-LAS ESPERMATOGONIAS EN RATON.....	26
I.5.-LA CICLOFOSFAMIDA.....	30
OBJETIVOS E HIPOTESIS.....	32
II.-OBJETIVOS.....	33
III.1.-OBJETIVO GENERAL.....	33
II.1.1.-OBJETIVOS PARTICULARES.....	33
III.-HIPOTESIS.....	33
MATERIALES Y REACTIVOS.....	34
IV.-MATERIAL.....	35
V.-REACTIVOS.....	37
VI.-METODOLOGIA.....	40
VII.-RESULTADOS.....	45
VIII.-DISCUSION.....	53
IX.-CONCLUSIONES.....	59
X.-REFERENCIAS.....	61

# INDICE DE FIGURAS, ESQUEMAS, TABLAS Y GRAFICOS

<b>Figura: El Benzo[a]pireno.....</b>	<b>8</b>
<b>Esquema No. 1: Rutas metabólicas del Benzo[a]pireno.....</b>	<b>12</b>
<b>Esquema No. 2: Estereoisómeros del 7,8-Diol-9,10-epoxi-benzo[a]pireno.....</b>	<b>13</b>
<b>Esquema No. 3: Mecanismo de activación del Benzo[a]pireno.....</b>	<b>14</b>
<b>Esquema No. 4: Fijación del B[a]P-diolepóxido en la desoxiguanidina.....</b>	<b>16</b>
<b>Figura: Tipo de mutación efectuada en el DNA por el B[a]P.....</b>	<b>17</b>
<b>Figura: Tipos de ICH efectuados en el cromosoma.....</b>	<b>18</b>
<b>Esquema No. 5: Modelo de Painter para la formación del ICH.....</b>	<b>21</b>
<b>Esquema No. 6: La espermatogénesis.....</b>	<b>28</b>
<b>Figura: Ciclofosfamida y Aldofosfamida.....</b>	<b>30</b>
<b>Diagrama de Flujo de la Metodología.....</b>	<b>44</b>
<b>Tabla No. 1: Resultado del B[a]P sobre la frecuencia de ICH en espermatogonia.....</b>	<b>47</b>
<b>Tabla No. 2: Resultado del B[a]P sobre el Tiempo Promedio de Generación.....</b>	<b>48</b>
<b>Gráfico No. 1: Efecto de la concentración del B[a]P sobre el ICH en espermatogonia.....</b>	<b>49</b>
<b>Gráfico No. 2: Gráfica B[a]P Vs. frecuencia de ICH en espermatogonia.....</b>	<b>50</b>
<b>Gráfico No. 3: Regresión Lineal de B[a]P Vs. Frecuencia de ICH en espermatogonia.....</b>	<b>51</b>
<b>Figura: Esquema teórico sobre el tratamiento de los ratones.....</b>	<b>56</b>

# **INTRODUCCION**

# I.- INTRODUCCION

## I.1 ANTECEDENTES

Se tiene estimado a nivel mundial que el 1% de nacimientos expresan algún gen anormal, pero el 0.6 % expresan una anomalía genética mayor (1).

De aproximadamente 4 millones de niños que nacen anualmente en los Estados Unidos, 5% llegan a sufrir alguna enfermedad genética antes de cumplir los 25 años de edad; lo cual representan 200 000 casos de enfermos genéticos cada año; éstas generalmente son: anemia drepanocítica, fibrosis quística, enfermedad de Huntington, entre otras (2). Además se tiene la estadística que del 10 % de las admisiones en hospitales pediátricos de Norteamérica son para cuidados y tratamientos de enfermedades genéticas.

En un estudio de un millón de nacimientos consecutivos, aproximadamente el 8 % desarrollaron una enfermedad genética antes de los 25 años. En otro estudio, de 321 casos con enfermedad genética tipo Mendeliana compatible con la vida, un 25 % de los casos se detectaron al momento del nacimiento; mientras que el 90 % aparecieron antes de finalizar la pubertad. Además las posibilidades de vida se redujeron en un 57 % y la capacidad reproductiva en un 69 %. Solamente entre un 10-15 % de los enfermos respondieron satisfactoriamente a tratamientos terapéuticos (1).

Se ha encontrado que el 15 % de los embarazos reconocidos se pierden antes de las 5 semanas de gestación, de estos el 50 % presentan anomalías cromosómicas. Se estima que entre un 30-50 % de los embarazos no se concluyen; y de ellos una alta frecuencia es por anomalías cromosómicas. Esto representa en buena medida parte de la infertilidad en la pareja (1).

Aunque la mayoría de los desórdenes genéticos se dan por mutaciones preexistentes, otra parte se da por nuevas mutaciones y son transmitidos de una generación a la siguiente (1 y 2). Estas pueden incrementar la susceptibilidad de algunas enfermedades del corazón, diabetes, cáncer y otras(1).

Las causas de nuevas mutaciones no son conocidas, pero algunas son ciertamente espontáneas, resultando de errores en la replicación del DNA o en el mantenimiento de la integridad del cromosoma (2). En un estudio donde fueron examinados 1549 fetos de menos de 20 semanas, 48 resultaron con un simple gen mutado que se podía identificar, pero un 44 % resultaron ser presuntas mutaciones de novo (1).

Las mutaciones recientes pueden haber sido inducidas por la exposición de células germinales a agentes mutagénicos tales como radiaciones ionizantes o químicos. El efecto de la exposición de mutágenos ambientales en el hombre se puede reflejar en la concepción, ya que genes mutados pueden traer abortos, recién nacidos destinados a sufrir enfermedades mentales o desórdenes físicos de por vida o en sus cortas vidas (2).

El hombre esta expuesto a un sin fin de tóxicos ambientales. El Instituto Nacional de Seguridad y Salud Ocupacional de los E.U.A. tiene estimado millones de trabajos que están ligados con agentes potencialmente peligrosos, pero el medio ocupacional no es el único origen de mutágenos, sino además hay que incluir el agua, los sólidos, la atmósfera, los alimentos de consumo humano y los hábitos sociales (3).

Existen dos casos publicados con interés científico en relación al riesgo genético. El primero fue reportado en 1990 donde hubo relación al existir exposición paterna a radiación ionizante en la planta nuclear de Sellafield; y posteriormente se presentó leucemia en su progenie. Los autores del reporte sugirieron que la leucemia pudo haber sido el resultado de mutaciones inducidas por la radiación sobre las células germinales del padre; éste reporte fue seguido por fuerte controversia y una acción legal (2).

El otro reporte es más reciente y fue hecho en una pequeña villa de Hungría, donde extraordinariamente de 15 nacimientos vivos ocurridos en el periodo de 1989 a 1990, 11 estuvieron involucrados en anomalías congénitas, representando el 73 % de los nacimientos; de estos, 4 presentaron Síndrome de Down y aparecieron 3 pares de gemelos, dos dicigóticos y uno monocigóticos. El consumo materno de pescado contaminado con pesticida organofosforado (triclorofón) fue considerado por los autores como el posible responsable de los defectos en los nacimientos (2).

La exposición con agentes mutagénicos puede incrementar la incidencia de desórdenes genéticos en la población humana. Por ejemplo al hacer biopsias de material testicular de varones que recibieron radioterapia contra el cáncer, se encontraron incrementos de aberraciones cromosómicas, cromosomas dicéntricos y translocaciones en espermatozoides y espermatocitos. La capacidad de agentes químicos para inducir aberraciones cromosómicas en células germinales del varón han sido reportados al emplear agentes quimioterapéuticos contra el cáncer. Aunque la quimioterapia es generalmente una combinación de químicos se ha logrado encontrar capacidad mutagénica en la adriamicina, ciclofosfamida y vinicristina que son conocidos como mutágenos en células germinales y o clastógenos en células somáticas (2).

Existe evidencia científica donde mutágenos ambientales actúan sobre células somáticas y germinales. Una variedad de ensayos In Vivo con roedores han dejado en evidencia a más de 20 químicos que inducen mutagenicidad sobre células germinales, tales son los casos del Cloranbucil, Adriamicina, Bleomicina, Melfalan y Platinol (1).

El Oxido de etileno, el Etil-metano-sulfonato, el Dimetil-sulfato y el Dietil-sulfato inducen alta mortalidad en la gestación y desarrollo de anomalías en los nacidos. La Etil-nitroso-urea, el Metil-metano-sulfonato y la Melamina trimetileno inducen alta frecuencia de muerte en la gestación (1).

Interesantes investigaciones han revelado que las células germinales de hembra y macho llegan a presentar diferente comportamiento frente a diferentes agentes químicos como el Platinol, la

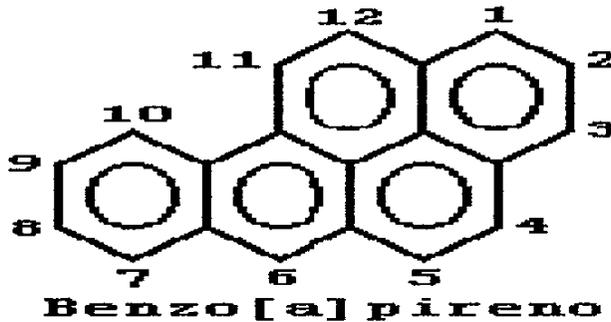
Adriamicina y el Sulfato de hicantoina, debido a que existe letalidad dominante en las ovogonias del ratón hembra, pero no así en las espermatogonias del macho (4).

Comparando diferentes áreas investigadas en mutagénesis, la investigación a nivel de células germinales en mamíferos ha sido poca durante décadas; los pocos estudios hechos han sido en espermatozoides, pero no han habido estudios a nivel de sus células originarias: las espermatogonias (5).

## I.2.- EL BENZO[a]PIRENO

### I.2.1.- EL BENZO[a]PIRENO ENTRE LOS HIDROCARBUROS POLICICLICOS AROMATICOS

El Benzo[a]pireno es un compuesto químico que se encuentra entre el grupo de los Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos. Los Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos ( HPA ) son contaminantes naturales o domésticos (3) que están presentes en la atmósfera, los sólidos, los ríos, los océanos y los alimentos (6); éstos se forman como el producto de la combustión y la pirólisis; están presentes en el petróleo, así como en sus derivados, los aceites usados de motor, los gases de combustión, como partículas en el aire, los alquitranes de hulla, el medio industrial, el asfalto, el humo del tabaco. El tabaco contiene casi 100 HPA, aunque no todos son tóxicos, si son responsables de la mayoría de los cánceres de pulmón y vías respiratorias. Comúnmente se encuentran como contaminantes del procesamiento de los alimentos a nivel de trazas (3, 7 y 8).



Los HPA tal como el Benzo[a]pireno ( B(a)P ), son moléculas muy simples formadas por núcleos bencénicos hidrófobos (no solubles al agua). Cuando dichas moléculas entran en la célula son

biotransformadas a especies más solubles en agua y poder ser eliminadas del organismo. No obstante algunos de estos metabolitos son muy reactivos y pueden fijarse covalentemente al DNA; al producto o unidad de base del DNA donde se fija se denomina "Aducto" y mediante éstos se puede inducir alteraciones como mutaciones o procesos carcinógenos. El método empleado para detectar y cuantificar estos aductos requiere del uso de anticuerpos específicos dirigidos contra el agente genotóxico fijado en el DNA y de su posterior cuantificación mediante fluorescencia (7 y 9).

En un estudio se encontró que los HPA que comúnmente presentan carcinogenicidad, son los que su valor del espectro de resonancia magnética nuclear oscila entre el rango de  $\delta_{av} = 126.80--127.87$  ppm. Esto sin tomar en cuenta que pueden sufrir activación metabólica en el organismo. El valor del B(a)P es de  $\delta_{av} = 127.11$  ppm (10).

Los HPA son potentes inductores de tumores en la piel de ratones; se sabe además, que son menos potentes por ingestión o inhalación y son conocidos como un grupo de compuestos que genera cáncer en el humano. La dosis de B(a)P para inducir tumores estomacales e intestinales en hámster es de 5 mg cada dos semanas por un año o bien 500 ppm en la dieta por más de un año. Los compuestos más cancerígenos son aquellos que están integrados por 5 o 6 anillos fusionados y aquellos que prevalecen con menor frecuencia son los de 3 y 4 anillos. Mediante métodos analíticos y cromatográficos es posible detectarlos a niveles de 1 parte por billón o menos. El humo proveniente de la combustión de los alimentos contiene 1 ppb de B(a)P y otros hidrocarburos; el aceite vegetal crudo contiene altas concentraciones, pero al ser deodorizado o purificado contiene 1 ppb; las carnes asadas a la leña contienen 200 ppb; las carnes al carbón y asadas contienen 50 ug/kg, sin embargo, las que tienen un bajo contenido de lípidos y el pollo alcanzan concentraciones de 10 ug/kg (8).

Los HPA provenientes de las brazas del carbón y la pirólisis quedan depositados sobre las carnes. Modificaciones en las prácticas de cocido como el uso de superficies calientes en el asado de carnes o el no exponer los alimentos al fuego directo reduce enormemente la formación de estos compuestos (8).

