



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

35
023824
MAY 21 1998

"ESTUDIO DEL EFECTO DEL ETANOL TEQUILA Y BRANDY SOBRE EL COMPLEJO SINAPTONEMICO DE ESPERMATOCITOS DE RATON"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

P R E S E N T A :

ARTURO PIÑA CALVA

264021

DIRECTOR (A) DE TESIS:

DR. EDUARDO MADRIGAL BAJAIDAR

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

1998



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

PAGINACION

DISCONTINUA

"ESTUDIO DEL EFECTO DEL ETANOL, TEQUILA Y BRANDY SOBRE EL COMPLEJO SINAPTONÉMICO DE ESPERMATOCITOS DE RATÓN."

Tesis que presenta el alumno Arturo Piña Calva para obtener el Grado de Doctor en Ciencias (BIOLOGÍA) en la Facultad de Ciencias de la U.N.A.M. El trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Eduardo Madrigal Bujaidar en el Laboratorio de Genética Humana del Departamento de Morfología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas de I.P.N. y con la asesoría del Comité Tutorial integrado por la Dra. Rosario Rodríguez Arnais y el Med. Cir. Fabio Abdel Salamanca Gómez.

MÉXICO D.F. JUNIO DE 1998.

TITULO DE LA TESIS:

Estudio del efecto del etanol, tequila y brandy sobre el complejo sinaptonémico de espermatozoides en ratón

GRADO Y NOMBRE DEL ASESOR O DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Eduardo Madrigal Bujaidar

INSTITUCION DE ADSCRIPCION DEL ASESOR O DIRECTOR DE TESIS:

Lab. de Genética. Departamento de Morfología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN

RESUMEN DE LA TESIS: (Favor de escribir el resumen de su tesis a máquina en 25 renglones a un espacio como máximo, sin salir del extensión de este cuadro.

El consumo de bebidas alcohólicas puede afectar la salud del individuo y a su descendencia. Actualmente se sabe que el etanol es mutagénico y carcinogénico a través de su primer metabolito, el acetaldehído. Considerando que el etanol y las bebidas alcohólicas pueden alterar el material hereditario y que no se conocen sus efectos durante la primera profase meiótica, en este trabajo se estudió el efecto del etanol, tequila y brandy sobre el complejo sinaptonémico de espermatozoides de ratón. Para lograr lo anterior se administraron lotes de 3 ratones (NIH) con dosis de etanol, tequila y brandy equivalentes a 1, 2 y 3 gramos/kg de peso, por vía oral y durante tres semanas. De manera análoga se trataron los lotes testigo negativo y positivo, el primero con solución salina fisiológica y el segundo con ciclofosfamida (100 mg/kg). (El experimento se realizó por duplicado). El análisis citogenético se realizó en 30 células en paquiteno y se determinó la frecuencia de espermatozoides en esta etapa en relación a la población general. La comparación estadística de los resultados, indica que estas sustancias pueden alterar el complejo sinaptonémico, ya que las dosis más altas pueden provocar rupturas. Esto podría deberse a los efectos del acetaldehído, las sustancias presentes en las bebidas y a probables cambios en los niveles de testosterona, provocados por estas sustancias. Estudios posteriores permitirán determinar si estas rupturas involucran al material genético o si únicamente alteran la estructura proteica del complejo sinaptonémico.

LOS DATOS ASENTADOS EN ESTE DOCUMENTO CONCUERDAN FIELMENTE CON LOS REALES Y QUEDO ENTERADO QUE EN CASO DE CUALQUIER DISCREPANCIA QUEDARA SUSPENDIDO EL TRAMITE DEL EXAMEN.

FECHA DE SOLICITUD _____



FIRMA DEL ALUMNO

Acompaño los siguientes documentos:

- **Nombramiento del jurado del examen de grado**
- **Aprobación del trabajo escrito por cada miembro del jurado.**
- **Copia de la última revisión de estudios**

Synapionemal Complex Damage in Mouse Spermatoocytes Exposed to Tequila and Brandy

Arturo Piña-Calva, M.S., Paul Cruzada-Molina, Biol., and Eduardo Madrigal-Bujalider, D.S.

Genetics Laboratory, National School of Biological Sciences, I.P.N. Carrizal y Plan de Ayala, Mexico City, Mexico

Address all correspondence and reprint requests to: Eduardo Madrigal-Bujalider, D.S., Laboratorio de Genética, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N. Carrizal y Plan de Ayala, 5a. Torre, Venustiano Carranza, México, D.F. C.P. 04510, México.

ABSTRACT: We evaluated the capacity of tequila and brandy to induce synapionemal complex (SC) breaks in mouse spermatoocytes. The alcoholic beverages were 20% diluted in distilled water and administered daily by oral intubation for 21 days (1, 2, and 3 g/kg; six animals per group). A positive control group was administered cyclophosphamide (CP) (20 mg/kg), and another group of mice was treated with distilled water. The results indicated the following: (i) tequila induced a statistically significant increase in SC damage with 2 g/kg and 3 g/kg, and brandy was genotoxic only with 3 g/kg; (ii) CP induced almost a duplication of the total number of breaks produced by tequila or brandy; (iii) the average weight increase in the animals was 3.3 g, but the group treated with the highest dose of tequila showed a slight weight decrease; (iv) the weight of the testes did not show any significant difference among groups of animals; and (v) there were no significant differences between groups with respect to the frequency of pachytene (mean number: 195 in 1000 cells).

KEY WORDS: synapionemal complex, mouse spermatoocytes, tequila, brandy.

Keywords: Ethanol, synapionemal complex, spermatoocytes

Introduction: The synapionemal complex (SC) is a proteinic structure which appears during the meiotic prophase and is constituted by two lateral elements, transverse filaments and an axis. This organelle is important for the pairing of homologous chromosomes as well as for the interchange of genetic information [1].

In recent years several authors have reported that physical and chemical agents may damage the SC. This finding has led to the conclusion that modifications in the integrity of the SC structure represent a useful genotoxic indicator, particularly when the SC damage has been correlated with chromosomal aberrations in metaphase I and II [2].

Ethanol exposure increases the frequency of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges (SCEs) in the lymphocytes of alcoholics [3], mammalian cells *in vitro* [5, 4] and bone marrow cells of animals *in vivo* [5]. Information is less extensive and conclusive concerning the germ line. A report by Daniel and Roane [6] indicates the presence of aneuploidy in spermatogenic and meiotic phase I and II in the Chinese hamster. Other reports have shown no chromosomal