Una de las preocupaciones mayores de las autoridades ha sido el reducir o eliminar los carcinógenos en los alimentos, los medicamentos y hasta los cosméticos; es por ello que la concentración del B(a)P en los alimentos de varios países ha sido regulada; por ejemplo 1 ug/kg o menos en las carnes asadas de Alemania (8).

Estudios epidemiológicos han encontrado correlación entre el cáncer y el tipo de dieta, ya que una dieta rica en frutas y vegetales puede disminuir el riesgo de mutaciones y neoplasias. Esto sugiere que los niveles normales del factor antigenotóxico en el organismo humano puede ser insuficiente para prevenir el desarrollo de mutaciones y tumores, pero sí, simultáneamente se brinda una dieta apropiada estos niveles pueden mejorar. Existen estudios In Vitro donde con sistemas bacterianos y eucariotes fueron probados la hemina, pigmentos pirrólicos y la clorofilina, auxiliándose con la fracción S30 del hígado de rata como activador metabólico, frente al B(a)P, y se obtuvo como resultado una inhibición del efecto mutagénico (11 y 12).

### **1.2.2.- METABOLISMO DEL BENZO[a]PIRENO**

El estudio del metabolismo del B[a]P ha sido estudiado mediante técnicas de HPLC, donde mediante el monitoreo de muestras a 254 nm y a diferentes tiempos se han detectado los productos de su metabolismo (13).

El B[a]P como muchos otros compuestos químicos requiere de activación metabólica para lograr su efecto tóxico en el humano, ya que éste por si solo carece de capacidad tóxica y, más bien, sus metabolitos son los responsables de su toxicidad (13, 14 y 15).

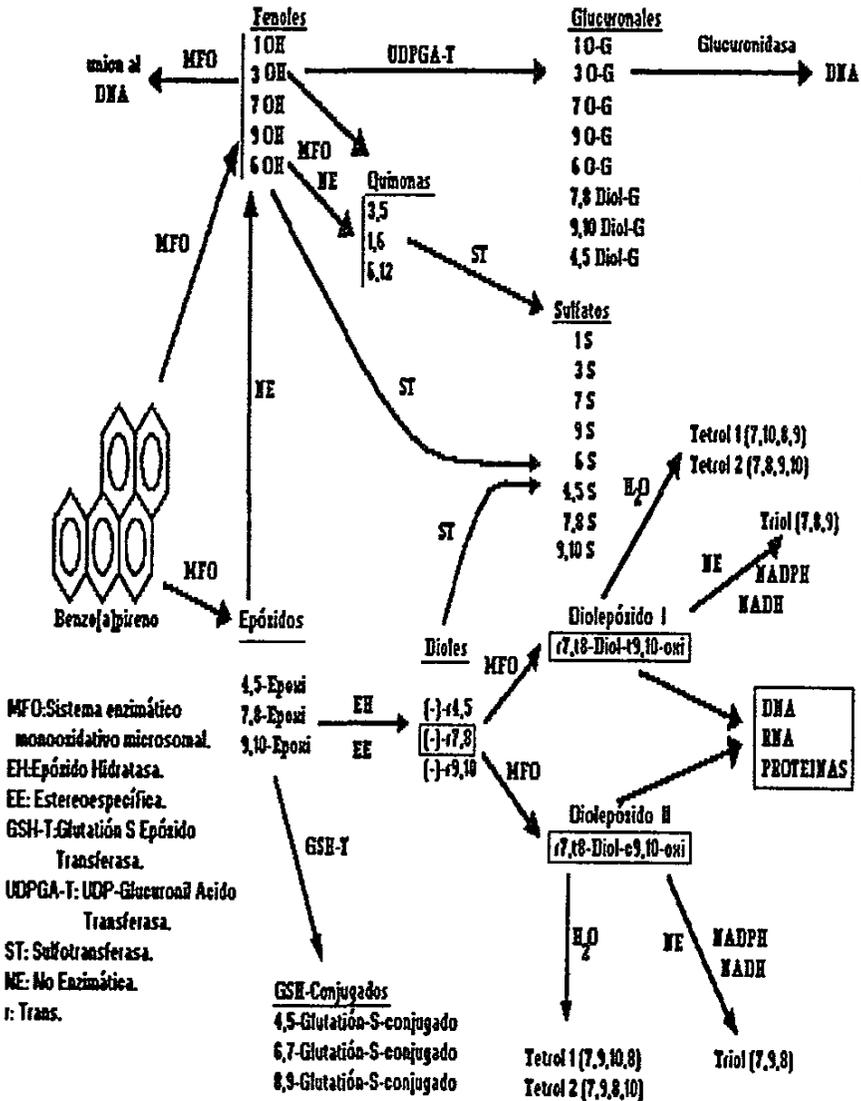
Después de la ingestión, absorción y transportación del B[a]P, comienza su biotransformación por medio del sistema de enzimas monooxigenasas microsomales. Este sistema enzimático esta integrado por las enzimas "citocromo P-450", NADPH y oxígeno atmosférico (6, 7 y 16).

La Citocromo P-450 es todo un conjunto de enzimas que están presentes en la mayoría de tejidos de las especies mamíferas, ellas se encargan de metabolizar y reducir un gran espectro de xenobloticos, incluyendo pesticidas, fármacos, aditivos alimenticios, tóxicos y algunas sustancias endógenas como los esteroides. Se han encontrado aproximadamente 6 tipos, de las cuales, recientemente se purificó la Citocromo P-450 (17  $\alpha$ -IIasa) que es responsable del 30 % de la hidroxilación del B(a)P (6, 17 y 18).

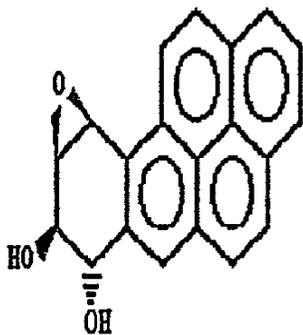
El B[a]P es biotransformado a epóxidos, fenoles y quinonas, así como algunos otros reportes indican la formación del 6-Oxobenzo[a]pireno y 6-Hidroximetilbenzo[a]pireno (6 y 13).

Las rutas metabólicas del B[a]P son diversas, así como sus metabolitos que buscan ser más polares para su eliminación (6 y 16). De todas estas rutas metabólicas se forman fenoles, conjugados glucurónidos, sulfatos, tetroles, trioles, conjugados de glutatión y diolepóxidos como los productos finales de este metabolismo. Para la formación de todos estos productos se requiere de la enzima Citocromo P-450 que se encuentra en retículo endoplásmico y requiere de una cadena de transporte de electrones para su funcionamiento; además de esta enzima actúan otras como la UDP-Acido glucurónido transferasa, la Sulfotransferasa, la Glutatión S epóxido transferasa, la Epóxido reductasa y la Epóxido hidratasa estereoespecífica. Las rutas metabólicas son señaladas en el esquema 1 (6).

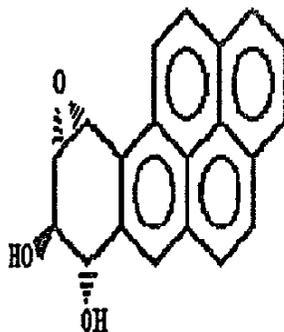
Para la formación del metabolito responsable de la genotoxicidad del B[a]P se sigue particularmente la ruta metabólica donde mediante el sistema enzimático monooxidativo microsomal forma tres epóxidos: el 4,5-Epoxi-benzo[a]pireno, el 7,8-Epoxi-benzo[a]pireno y el 9,10-Epoxi-benzo[a]pireno (6 y 14). Posteriormente con la enzima Epóxido-hidratasa estereoespecífica son transformados a sus tres respectivos dioles, de los cuales podrían presentar isomería cis o trans, pero estas enzimas microsomales únicamente sintetizan al isómero trans y al enantiomero ( - ) y por lo tanto se forman: el ( - )-Trans-4,5-diol-benzo[a]pireno, el ( - )-Trans-7,8-diol-benzo[a]pireno y el ( - )-Trans-9,10-diol-benzo[a]pireno (6 y 14). De estos tres isómeros, el ( - )-Trans-7,8-diol-



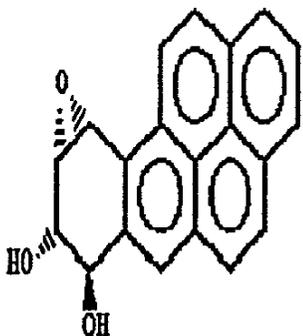
ESQUEMA No. 1. RUTAS METABOLICAS DEL BENZO[a]PIRENO (6).



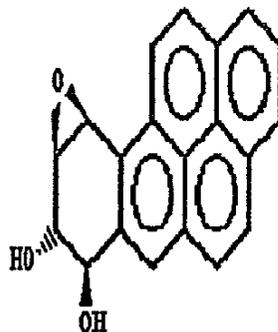
ISOMERO (-) ANTI



ISOMERO (-) SYN



ISOMERO (+) ANTI

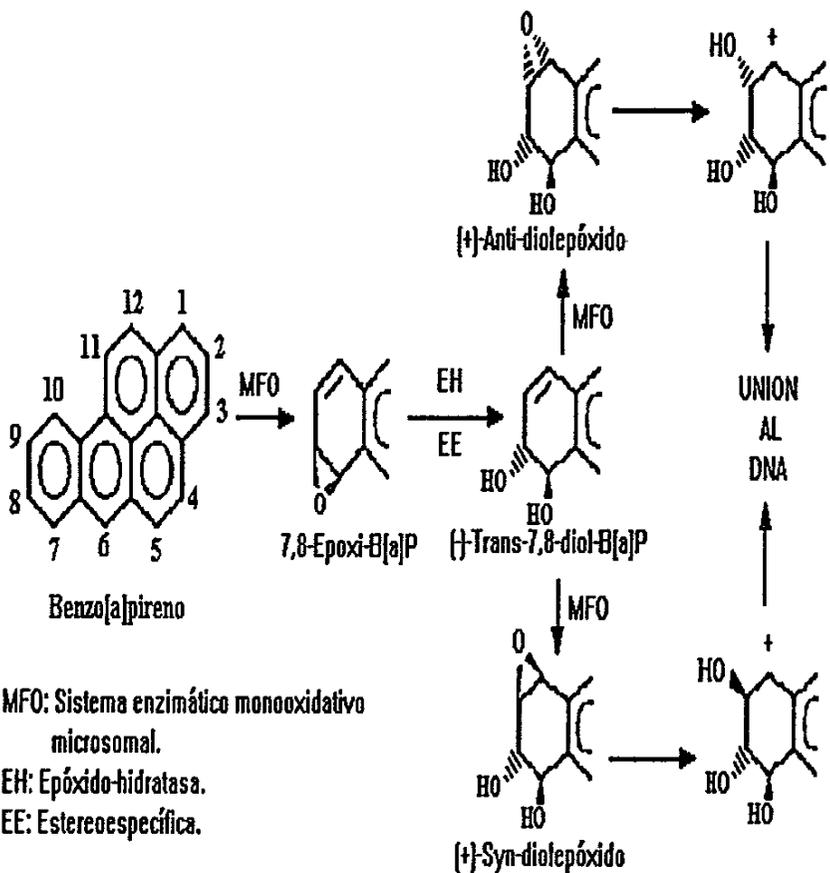


ISOMERO (+) SYN

(7,8-Dihidroxi-9,10-epoxi-B[a]P)

(7,8-Dihidroxi-9,10-epoxi-B[a]P)

ESQUEMA No. 2. ESTEREOISOMEROS DEL 7,8-Diol-9,10-epoxi-benzo[a]pireno (6).



ESQUEMA No. 3. MECANISMO DE ACTIVACION DEL BENZO[a]PIRENO (6 y 10).

benzo[a]pireno es nuevamente metabolizado por el sistema monooxidativo microsomal a dos estereoisómeros: el ( isómero Anti ) 7,8-Dihidroxi-9,10-epoxi-benzo[a]pireno y el ( isómero Syn ) 7,8-Dihidroxi-9,10-epoxi-benzo[a]pireno; es posible la obtención de 4 estereoisómeros por vía enzimática donde existen 2 formas Anti [ ( + )-Anti-7,8-dihidroxi-9,10-epoxi-benzo[a]pireno y ( - )-Anti-7,8-dihidroxi-9,10-epoxi-benzo[a]pireno ] y 2 Syn [ ( + )-Syn-7,8-dihidroxi-9,10-epoxi-benzo[a]pireno y ( - )-Syn-7,8-dihidroxi-9,10-epoxi-benzo[a]pireno ] ( ver el esquema 2 ), de estas la forma del isómero Anti es mucho mas genotóxica que la del isómero Syn (6 y 14). Finalmente el diolepóxido se transforma en un intermediario que reacciona con el DNA, para lo cual se forma el ion carbonio en la posición 10, mediante deslocalización electrónica dando la formación del carbocatión triol que es un agente electrófilo altamente reactivo (6, 10 y 19). Esta ruta metabólica aparece en el esquema 3 (6 Y 10).

### 1.2.3.- MECANISMO DE ACCION DEL BENZO[a]PIRENO

Los metabolitos responsables de fijarse al DNA y formar aductos se rigen por la teoría de "la región bahía" formulada en 1976 por D. M. Jerina, en la cual todos los HPA habrían de transformarse al final de la cadena en un metabolito especial muy reactivo, el diolepóxido, ya que tiene marcada selectividad para fijarse a las bases del DNA. La formación del diolepóxido se produce en una zona especial de la molécula que por su forma estructural se denomina "región bahía", de ahí proviene el nombre de la teoría (10, 20 y 21).

Esta teoría ha sido verificada In Vivo al usar B[a]P-diolepóxido sobre la piel de ratones, para posteriormente extraer el DNA y analizarlo mediante el empleo de anticuerpos dirigidos contra los aductos, para después registrarlos mediante el uso de técnicas fluorescentes (21).

El metabolito que se forma a partir del B(a)P y tiene propiedades carcinogénicas y mutagénicas es el B(a)P-diolepóxido; de éste existen 4 estereoisómeros ( ver esquema 2 ) que se pueden fijar al DNA, pero se ha encontrado que el isómero ( + )-Anti-7,8-dihidroxi-9,10-epoxi-benzo[a]pireno es quien tiene

la mayor capacidad genotóxica, comparado con los otros isómeros ( - )-Anti, ( + )-Syn y ( - )-Syn que tienen una menor estabilidad química (6, 13, 14, 15, 20 y 22).

El isómero ( + )-Anti-7,8-dihidroxi-9,10-epoxi-benzo[a]pireno se transforma al carbocatión triol, mediante una reacción no enzimática y en la cual existe deslocalización electrónica que da paso a la formación del ion carbonio en la posición 10, inmediatamente después, sufre un ataque electrofílico de los nucleófilos celulares tales como el DNA, además, en otros estudios se ha encontrado que también se puede fijar al RNA y proteínas como histonas y no histonas. Esta reacción se lleva a cabo mediante un mecanismo SN2 y resulta un fuerte enlace covalente (6, 10, 13 y 15).

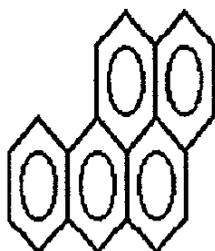
En la formación de los aductos, el ( + )-Anti-7,8-dihidroxi-9,10-epoxi-benzo[a]pireno posee una alta reactividad para fijarse sobre el grupo 2-amino de la desoxiguanidina, también, en otros estudios se ha encontrado sobre el grupo amino hexacíclico de la desoxiadenosina y la desoxicitidina en proporciones bajas (20, 23 y 24). Ver esquema No. 4.

El resultado de esta reacción es un evento mutagénico, donde existe depurinización mediante transversiones y deleciones del siguiente tipo (23 Y 24):

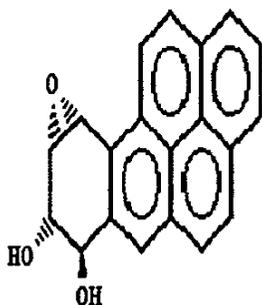


Estudios hechos han indicado que los aductos formados por el B[a]p-diolepóxido pueden ser removidos mediante el mecanismo de reparación por excisión. Este mecanismo requiere de las enzimas endonucleasas y exonucleasas para la remoción del DNA lesionado, inmediatamente actúa la enzima DNA-polimerasa  $\alpha$  y otra no  $\alpha$ , presumiblemente  $\beta$ , que sintetizan el fragmento de DNA lesionado y finalmente es unido al DNA original mediante enzimas ligasas. Se ha encontrado que el

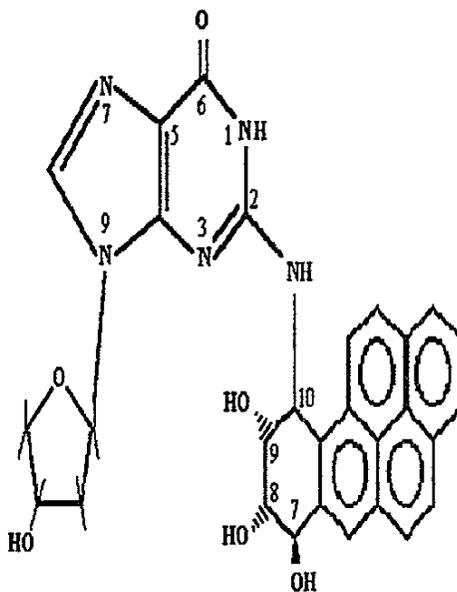
B[a]p-diólepóxido en altas concentraciones inhibe la síntesis del DNA y su mecanismo de reparación por excisión (9 y 25).



Benzo[a]pireno



(+)-Anti-7,8-diol,9,10-epoxy-benzo[a]pireno



ADUCTO

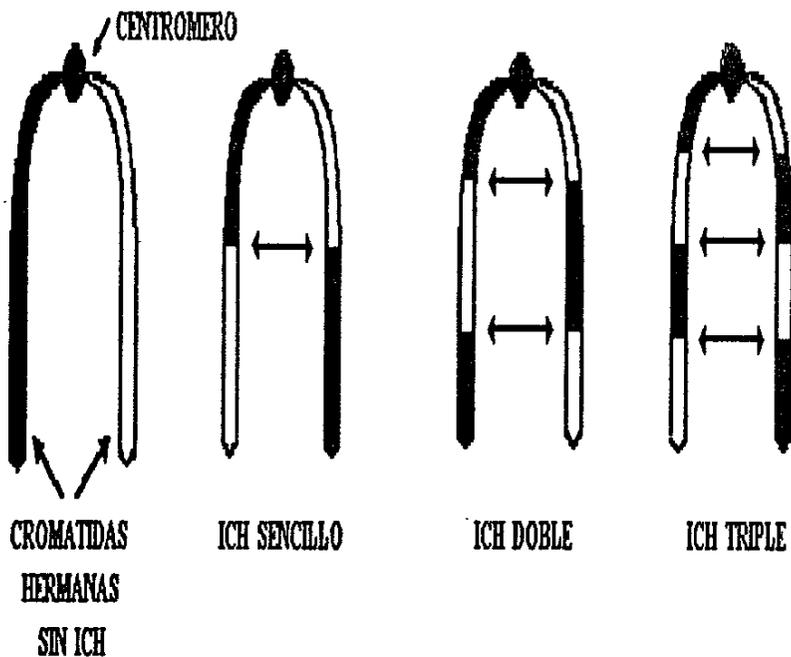
GUANINA-BENZO[a]PIRENODIOLEPOXIDO

ESQUEMA No. 4. FIJACION DEL B[a]P-DIOLEPOXIDO EN LA DESOXIGUANIDINA (20, 23 Y 24).

### I.3.- EL INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS

#### I.3.1.- GENERALIDADES DEL INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS

El análisis del Intercambio de Cromátidas Hermanas ( ICH ) es una técnica que sirve para medir el impacto de agentes mutágenos como carcinógenos sobre los cromosomas, y evaluar el daño al DNA mediante el incremento en la frecuencia de ICH (26),



El ICH representa el intercambio de segmentos homólogos de cromátida en un mismo cromosoma, son percibidos mediante tinciones especiales en preparaciones citológicas de cromosomas metafásicos, donde se observan fragmentos de la cromátida teñida intensamente y su *fragmento homólogo tenue* (26 y 27).

El método del ICH es recomendado para detectar mutagenicidad por parte de la Comunidad Económica Europea y la Organización para el Desarrollo y Cooperación Económica (18), mientras que el Comité de Genética Toxicológica de los EE.UU. lo ha incluido como sistema de prueba para detectar daño genético por diversos agentes (27).

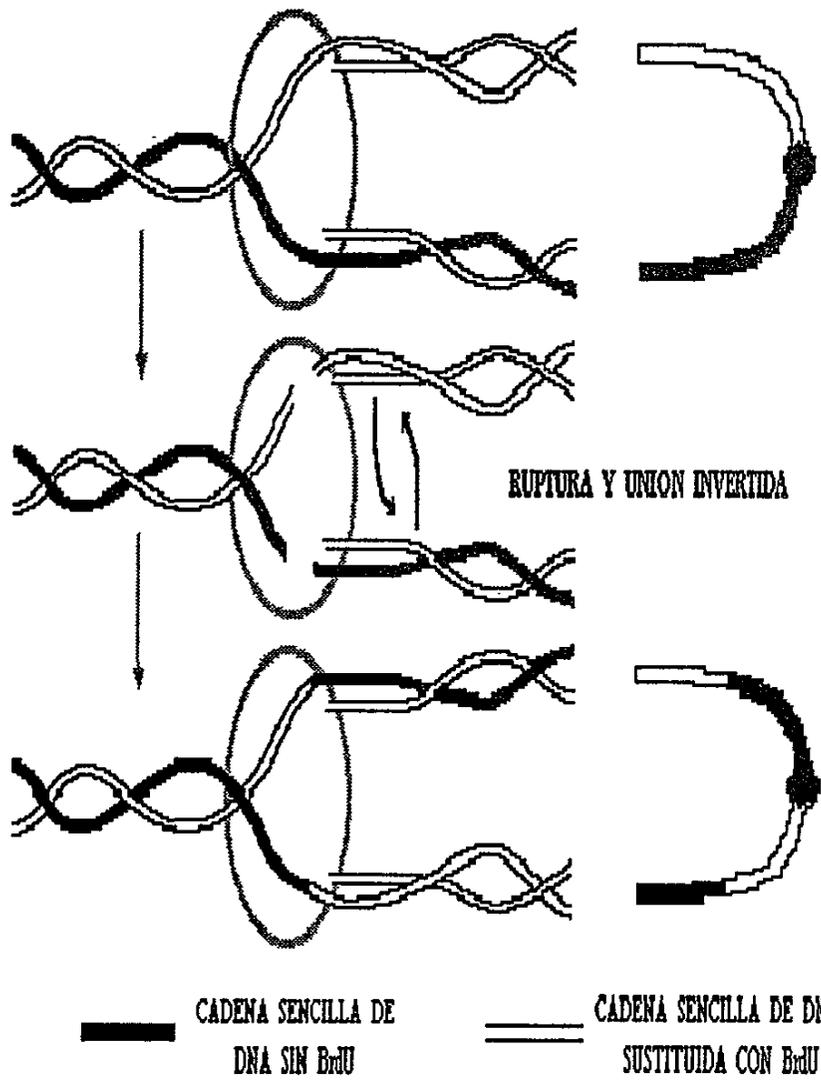
La formación del ICH da información acerca de la estructura del cromosoma, así como la detección de agentes que dañan el DNA o inhiben su síntesis (28); enfermedades de fragilidad cromosómica o predisposición al desarrollo de neoplasias, dentro de estas enfermedades se incluyen el Síndrome de Bloom, Anemia de Falconi y Ataxia Telangiectásica, presumiblemente involucran problemas en los mecanismos de reparación del DNA. Estas tres enfermedades son raras pero siguen una herencia autosómica recesiva, donde los heterocigotos representan entre 1 a 2 % del total de la población, además, en estos individuos aumenta el riesgo de presentar cáncer (26 y 27). Existen estudios donde se han encontrado individuos que presentan cierta predisposición familiar para la aparición de neoplasias y en los cuales, también, se incrementa la frecuencia de ICH, por lo tanto, hace suponer que estos individuos presentan algún defecto en la activación de los mecanismos de reparación del DNA (7 y 29). Esta técnica también puede ser utilizada en el laboratorio clínico para monitorear el daño cromosómico en pacientes que son sometidos a quimioterapia con fármacos clastógenos (26), debido a que se ha encontrado incremento en la frecuencia de ICH en las personas que consumen medicamentos (30); también es útil para detectar genotoxicidad en medicamentos durante su etapa de investigación (31).

Una variedad de agentes químicos y físicos son capaces de inducir ICH, así como el virus SV40. Agentes alquilantes son especialmente efectivos, como también lo son las radiaciones sobre el

DNA (26); por ejemplo, Latt en 1974 observó un incremento en el ICH al emplear Mitomicina C que es un potente mutágeno (32).

Aunque el mecanismo de formación del ICH aún no es conocido, existe un modelo que asegura que es un efecto de la reparación del DNA durante la post-replicación. Se sugiere que el ICH se forma probablemente en ciertas regiones del DNA, particularmente en los sitios dañados (32). Por otra parte hay otra teoría que es la más aceptada, fue hecha por Painter en 1980, donde dice que este fenómeno ocurre al replicarse el DNA, ya que se forman dos cadenas nuevas de DNA entre las cuales existen intercambios de fragmentos homólogos, presumiblemente involucra rompimientos de DNA para su posterior reunión (26, 28 y 32) ( ver esquema No. 5 ). Esto está basado en que durante la fase "S" del ciclo celular, cuando ocurre la replicación del DNA, es el momento en que surge la formación del ICH, ya que al irradiar luz U.V. se potencializa la formación del ICH durante la mitad de la fase S (26). Se dice que las enzimas Topoisomerasas participan en su formación, ya que las Topoisomerasas I y II despiralizan el DNA al momento de replicarse, además, la Topoisomerasa II es capaz de inducir rompimientos de cadena doble de DNA, para posteriormente reunirse de manera intercambiada. Esto se sustenta al usar novobiocina que inhibe la acción de la Topoisomerasa II disminuyendo la formación de ICH (32). Pues bien, se ha estimado que por cada ICH que se forma representa 0.001 a 10 mutaciones que ocurren en 50 000 genes que contiene la célula (26).

Para que pueda ser apreciado el ICH, es necesario que ocurra como mínimo dos ciclos continuos de división celular (7) en presencia de un análogo de base nucleotídica llamado "5-Br-desoxiuridina" ( Brdu ), que es un compuesto con la capacidad de incorporarse al DNA sustituyendo a la Timidina en la cadena sencilla que es sintetizada durante su replicación; por lo tanto, el resultado de metafases de células en primera división serán cromosomas donde sus cromátidas contengan una cadena doble unisustituida de DNA ( una cadena sencilla normal unida a su respectiva cadena sencilla sustituida con Brdu ); mientras que metafases de células en segunda división resultaran cromosomas donde una de sus dos cromátidas contendrá DNA unisustituido y la



ESQUEMA No. 5. MODELO DE PAINTER PARA LA FORMACION DEL ICH (16).

otra estará su cadena doble totalmente sustituida por la Brdu (27). Posteriormente, al someter los cromosomas a una solución de Hoechst 33258, éste se fija a la Brdu para formar un complejo que es removido al contacto con la luz ultravioleta mediante un proceso de fotólisis resultando huecos en el DNA, para lo que sus cargas son estabilizadas con una solución salina de citratos, y finalmente realizar una tinción con Giemsa donde el colorante se fija mayormente a la cromátida con mayor densidad, o bien, en la cromátida que contenía menos Brdu (32). (Ver esquema No. 5).

Para ser posible la obtención de células metafásicas y la aparición de los cromosomas se emplea un compuesto químico llamado colchicina, el cual inhibe la formación del huso acromático y la evolución de la división celular. El ratón que es la especie más comúnmente usada en éste tipo de estudio, cuenta con 40 cromosomas de tipo telocéntrico.

Existen en la prueba de ICH sistemas In Vitro usando cultivos celulares o In Vivo en algún tejido animal, siendo los últimos quienes tienen ventaja, ya que permiten la activación o inactivación metabólica de los agentes químicos genotóxicos (26 y 27).

El análisis de ICH In Vitro requiere de cultivos celulares que puedan realizar por lo menos dos ciclos celulares necesarios para la incorporación de la Brdu, ellos pueden emplear líneas celulares como fibroblastos, ovocitos, V79, ovogonias de Hámster Chino, líneas celulares de pulmón, de piel fetal humana, así como linfocitos humanos. Se pueden emplear especies como rata, ratón, hámster, conejo, también en plantas, insectos, peces y embriones de pollo. El cultivo de linfocitos humanos es el más práctico, debido a la facilidad de obtener las líneas celulares, su buena capacidad de división celular y la facilidad de lectura de los cromosomas humanos; pero sus limitaciones es que carece de activación metabólica (33), como sucedería con el B(a)P, lo cual se puede solucionar al agregar la fracción S9 microsomal del hígado de rata en los cultivos celulares (13, 33 y 34).

El estudio In Vivo del ICH se puede realizar en diversas especies como plantas, insectos, peces y mamíferos. Y los tejidos pueden ser intestinal, fetal, macrófagos alveolares, glándula salival,

epiteliales, hepatocitos, linfocitos de sangre periférica, bazo, células del peritoneo, pulmón y espermatogonia. Sin embargo, el más empleado es en médula ósea (33).

Uno de los principales problemas para el desarrollo de los sistemas In Vivo es el suministro de Brdu a los animales por periodos prolongados, por tal motivo se han ideado diversas maneras de hacerlo, como es el caso de infusión continua de solución de Brdu por vía intraperitoneal o intravenosa (27); otra es mediante su implantación subcutánea en tabletas cubiertas con parafina o agar (27 y 35); mediante una inyección de Brdu en agar fundido (27); o bien, en una inyección vía intraperitoneal de Brdu adsorbido en Carbón Activado y disuelto en agua destilada, según N. Kanda y H. Kato mediante éste último método el Carbón Activado libera constante y controladamente la Brdu (36).

En éste método hay que tomar en cuenta algunas variables que pueden alterar los resultados, como pueden ser: la concentración de Brdu ya que mucho aumenta el rango de ICH (26 y 32), mientras que con poco no se marca el ICH (36); el tiempo de metabolización del agente así como una concentración adecuada que permita el cumplimiento de los dos ciclos de división celular (26 y 32).

Hay un estudio donde se investigó como afecta la edad y sexo al ICH, encontrándose que a razón de como se incrementa la edad en el humano, también, se incrementa la frecuencia de ICH; además, éste aumento se da en mayor proporción en la mujer que en el varón. Por otro lado, al realizarse estudios en hermanos gemelos monocigóticos y dicigóticos se descubrió que no existen variaciones significantes en el número de ICH que aparecen entre hermanos (30).

### **1.3.2.- EL INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS EN ESPERMATOGONIA DE RATON**

El análisis del ICH en espermatogonia de ratón constituye una prueba importante para detectar mutagénesis a nivel de células germinales (37).

Las espermatogonias son células germinales del varón, constituyen un alto riesgo genético sobre todo en presencia de agentes genotóxicos, debido a que están en constante división y dan origen a la población de gametos sexuales (espermatozoides) que al fecundar darán origen a un nuevo individuo (1). El daño genético a tales células se refleja en abortos, malformaciones congénitas y otro tipo de enfermedades genéticas en la descendencia.

El estudio de ICH en espermatogonia de ratón aún se encuentra limitado en comparación a lo existente en células somáticas de mamífero. Una limitante es la toxicidad de la Brdu, ya que la espermatogonia requiere de dos ciclos consecutivos de división celular y cada uno de ellos se realiza en 27 hrs, por lo que es necesario un periodo largo de exposición (38). Como el tiempo de acción de la Brdu es de aproximadamente 14 hrs y se requiere un periodo de 54 hrs para la realización de la técnica (37), N. Kanda y H. Kato sugieren el empleo de Brdu adsorbido en Carbón Activado vía intraperitoneal, ya que existe liberación constante y controlada; además que la cavidad serosa del testículo esta conectada directamente con la cavidad peritoneal en la zona del canal inguinal. De esta forma, Brdu/Carbón Activado están en contacto directo con la túnica albugínea del testículo, por la cual se absorbe la Brdu mediante procesos de difusión incorporándose al interior del sistema arterial testicular para transportarse hasta las espermatogonias (36).

Hay evidencia demostrada que el ICH en espermatogonia de ratón aparecen en proporción baja ante los mutágenos químicos. Un factor que puede explicar esto es la presencia de barreras fisiológicas que limitan la penetración de sustancias hacia el interior de las células germinales;

también puede ser por una alta eficiencia en la reparación o por zonas celulares específicas del genoma donde puede ocurrir el ICH (28).

Las espermatogonias tienen la capacidad de formar una tercera parte de ICH en relación a médula ósea y células de glándula salival en ratón. Aún al ser sometidas a mutágenos, sufren incrementos proporcionales de ICH con respecto a estas dos líneas celulares (28).

## **I.4.- LAS ESPERMATOGONIAS EN RATON**

Las células germinales masculinas se producen en el testículo por un proceso biológico llamado espermatogénesis. Se forman por primera vez en la pubertad, pero representan la culminación de la etapa embrionaria.

Al principio de la vida posnatal el testículo esta integrado por cordones sexuales que contienen los precursores de células de Sertoli y las células de la línea germinal (gonocitos). Al poco tiempo del nacimiento aparecen una forma de espermatogonias primitivas, posteriormente al llegar la madurez sexual los cordones sexuales se ahuecan formando los túbulos seminíferos y aparecen las típicas células de Sertoli e inmediatamente comienza la espermatogénesis. Durante este periodo van apareciendo las espermatogonias, seguidas de espermatocitos primarios y secundarios de la fase meiótica para dar espermátidas, las cuales al madurar llegan a espermatozoides (39).

Las células de Sertoli tienen la función de sostener y nutrir a las células germinales en sus diversas etapas (40).

Las espermatogonias de ratón se dividen en 3 tipos: la tipo A; la intermedia y la tipo B. Las espermatogonias tipo A tienen un núcleo ovoide, pálido o cenizo, con membrana nuclear delgada. *Las espermatogonias tipo B tienen núcleo esférico y chico, su colorido muy profundo debido a las bastas masas de cromatina, recostado sobre el interior de la superficie de la membrana celular.* La espermatogonia intermedia es una forma de transición entre la tipo A y la tipo B, en ella aparece una membrana nuclear espesa causada por hojuelas de cromatina adherente, una profundidad en el colorido nuclear y un cambio gradual en el núcleo de ovalado a redondo.

En un periodo de 30 minutos el 80-90 % de las espermatogonias están en interfase; a la hora el 70 % se encuentran en interfase y 30 % en profase.

La espermatogonia tipo A requiere de 3 ciclos celulares para pasar a espermatogonia tipo intermedia que tiene solamente una generación al igual que la espermatogonia tipo B. Las espermatogonias tipo A son AI, AII, AIII y AIV.

El tiempo del ciclo celular de la espermatogonia tipo AII es de 28-30 hrs; la tipo AIII es 26-28 hrs y la tipo AIV es 30-31 hrs, repartidos de la siguiente forma: periodo de metafase-telofase e interfase es de 9 hrs para tipo AII; la tipo AIII 8.5 hrs y tipo AIV 10.5 hrs. El periodo S o de replicación del DNA es de 7 hrs para AI; la tipo AII es 6 hrs; la tipo AIII 7.5 hrs y en la tipo AIV 12 hrs con gran variabilidad. El periodo G2 y profase se presenta en 14 hrs para AI y AII; mientras para AIII es de 11 hrs y de 8 hrs para AIV.

El tiempo del ciclo celular de la espermatogonia intermedia es de 26-28 hrs. La etapa de metafase-telofase e interfase es de 8.5 hrs. El periodo S o de replicación del DNA es de 12 hrs con gran variabilidad y finalmente el periodo G2 y profase es de 6 hrs.

El ciclo celular de la espermatogonia tipo B es de 29-30 hrs. El periodo de metafase-telofase e interfase es de 10.5 hrs. El periodo S es de 14.5 hrs con gran variabilidad de hasta 20 hrs como máximo; mientras que la etapa G2 y profase es de 4.5 hrs.

El espermatocito primario tiene de 7-10 hrs de metafase-telofase e interfase y del periodo S es de 14 hrs, para enseguida comenzar la meiosis.

El tiempo de la metafase-anafase es de aproximadamente 3 hrs en las espermatogonias tipo AIII, intermedia y tipo B; mientras para la espermatogonia tipo AIV es de aproximadamente 5 hrs (41).

Los espermatocitos son las células más grandes del túbulo seminífero. Además ellas se dividen por meiosis y el resultado de la meiosis I son dos espermatocitos secundarios, que para la meiosis II resultan 4 espermátidas (haploides). Los espermatocitos secundarios tienen la mitad del tamaño

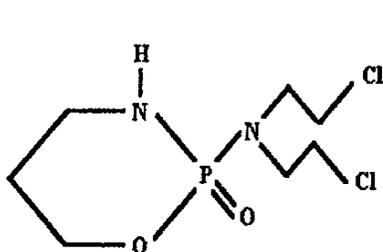


de un primario y se encuentran unidos en pares a razón del espermatocito primario que les dio origen. De estos dos espermatocitos secundarios se forman cuatro espermátidas que tienen forma de gota pequeña.

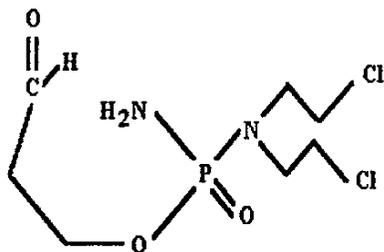
Las espermátidas continúan su maduración y desarrollo morfológico en los túbulos seminíferos hasta la formación de los espermatozoides, para posteriormente migrar y almacenarse en el epidídimo donde adquieren capacidad fecundativa y motilidad para el momento de la eyaculación (40). Ver esquema No. 6.

## I.5.- LA CICLOFOSFAMIDA

La ciclofosfamida ( CCF ) es un compuesto que anteriormente fue empleado como medicamento quimioterápico antineoplásico e inmunopresivo. Sin embargo, es sabido que puede inducir neoplasias secundarias en pacientes con cáncer, además que induce una gran variedad de cambios en el DNA como mutaciones en el genoma de bacterias y en células eucariotes, también induce anomalías cromosómicas en células somáticas y germinales de mamíferos (31, 42 y 43). Perteneció a los agentes alquilantes en particular a las mostazas nitrogenadas de tipo heterocíclico.



CICLOFOSFAMIDA



ALDOFOSFAMIDA

La CCF es un compuesto que requiere activación metabólica con la fracción S9 microsomal para estudiar su genotoxicidad *In Vitro*, ya que sus metabolitos formados son los responsables de la toxicidad (43). *In Vivo* es metabolizada y activada en el retículo endoplásmico liso del hepatocito y del producto de la biotransformación se forma la Aldofosfamida que es la responsable de la actividad citotóxica. Los metabolitos formados aparecen en la sangre entre los 10 y 15

minutos después de administrar la CCF y son excretados en la orina en forma de agentes alquilantes. Su tiempo de vida media en el suero es de 6 a 7 hrs (31 y 44).

La CCF es un buen prototipo para hacer estudios genotóxicos comparacionales a nivel de células germinales, ya que induce una elevada proporción de anomalías cromosómicas en los ovocitos, por otra parte, a dosis de 100 mg/kg éste efecto aparece muy ligero sobre las espermatogonias, pero se incrementa en las espermátidas (4). En otro estudio se encontró que las espermatogonias son menos sensibles a la aparición de aberraciones cromosómicas que al efecto letal de la CCF, lo cual sucede de manera inversa en células de médula ósea (45). Por otra parte, la CCF ha sido investigada en diversos sistemas de ICH como linfocitos de roedor tanto In Vitro como In Vivo, médula ósea, células de glándula salival y células de pulmón, en todas ellas se ha encontrado capacidad para formar ICH (31). Además, al comparar la CCF con otros agentes mutagénicos ya reconocidos como la Mitomicina C, la Procarbazina y la Adriamicina es el compuesto que a niveles por debajo de su DL50 alcanza índices mayores de ICH en espermatogonia (46).

Existen estudios de ICH en médula ósea de ratón donde se ha encontrado que la frecuencia máxima del ICH se realiza entre las 6 hrs antes y las 14 hrs después de administrar la Brdu, tomando en cuenta que el periodo de tratamiento del ratón es de 24 hrs para médula ósea (42 y 47). Ahora bien, hay estudios realizados de ICH en espermatogonia de ratón empleando CCF que indican niveles de 7.5 ICH para dosis de 20 mg CCF/kg peso (48); mientras que otro estudio indica 1.3 y 3.6 ICH en dosis de 0.25 y 25 mg CCF/kg peso respectivamente (49); pero un tercer estudio señala 6.3, 8.69 y 15.01 ICH para las dosis de 5, 10 y 20 mg CCF/kg peso respectivamente (46); aunque existe variación en los datos hay que tomar en cuenta algunas variables de cada estudio como el empleo de ratones de diferente cepa; la administración de CCF que fue entre las 24 y 30 hrs después de iniciar la presencia de Brdu; los diferentes métodos usados para proveer la Brdu; las dosis de Brdu fueron diferentes y finalmente hubo variaciones en el procedimiento de las técnicas (46, 48 y 49).

# **OBJETIVOS E HIPOTESIS**

## **II.- OBJETIVOS**

### **II.1.- OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el efecto genotóxico del Benzo[a]pireno en espermatogonia de ratón.

#### **II.1.1.- OBJETIVOS PARTICULARES**

Determinar la frecuencia de Intercambio de Cromátidas Hermanas que provoca el Benzo[a]pireno en espermatogonias de ratón, a diferentes dosis.

Estudiar el efecto que el Benzo[a]pireno produce en la cinética de proliferación celular de la espermatogonia In Vivo.

Valorar el modelo de estudio genotóxico establecido en espermatogonia, con la finalidad de proponerlo como una forma sensible de valorar probables alteraciones en la progenie.

## **III.- HIPOTESIS**

Si el Benzo[a]pireno incrementa la frecuencia de Intercambio de Cromátidas Hermanas en diversas células somáticas, entonces también lo hará en células germinales.

**MATERIAL  
Y  
REACTIVOS**

## **IV.- MATERIAL**

### **MATERIAL DIVERSO**

1. Piseta con H<sub>2</sub>O destilada.
2. Pipetas de diversos volúmenes.
3. Matraz Erlenmeyer de 25 y 250 ml.
4. Matraz volumétrico de 100 y 250 ml.
5. Vaso de precipitados de 100 y 250 ml.
6. Vasos Coplin.
7. Pipetas Pasteur.
8. Tubos de plástico en "V" para centrífuga.
9. Cajas Petri de plástico.
10. Cubreobjetos y portaobjetos.
11. Jeringas de diversos calibres.
12. Gradilla.
13. Estuche de disección.
14. Mechero.

### **EQUIPO**

1. Balanza granataria.
2. Agitador magnético.
3. Vortex.
4. Baño María.
5. Centrífuga.
6. Balanza analítica.
7. Microscopio óptico.
8. Estufa a 60 °C.
9. Refrigerador.

**10. Cámara con lámpara de luz U.V.**

**11. Jaulas para los ratones.**

## **MATERIAL BIOLÓGICO**

**1. Alimento para los ratones.**

**2.- Ratones machos cepa NIH, entre 27 - 30 g de peso y de alrededor de 2 meses de edad.**

## V.- REACTIVOS

1. Aceite de maíz, SIGMA CHEMICAL CO.

2. Benzo[a]pireno disuelto en aceite de maíz (18).

Disolver el Benzo[a]pireno correspondiente a la dosis en aceite de maíz mediante calentamiento en baño María y el uso del Vortex.

3. Solución de ciclofosfamida [ 20 mg CCF/ ml SSF ].

4. Solución de Colchicina [ 0.9 mg/ ml ] .

5. Solución de PBS ( 1 lt ).

NaCl	10 g.
KCl	0.25 g.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> :2(H <sub>2</sub> O)	1.75 g.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.25 g.

6. Medio de tripsina (1 lt ) (48).

NaCl	8 g.
KCl	0.2 g.
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.05 g.
NaHCO <sub>3</sub>	1 g.
Dextrosa	2 g.

7. E.D.T.A. 40 mM.

Disolver por calentamiento ligero y agitación 1.4896 g de E.D.T.A. en 100 ml del medio de tripsina anterior.

8. E.D.T.A. 4 mM.

Mezclar 20 ml de E.D.T.A. 40 mM en 180 ml de medio de tripsina.

9. Solución de tripsina al 1 %.

10. Solución de KCl [0.075 M].

**11. Solución fijadora ( 3:1 de metanol : ácido acético ).**

**12. Buffer de diferenciación ( citrato/fosfato, pH: 7.0 ) (48).**

1.18 g de Citrato trisódico en 50 ml de H<sub>2</sub>O ( ácido ).

0.221 g de Fosfato de sodio en 1 lt de H<sub>2</sub>O ( base ).

Titular el Fosfato de sodio con el Citrato trisódico hasta llevar a pH=7.0

Diluir 1:1 con H<sub>2</sub>O destilada.

**13. Solución Hoescht [ 1.0 x 10<sup>-5</sup> M ] ( Sol. Stock. ).**

Disolver 0.025 g de Hoescht en 10 ml de H<sub>2</sub>O destilada ( 1.0 x 10<sup>-4</sup> ). ( Solución Stock ).

Tomar 1 ml de solución Stock y adicionar 9 ml de H<sub>2</sub>O destilada, más 10 ml de buffer de diferenciación.

Colocar en un frasco forrado con papel aluminio y guardar en congelación.

**14. Solución salina de citratos (SSC), 1 lt.**

Citratos	8.823 g	[ 0.03 M ]
NaCl	17.532 g	[ 0.3 M ]

**15. Giemsa (46).**

Buffer de fosfatos pH=6.8 5 ml.

Giemsa comercial 2 ml.

Aforar a 50 ml con H<sub>2</sub>O destilada.

**16. Solución de 5-Br-desoxiuridina adsorbido en carbón activado ( BrdU/C. A. ).**

Solución de 5-BrdU 20 mg/ ml de Solución Salina Fisiológica (SSF) inyectable.

Carbón activado 100 mg por 20 mg de 5-BrdU.

Al carbón activado se le da un tratamiento previo que consiste en lavarlo varias veces con NaOH 1.0 N, después con HCl 1.0 N y finalmente con H<sub>2</sub>O destilada hasta que el sobrenadante

tenga el pH del H<sub>2</sub>O destilada. Una vez lavado se seca en un horno a 105 °C y por último se pasa por malla 200.

La mezcla del carbón activado y la solución de 5-BrdU se realiza una hora antes de administrarse (36).

# **METODOLOGIA**

## VI.- METODOLOGIA

1.- Pesar, marcar y verificar el sexo de los ratones.

Se usaron ratones machos cepa NIH, de 27 a 30 g de peso aproximadamente y de alrededor de 2 meses de edad.

2.- Distribuir los ratones en 5 lotes con un número de 5 miembros cada uno.

3.- A cada lote administrar por vía intraperitoneal lo siguiente:

I. Control (-): 0.3 ml de aceite de maíz (18).

II. Dosis I: 10 mg B[a]P/kg peso contenidos en 0.3 ml de aceite de maíz.

III. Dosis II: 100 mg B[a]P/kg peso contenidos en 0.3 ml de aceite de maíz.

IV. Dosis III: 500 mg B[a]P/kg peso contenidos en 0.3 ml de aceite de maíz.

V. Control (+): ciclofosfamida a una dosis de 80 mg/kg peso (48).

4.- Dar 1.5 hr al lote V y 2 hrs al lote I, II, III y IV de tiempo de absorción, antes de continuar el siguiente paso.

5.- Transcurridos los tiempos correspondientes, anestesiarse a los ratones.

6.- Con aguja nueva de 20 x 32 mm, administrar por vía intraperitoneal una dosis de 1.2 mg de 5-Br-desoxiuridina por g de peso del ratón, adsorbidos en carbón activado (15, 28 y 36).

7.- A las 52 hrs administrar colchicina por vía subcutánea a dosis de 7.5 ug/g de peso (28).

8.- Puntualmente después de 3 hrs sacrificar los ratones por dislocación cervical (28).

9.- De inmediato, disectar los testículos.

10.- Colocar en cajas Petri y cubrir con PBS frío (50).

11.- Retirar única y cuidadosamente la túnica albugínea.

12.- Cortar los túbulos seminíferos en fragmentos pequeñísimos con la ayuda de unas tijeras pequeñas (36 y 38).

13.- Pasar el macerado a tubos en "V" de plástico para centrifuga.

14.- Aforar a 10 ml con PBS frío y centrifugar a 2500 r.p.m. por 3 min (50).

15.- Retirar el sobrenadante y resuspender el botón celular.

**16.-** Repetir éstos últimos dos pasos, por un par de veces más, para completar tres lavados.

**17.-** Después, *incubar en baño María un matraz de 25 ml conteniendo el tejido, 8.5 ml de medio para tripsina y 1 ml de sol. de E.D.T.A. 40 mM.*

**18.-** Al llegar a 37 °C adicionar 0.5 ml de tripsina al 1 % y agitar por intervalo de un minuto.

**19.-** Retirar del baño María, y el aglutinado pasarlo por jeringa de 10 ml y aguja de 20 x 32 mm dos veces (36, 48 y 50).

**20.-** Depositar rápidamente la solución en un tubo en "V" y proceder a centrifugar a 2500 r.p.m. x 3 min.

**21.-** Realizar 3 lavados con 10 ml de E.D.T.A. 4 mM a 2500 r.p.m. x 5 min.

**22.-** Resuspender el botón celular en 10 ml de KCl [ 0.075 M ] a 37 °C e incubar en baño María por 7 min.

**23.-** Centrifugar y desechar el sobrenadante (36).

**24.-** Al precipitado agregar poco a poco 8 ml de sol. fijadora y realizar 3 lavados (36).

**25.-** Del botón celular obtenido hacer laminillas en la siguiente forma (48):

a) Sobre una base plana de hielo colocar varios portaobjetos previamente desengrasados con alcohol.

b) Gotear la solución del botón celular sobre los portaobjetos a una altura aproximada de 80 cm.

c) Rápidamente flamear al mechero.

d) Etiquetar por una orilla.

e) Dejar madurar por 24 hr (33).

**26.-** Ahora, realizar tinción diferencial (36, 46, 48 y 49).

a) A las preparaciones, agregar 6 gotas de solución de Hoescht y colocar el cubreobjetos para someterlas a oscuridad por 20 min.

b) Colocar cada laminilla en cajas Petri y adicionarles solución de fosfatos diluida 1:1 al ras del portaobjetos.

- c) Someter las laminillas a luz U.V. por 90 min (36, 48 y 49).
- d) Sacar y enjuagar con agua destilada ó bidestilada.
- e) Sacudir el exceso de agua del portaobjetos.
- f) Colocar los portas en 2SSC previamente calentada a 60 °C e incubar por 15 min a la misma temperatura (33, 48 y 47).
- g) Sacar y enjuagar con agua destilada a 60 °C, después enjuagar con agua fría.
- h) Tefir con Giemsa por 10 min (46).

**27.-** Evaluar microscópicamente con el objetivo de 100x los siguientes parámetros:

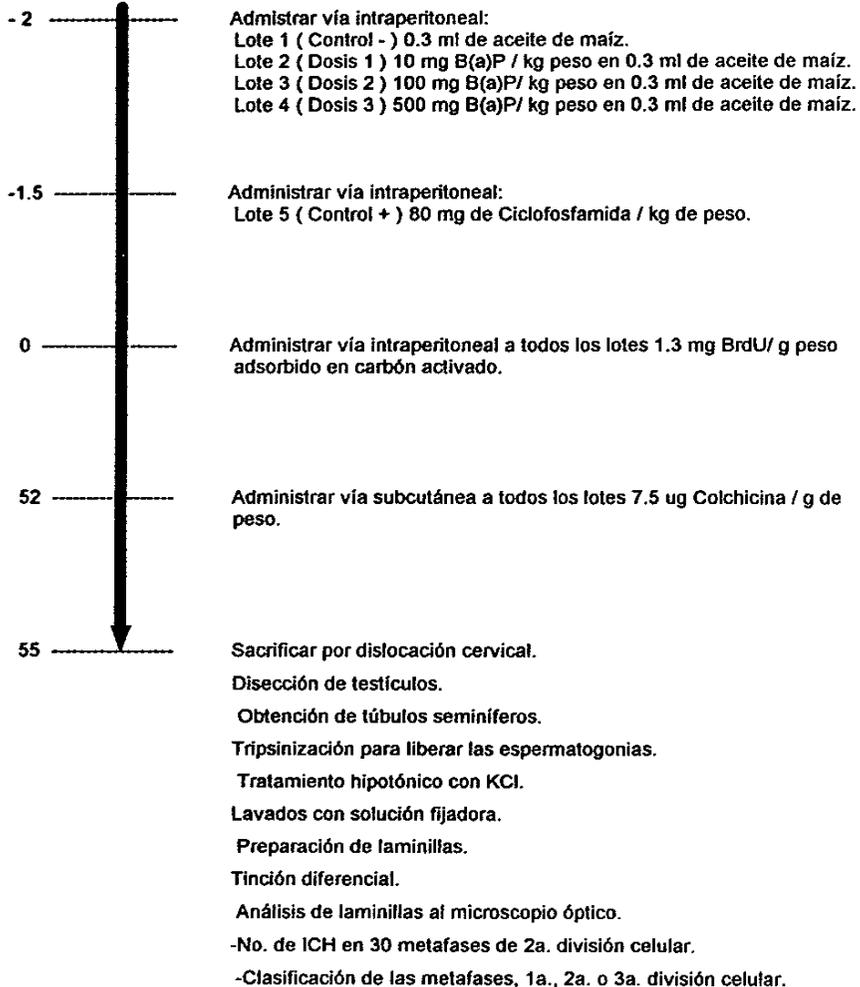
- a) Por cada ratón se estudia la frecuencia del ICH en 30 metafases de 2a. división mitótica.
- b) La cinética de proliferación celular se evalua mediante el Tiempo Promedio de Generación, por cada ratón evaluar 100 metafases al azar y clasificar en 1a, 2a y 3a o más divisiones celulares a razón del patrón de tinción que presenten.

**28.-** A los resultados aplicar el siguiente estudio estadístico:

- a) Realizar la prueba estadística de ANOVA simple en la media de ICH para cada dosis.
- b) Además, realizar la prueba de t-Student o Tuckey con una  $\alpha = 0.05$  a la media del ICH para cada dosis.
- c) Aplicar la prueba de t-Student al Tiempo Promedio de Generación.

## DIAGRAMA DE METODOLOGIA

Hrs.



# **RESULTADOS**

## VII.- RESULTADOS

La diferenciación del ICH y el patrón de tinción resultó favorable para el análisis cromosómico metafásico, esto se logró gracias a la correcta liberación controlada de la BrdU adsorbida en carbón activado.

Los resultados aparecen en las tablas 1 y 2, así como los gráficos 1, 2 y 3.

En la tabla número 1 se muestra como el B(a)P incrementa la frecuencia de ICH en las células germinales del ratón. Se puede hacer un porcentaje de genotoxicidad tomando como parámetros de referencia al control (-) y (+), donde el valor de 0.9 ICH es el 0.0 % y el de 3.94 ICH es el 100 %; por lo tanto, el valor de 1.266 ICH tiene un porcentaje del 12.06 % de genotoxicidad en la dosis de 10 mg B(a)P / kg peso; el valor de 2.22 ICH tiene un 43.42 % de porcentaje genotóxico en la dosis de 100 mg B(a)P / kg peso; mientras finalmente el valor de 5.68 ICH representa un porcentaje del 157.23 % de genotoxicidad para la dosis de 500 mg B(a)P / kg peso.

Se aplicaron las pruebas estadísticas de ANOVA y t-Student con un valor de  $\alpha = 0.05$  sobre las medias del ICH en cada lote, apareciendo diferencias estadísticamente significativas entre el control (-) y el control (+); además el B(a)P a dosis de 100 y 500 mg/kg presenta diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (-); mientras a dosis de 10 mg/kg no es estadísticamente significativa con respecto al control (-), lo cual fue corroborado con la prueba estadística de Tuckey con  $\alpha = 0.05$ . Por otra parte, al analizar el valor de ICH de la dosis de 500 mg/kg frente al control (+) (CCF 80 mg/kg) detectamos que existe diferencia estadísticamente significativa al usar las pruebas de ANOVA y t-Student.

La tabla número 2 indica el Tiempo Promedio de Generación ( TPG ), el cual mediante la expresión matemática  $TPG = ( 52 / [ 1 (1a. Div.) + 2 (2a. Div.) + 3 (3a. Div.) ] ) \times 100$  son analizadas 100 células metafásicas con la finalidad de evaluar al agente genotóxico sobre la cinética del ciclo celular. Ahora bien, si el % del TPG se incrementa con respecto al control (-)

No.	LOTE	TRATAMIENTO	No. DE RATONES METAFASES DE ICH	No. DE RATONES METAFASES DE ICH	No. TOTAL	FRECUENCIA DE ICH
						x +/- D.E.
1	CONTROL (-)	ACEITE DE MAIZ 0.3 ml.	5	150	155	
2	DOSIS 1	B(a)P 10 mg./kg.	5	150	190	
3	DOSIS 2	B(a)P 100 mg./kg.	5	150	133	
4	DOSIS 3	B(a)P 500 mg./kg.	5	150	852	
5	CONTROL (+)	CCF 80 mg./kg.	5	150	591	

\* RESULTADO ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVO CON RESPECTO A CONTROL (-) EMPLEANDO T-STUDENT  $\alpha = 0.05$

TABLA No. 1. RESULTADOS DEL B(a)P SOBRE LA FRECUENCIA DE ICH EN ESPERMATOGONIA DE RATON.

No.	LOTE	TRATAMIENTO	No. DE RATONES	TIPO DE DIVISION			TPG +/- D.E.
				1a.	2a.	3a.	
1	CONTROL (-)	ACEITE DE MAIZ 0.3 ml.	5	5	94.4	0.6	28.69 +/- 0.28
2	DOSIS 1	B(a)P 10 mg./kg.	5	0.8	99.2	0	29.70 +/- 0.102
3	DOSIS 2	B(a)P 100 mg./kg.	5	2	98	0	28.76 +/- 0.28
4	DOSIS 3	B(a)P 500 mg./kg.	5	1.2	97.2	1.6	28.94 +/- 0.19
5	CONTROL (+)	CCF 80 mg./kg.	5	6.4	93	0.6	28.78 +/- 0.32

\* RESULTADO ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVO CON RESPECTO A CONTROL (-) Y (+) CON LA PRUEBA DE T-STUDENT Y  $\alpha=0.05$

TABLA No. 2. EFECTO DEL BENZO(a)PIRENO SOBRE EL TIEMPO PROMEDIO DE GENERACION.



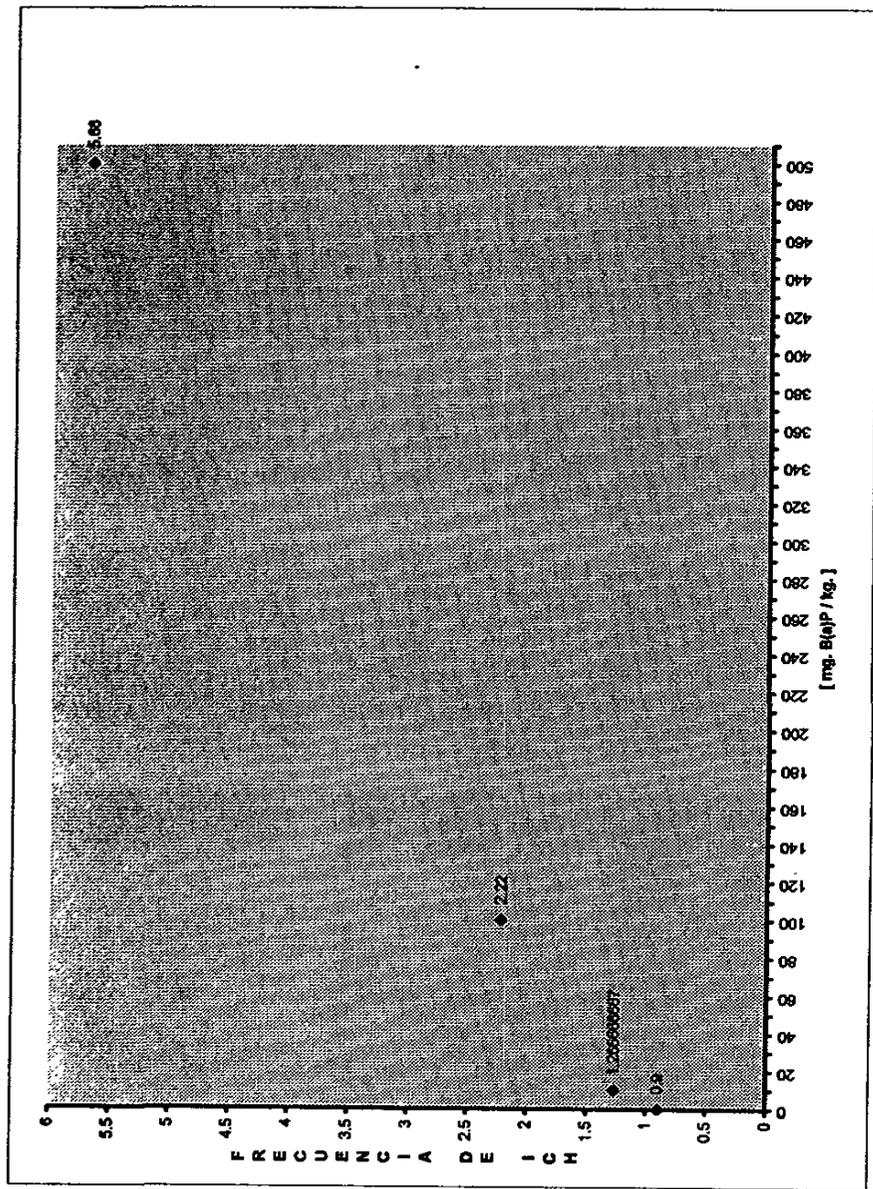


GRAFICO No. 2. GRAFICA [BENZO(a)PIRENO] Vs. FRECUENCIA DE ICH EN ESPERMATOGONIA DE RATON.

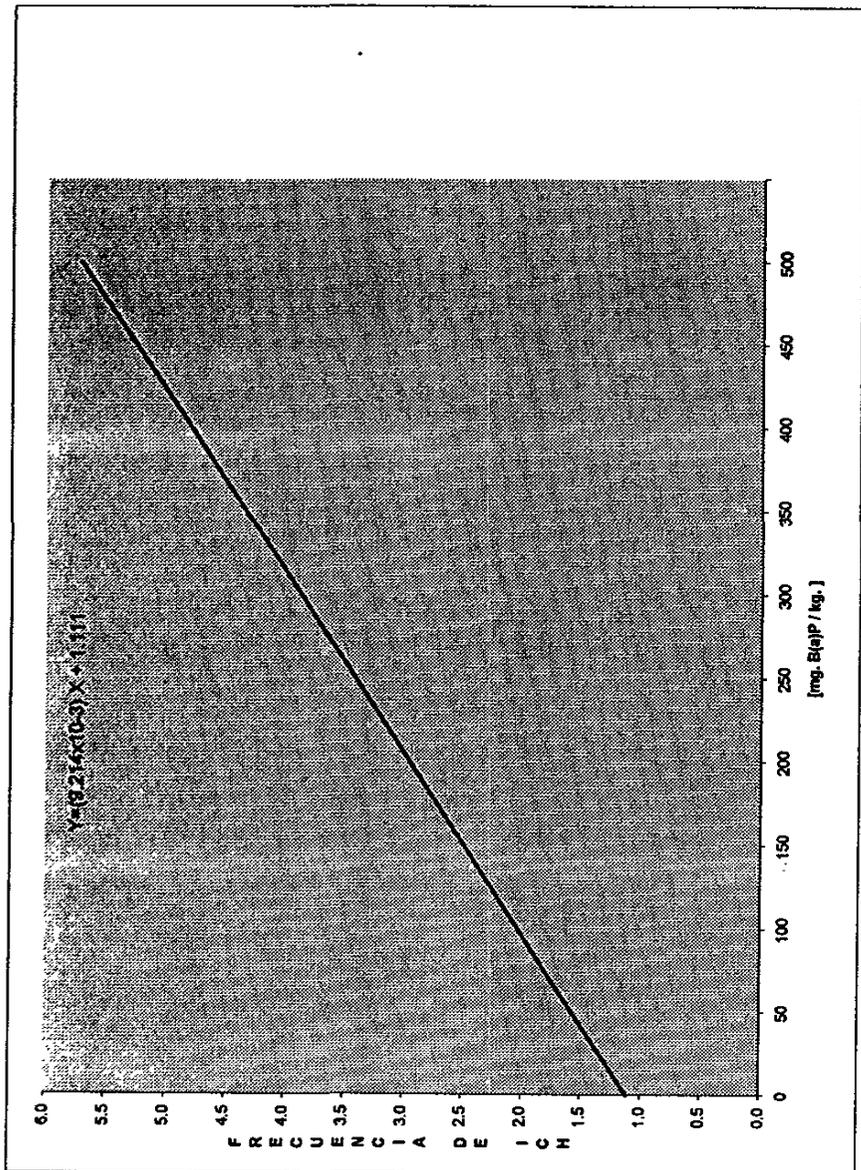


GRAFICO No. 3. REGRESION LINEAL DE [BENZO(a)PIRENO] Vs. FRECUENCIA DE ICH EN ESPERMATOGONIA DE RATON.

existe inhibición del ciclo celular, mientras que una disminución representa aceleración en el ciclo celular. Para poder comparar los TPG de cada lote se realizaron las pruebas estadísticas de ANOVA y t-Student con un  $\alpha=0.05$ . Pues bien, los resultados no muestran diferencias estadísticamente significativas entre los TPG del control ( - ) y el ( + ), así como para las dosis de 10 y 100 mg B(a)P / kg; pero al comparar el TPG del control ( - ) frente a la dosis de 500 mg B(a)P/kg aparece diferencia estadísticamente significativa, y más aún con respecto al control ( + ).

El gráfico número 1 de la frecuencia de ICH muestra como las barras de B(a)P se incrementan con respecto a la dosis. En la dosis de 10 y 100 mg B(a)P / kg peso se mantienen dentro del rango de los controles ( - ) y ( + ), más sin embargo para la dosis de 500 mg B(a)P / kg peso supera con facilidad la altura de la barra del control ( + ), indicando un fuerte efecto genotóxico.

En el gráfico número 2, donde aparecen los valores experimentales de la frecuencia de ICH, se observa un marcado comportamiento lineal de la curva, éste se incrementa proporcionalmente al aumento en la concentración del B(a)P. En la última dosis de 500 mg B(a)P / kg sobrepasa fácilmente el umbral del control ( + ).

Mediante el empleo de las tres dosis de B(a)P y además del control ( - ) fue realizada la regresión lineal, para graficar el comportamiento lineal que presenta el incremento en el número de ICH en espermatogonia de ratón frente a las dosis del B(a)P. El comportamiento responde matemáticamente a la ecuación lineal de  $Y = ( 9.214 \times 10^{-3} ) X + 1.111$ ; con un coeficiente de correlación de  $r=0.997$ . Esta relación se observa en el gráfico número 3.

# **DISCUSSION**

## VIII.- DISCUSION

El diseño de éste experimento fue elaborado en función de las ventajas y desventajas que implica el suministro de BrdU adsorbido en carbón activado (BrdU/C.A.). Como menciona Morales (27) el mayor de los problemas para la elaboración del ICH In Vivo es el suministro de BrdU por periodos prolongados, es por ello que esta forma de proveer la BrdU es ideal para el estudio del ICH en espermatogonia de ratón ya que existe liberación constante y controlada por un periodo de *tiempo suficiente para cubrir las 55 hrs que dura el ensayo*. Gracias a esto, fue posible la obtención de una diferenciación y patrón de tinción del ICH con buena calidad.

Así como existen ventajas en el empleo de BrdU adsorbido en carbón activado también existen desventajas, debido a como lo citan algunos investigadores el carbón activado puede adsorber al agente químico en estudio al estar ambos en contacto y de cierta forma abatir el potencial genotóxico; precisamente por ésta desventaja se decidió administrar el B(a)P dos horas antes que la BrdU/C.A.. Cabe mencionar que es recomendado la administración del agente químico por vía intraperitoneal, cuando por ésta vía sea, antes que la BrdU/C.A. por un periodo de tiempo razonablemente suficiente para su absorción; o bien, mediante el empleo de otra vía de administración (27), lo cual fue descartado por las propiedades fisicoquímicas del B(a)P y del aceite de maíz que fue su vehículo de administración.

El B(a)P es un compuesto que desde hace varios años ha sido investigado en organismos procariones y eucariotes, así como en sistemas In Vitro e In Vivo (3), como son los casos de la prueba de Ames (12 y 34), cultivos celulares V79 de Hámster Chino (11), cultivos celulares de mono (24), de diversos mamíferos y en piel de ratón (15) para lo que en todos han aparecido mutaciones en el DNA; también se han realizado otras investigaciones como la prueba de micronúcleos y aberraciones cromosómicas (18) resultando positivas en ambas; por otra parte, se ha aplicado ampliamente la prueba del ICH en el B(a)P, como son los casos del ICH en médula ósea de Hámster Chino, rata y ratón (18, 51 y 52) manteniéndose altos los niveles hasta 4 meses

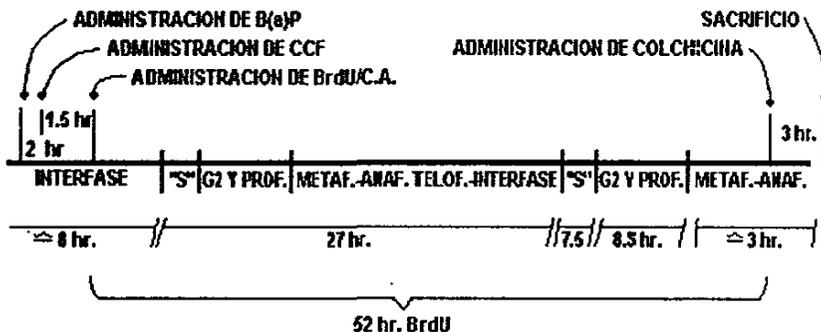
después de haberse administrado el B(a)P en esta última especie, además existen estudios de ICH en linfocitos humanos con resultados semejantes (29). Uno de los pocos estudios aún no realizados al B(a)P es el ICH en células germinales ya que todo está elaborado en células somáticas; a pesar de esto hay un estudio de ICH en ovogonias de Hámster Chino teniendo incremento en la frecuencia del ICH (14) y además otro estudio con baja actividad mutacional del B(a)P sobre el DNA de espermatozoides de fluido seminal humano (34); más sin embargo, no existía el ICH en espermatogonia de ratón. Por ello nace la inquietud de éste trabajo donde en base a los resultados experimentales queda en evidencia el potencial genotóxico del B(a)P sobre las espermatogonias así como ha sido demostrado con anterioridad sobre células somáticas.

Ahora bien, los resultados muestran claramente que el B(a)P tiene un efecto lineal en el incremento de la frecuencia del ICH en espermatogonia de ratón y éste incremento va a estar en función de la dosis administrada de B(a)P, como lo menciona U. Bayer y T. Bauknecht en médula ósea de Hámster Chino (51). Este comportamiento es matemáticamente graficable mediante la ecuación lineal  $Y = (9.214 \times 10^{-3})X + 1.111$ .

Además, mediante el empleo de las pruebas estadísticas de ANOVA, t-Student y Tuckey con un valor de  $\alpha = 0.05$  mostraron que las dosis seleccionadas de 100 y 500 mg B(a)P/kg tienen actividad estadísticamente significativa de genotoxicidad sobre las espermatogonias de ratón; más aún el B(a)P a la dosis de 500 mg/kg resultó tener un 57.23 % más de genotoxicidad que el control (+) Ciclofosfamida 80 mg/kg, lo cual tiene mucha importancia debido a que en todos los estudios realizados en espermatogonia de ratón la Ciclofosfamida había sido el mutágeno que mayor número de ICH había inducido en esta línea celular (45, 46 y 48); habría que decir, que si bien, la dosis de 500 mg B(a)P/kg es muy alta de igual manera lo es 80 mg CCF/kg, por tal motivo no se le debe restar importancia.

Existen dos factores muy importantes y que deben ser tomados en cuenta para poder relacionar resultados entre las espermatogonias y otras líneas celulares, estos son la toxicocinética del agente y los tiempos del ciclo celular de cada línea celular en estudio debido a que el agente

mutagénico, háblase del metabolito activo o del compuesto sin metabolizar cuando éste sea el causante del daño, tiene que haber causado su efecto al DNA precisamente poco antes del periodo S del ciclo celular, ya que en éste período es donde ocurre la formación del ICH.



Por tal motivo este estudio, donde se administró el B(a)P dos horas antes que la BrdU, puede ser comparado con otros dos trabajos In Vivo donde fue administrado el B(a)P 4 hr después que la BrdU en el caso de ICH en médula ósea de Hámster Chino y otro donde se administró simultáneamente el B(a)P y la BrdU para médula ósea de ratón. En ellos se ha encontrado niveles de 3.6 ICH en médula ósea de Hámster Chino (51) y 4.5 ICH en ratón (18) a dosis de 10 mg B(a)P/kg que comparados al 1.266 ICH en espermatogonia obtenidos a la misma dosis representa alrededor de una tercera parte de lo generado en médula ósea; a dosis de 100 mg B(a)P/kg en Hámster Chino alcanza los 8.2 ICH (51) y al comparar con el 2.22 ICH en espermatogonia esta entre 3 y 4 veces la respuesta, mientras que en médula ósea de ratón a dosis de 50 y 150 mg B(a)P/kg se eleva a 6.0 y 8.2 ICH respectivamente (18), lo que supondría a una dosis de 100 mg B(a)P/kg sería aproximadamente entre 3 y 4 veces más el número de ICH en espermatogonia; finalmente a dosis de 500 mg B(a)P/kg no hay suficientes reportes con quien comparar, únicamente a dosis de 250 mg B(a)P/kg que fue de 11.4 ICH en médula ósea de ratón (18) pero por el rango de concentración tan amplio no sería acertado sacar deducciones. De cualquier forma

los resultados sugieren que las espermatogonias de ratón tienen la capacidad de formar una tercera parte del ICH con respecto a médula ósea, como lo menciona Morales al comparar la frecuencia de ICH en espermatogonia de ratón frente a médula ósea y células de glándula salival. Esto se puede atribuir a la presencia de barreras fisiológicas que limitan el movimiento de sustancias hacia las células germinales y además por presentar una alta eficiencia en los sistemas de reparación del DNA (28).

El valor del control ( - ) fue de 0.9 ICH que comparado con otros estudios de ICH en espermatogonia de ratón fue bajo con respecto al estudio de M. T. King con 1.3 ICH (48) y el más alto de A. Russo con 2.08 ICH (36), obviamente hay que tomar en cuenta algunas variables entre estos trabajos y el presente, como son las características genéticas de los ratones, la edad, el peso, el estado físico y sobre todo el tipo de suministro de BrdU ya que la concentración alta de BrdU eleva el ICH, es por lo cual la BrdU adsorbida en carbón activado tiene su ventaja al liberar concentraciones bajas y de manera constante (27).

Por otra parte, el Tiempo Promedio de Generación TPG es un parámetro matemático que evalúa al agente genotóxico para provocar una posible inhibición o aceleración del ciclo celular mediante el incremento o disminución respectivamente de su valor normal (43). Por lo tanto, los resultados marcan al B(a)P como un agente que a dosis muy altas acelera el ciclo celular de las espermatogonias, ya que únicamente existen diferencias estadísticamente representativas entre el % de TPG de la dosis de 500 mg B(a)P/kg frente a los controles, tanto el ( - ) como el ( + ), empleando las pruebas estadísticas de ANOVA y t-Student con un valor de  $\alpha = 0.05$ .

Finalmente es importante mencionar que si por una parte el B(a)P a dosis muy alta afecta los tiempos del ciclo celular de la espermatogonia por otra parte también lo hace con la vida de ésta, debido a que fue observado que dependiendo de la dosis de B(a)P administrada se abaten considerablemente las cantidades de células al microscopio. Lo cual convierte al B(a)P en un agente además de genotóxico también citotóxico a nivel de células germinales.

# CONCLUSIONES

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## IX.- CONCLUSIONES

- 1.- El Benzo[a]pireno es un compuesto que incrementa la frecuencia del intercambio de Cromátidas Hermanas en espermatogonia de ratón de forma matemáticamente lineal dependiendo de la dosis.
  
- 2.- El Benzo[a]pireno a la dosis más alta empleada en éste estudio acelera los tiempos del ciclo celular de la espermatogonia, y más aún se observa necrosis sobre esta línea celular a razón de como aumenta la dosis.
  
- 3.- La técnica del Intercambio de Cromátidas Hermanas en espermatogonia de ratón es una técnica que induce una tercera parte de ICH con respecto a células somáticas de ratón In Vivo, con la gran salvedad que un incremento en la frecuencia de ICH, por ligero que parezca, representa un sin número de gametos masculinos mutados que muy probablemente se reflejen en el ser vivo al que den origen.

# REFERENCIAS

## X.- REFERENCIAS

- 1.- D.,Shelby M., J. B. Bhisop, J. M. Mason, and K. R. Tindall. (1993). Fertility, Reproduction and Genetic Disease: Studies on the Mutagenic Effects of Environmental Agents on Mammalian Germ Cells. *Environ. Health Perspectives*. 100: 283-291.
2. D., Shelby Michael. (1994). Human Germ Cell Mutagens. *Envinmental and Molecular Mutagenesis*. 23: 30-34.
- 3.- Madrigal-Bujaidar, E., N. Velázquez-Guadarrama, S. Díaz Barriga. (1997). Inhibitory effect of chlorophyllin on the frequency of sister chromatid exchanges produced by benzo[a]pyrene in vivo. *Mutation Res*. 388:79-83.
- 4.- Tease, Charles. (1992). Radiation- and chemically-induced chromosome aberrations in mouse oocytes: A comparison with effects in males. *Mutation Res*. 296: 135-142.
- 5.- B., Russell Liane. (1994). Role of Mouse Germ-Cell Mutagenesis in Understanding Genetic Risk and in Generating Mutations That Are Prime Tools for Studies in Modern Biology. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 23, Supplement 24: 23-29.
- 6.- V., Gelboin Harry. (1980). Benze[a]pyrene Metabolism, Activation, and Carcinogenesis: Role and Regulation of Mixed-Function Oxidases and Related Enzymes. *Physiological Reviews*. 60: 1107-1161.
- 7.- L., Thompson Claudia, Zadock McCoy, Jane M. Lambert, Maria J. Andries, and George W. Lucier. (1989). Relationships among Benze[a]pyrene Metabolism, Benze[a]pyrene-diol-epoxide: DNA Adduct Formation and Sister of Chromatid Exchanges in Human Lymphocytes from Smokers and Nonsmokers. *Cancer Research*: 4: 6503-6511.
- 8.- Lijinsky, William. (1991). The formation and occurrence of polynuclear aromatic hydrocarbons associated with food. *Mutation Res*. 259: 251-261.
- 9.- Kun, Jong Park, Jung Sup Lee, In Soon Choi and Sang Dai Park. (1991). Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbon-induced single strand breaks is attributed to slower rejoining

processes by DNA polymerase inhibitor, cytosine arabinoside in CHO-K1 cells. *Life Sciences*. 48: 1255-1261.

10.- Sakamoto, Yohko, Shigeru Ohshima and Taichi Ohmoto. (1992). Relations between the Averaged C Nuclear Magnetic Resonance Chemical Shift and the Carcinogenic Activity of Polycyclic Hydrocarbons. *Chem. Pharm. Bull.* 40 (8):1981-1985.

11.- Yoichi Katoh, Nobuo Nemoto, Machiko Tanaka and Shozo Takayama. (1993). Inhibition of benzo[a]pyrene-induced mutagenesis in Chinese hamster V79-cells by hemin and related compounds. *Mutation Res.* 121: 153-157.

12.- Peryt, Bogumila, Joanna Milozewska, Barbara Tudek, Maria Zielenska and Teresa Szymczyk. (1988). Antimutagenic effects of several subfractions of extract from wheat sprout toward benzo[a]pyrene-induced mutagenicity in strain TA98 of *Salmonella typhimurium*. *Mutation Res.* 206: 221-225.

13.- Lo, Jacono F., C. Stecca and M. Duverger. (1992). Mutagenic activation of benzo[a]pyrene by human red blood cells. *Mutation Res.* 268: 21-26.

14.- Pal, Kalyani, Philip L. Grover and Meter Sims. (1980). The induction of sister-chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells by some epoxides and phenolic derivatives of benzo[a]pyrene. *Mutation Res.* 78: 193-199.

15.- F., Newbold Robert, Peter Brookes. (1976). Exceptional mutagenicity of a benzo[a]pyrene diol epoxide in cultured mammalian cells. *Nature*. 261: 52-54.

16.- Velázquez Guadarrama N. (1993). Tesis de licenciatura: Efecto inhibitorio de la clorofilina sobre la frecuencia de Intercambio de Cromátidas Hermanas producido por el Benzo[a]pireno In Vivo. Instituto Politécnico Nacional, Escuela de Ciencias Biológicas.

17.- Mochizuki, Hideo, Shiro Kominami and Shigeki Takemori. (1988). Examination of differences between benzo[a]pyrene and steroid hydroxylases in guinea pig adrenal microsomes. *Biochimica et Biophysica Acta.* 964: 83-89.

18.- Kliesch, U., I. Roupova and I.-D. Alder. (1982). Induction of chromosome damage in mouse bone marrow by benzo[a]pyrene. *Mutation Res.* 102: 268-273.

- 19.- Cavalieri, Ercole L., Eleanor G. Rogan, Prabhakar D. Devanesan, Paolo Cremanesi, Ronald L. Cerny, Michael L. Gross, and William J. Bodell. (1990). Binding of Benzo[a]pyrene to DNA by Cytochrome P-450 Catalyzed One-Electron Oxidation in Rat Liver Microsomes and Nuclei. *Biochemistry*. 29: 4820-4827.
- 20.- C., MacLeod Michael, Gerald Adair, Anne Daylong, Linda Lew and Ronald M. Humphrey. (1991). Low absolute mutagenic efficiency but high cytotoxicity of a non-bay region diol epoxide derived from benzo[a]pyrene. *Mutation Res.* 261: 281-293.
- 21.- Lecoq, Sophie, (1995). Cáncer los Sinuosos Caminos de los Hidrocarburos. *Mundo Científico*. 143: 174 y 175.
- 22.- C., MacLeod Michael, Anne Daylong, Gerald Adair and Ronald M. Humphrey. (1991). Differences in the rate of DNA adduct removal and the efficiency of mutagenesis for two benzo[a]pyrene diol epoxides in CHO cells. *Mutation Res.* 261: 267-279.
- 23.- F., Moran Michael, and Kaney Ebisuzaki. (1991). In vivo benzo[a]pyrene diol epoxide-induced alkali-labile sites are not apurinic sites. *Mutation Res.* 262: 79-84.
- 24.- Roilides, Emmanuel, Jacques E. Gielen, Narendra Tuteja, Arthur S. Levine and Kathleen Dixon. (1988). Mutation specificity of benzo[a]pyrene diolepoxide in monkey cells. *Mutation Res.* 198: 199-206.
- 25.- Ishiguro, Tohru, Fuminori Otsaka, Takafumi Ochi and Motoyasu Ohsawa. (1987). Involvement of DNA polymerases in the repair of DNA damage by benzo[a]pyrene in cultured Chinese hamster cells. *Mutation Res.* 184: 57, 63.
- 26.- Latt, A. Samuel, Rhona R. Schreck, Kenneth S. Loveday , and Charles F. Shuler. (1979). In Vitro and In Vivo Analysis of Sister Chromatid Exchange. *Pharmacological Reviews*. 30: 501-533.
- 27.- Morales, Ramírez Pedro. (1988). El daño a la información genética y los intercambios entre cromátidas hermanas. *Ciencia y Desarrollo*. 81: 65-73.
- 28.- Morales-Ramírez, P., M. T. Mendiola-Cruz, T. Vallarino Kelly, and R. Rodríguez-Reyes. (1994). Comparison of Sister Chromatid Exchange Induction in Murine Germinal and Somatic Cells by Gamma Radiation Exposure In Vivo. *Environmental Molecular Mutagenesis*. 24: 89-95.

- 29.- Dosaka, Hirotohi, Syuiti Abe, Motomichi Sasaki, Hiroshi Miyamoto and Yoshikazu Kawakami. (1987). Sister Chromatid Exchange Induction by benzo[a]pyrene in cultured peripheral blood lymphocytes of lung cancer patients and healthy individuals with or without familial history of neoplasms. *Int. J. Cancer*: 39: 329-332.
- 30.- Waksvik, Helga, Per Magnus and Kare Berg. (1981). Effects of age, sex and genes on sister chromatid exchange. *Clinical Genetics*. 20: 449-454.
- 31.- Krishna, G., J. Nath, M. Petersen and T. Ong. (1988). In vivo and in vivo/in vitro kinetics of cyclophosphamide-induced sister-chromatid exchanges in mouse bone marrow and spleen cells. *Mutation Res*. 204: 297-305.
- 32.- D. Tucker, James, Angela Auletta, Michael C. Cimino, Kerry L. Dearfield, David Jacobson-Kram, Raymon R. Tice, Anthony V. Carrano. (1993). Sister-chromatid exchange: second report of the gene-Tox program. *Mutation Res*. 297: 101-180.
- 33.- Perry, Paul, Sheldon Wolff. (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*. 251: 156-158. .
- 34.- Nylander, Rivrud Gro. (1988). Mutagenicity testing of seminal fluid: seminal fluid increases the mutagenicity of the precursor mutagen benzo[a]pyrene in the presence of S9 mix. *Mutation Res*. 208: 195-200.
- 35.- Russo, Antonella, Gigliola Gabbani, Barbara Simoncini. (1994). Weak genotoxicity of acrylamide on premeiotic and somatic cells of the mouse. *Mutation Res*. 309: 263-272.
- 36.- Kanda, N., H. Kato. (1979). A simple technique for in vivo observation of SCE in mouse ascites tumor and spermatogonial cells. *Exp. Cell. Res*. 118: 431-434.
- 37.- W. Allen, James, Samuel A. Latt. (1976). Analysis of sister chromatid exchange formation in vivo in mouse spermatogonia as a new test system for environmental mutagens. *Nature*. 260 449-451.
- 38.- Russo, A., G. Gabbani, E. Dorigo. (1994). Evaluation of sister.chromatid exchanges in espermatogonia: a comparison between the classical fluorescence plus Giemsa staining and an immunocytochemical approach. *Mutation Res*. 323: 143-149.

- 39.- C. R. Austin y R. V. Short, (1982). *Células Germinales y Fertilización*, vol. 1, Prensa Médica Mexicana, México D.F.
- 40.- S., Leeson Thomas, (1984). *Histología*. Interamericana, 4a. Edición, México D.F.
- 41.- Monesi, M. D. Valerio. (1962). Radiographic study of DNA synthesis and the cell cycle in spermatogonia and spermatocytes of mouse testis using tritiated thymidine. *The Journal Cell of Biology*. 14: 1-18.
- 42.- Jendemy, J., R.-A. Walk, U. Hackenberg and Rohrborn. (1988). Chromosomal abnormalities and sister-chromatid exchange in bone marrow cells of mice and Chinese hamsters after inhalation and intraperitoneal administration II. Cyclophosphamide. *Mutation Res*. 203. 1-10.
- 43.- Darroudi, F., H. Targa, and A. T. Natarajan. (1988). Influence of dietary on cytostatic drug activity of cyclophosphamide and its main directly acting metabolite: Induction of sister-chromatid exchanges in normal human lymphocytes, Chinese hamster ovary cells, and their DNA repair-deficient cell lines. *Mutation Res*. 198: 327-335.
- 44.- Goodman, Gilman Alfred. (1982). *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Editorial Panamericana. 6a. Edición. Argentina.
- 45.- Miltenburger, H. G., G. Engelhardt and Rohrborn. (1981). Differential chromosomal damage in Chinese hamster bone-marrow cells and in spermatogonia after mutagenic treatment. *Mutation Res*. 81: 117-122.
- 46.- K., Abraham and J. Franz. (1983). Induction of sister-chromatid exchanges by chemotherapeutic drugs in spermatogonia of mice. Effects of procarbazine, adriamycine, cyclophosphamide and mitomycin C. *Mutation Res*. 108: 373-381.
- 47.- L., Charles James, David Jacobson-Kram, Joseph F. Borzelleca, and Richard A. Carchman. (1983). The Kinetics In Vivo Sister Chromatid Exchange Induction in Mouse Bone Marrows Cells by Alkylating Agents: Cyclophosphamide. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 83: 825-834.
- 48.- M.-T., King, D. Wild, E. Gocke and K. Eckhardt. (1982). 5-Bromodeoxyuridine tablets with improved depot effect for analysis in vivo of sister-chromatid exchanges in bone marrow and spermatogonia cells. *Mutation Res*. 97: 117-129.

- 49.- Palitti, F., C. Tanzarella, R. Cozzi, R. Ricordy, E. Vitagliano and M. Fiore. (1982). Comparison of the frequencies of SCEs induced by chemical mutagens in bone marrow, spleen and spermatogonia cells of mice. *Mutation Res.* 103: 191-195.
- 50.- S., Lavappa K. and C. W. Sheu. ( 1987). Enhancement of Concurrent Yield of Spermatogonia, Meiotic I, and Meiotic II Metaphase Chromosomes From Chinese Hamster Testes. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 10: 61-68.
- 51.- Bayer, U., T. Bauknecht. (1977). The dose-dependence of sister chromatid exchanges induced by 3 hydrocarbons, in the in vivo bone marrow test with Chinese Hamsters. *Experientia.* 33: 25.
- 52.- Igaz, P., S. Toth and G. Csaba. (1995). Long-lasting persistence of elevated sister-chromatid exchange frequencies induced by perinatal benzo[a]pyrene treatment in rat bone-marrow cell. *Experientia.* 51: 612-615.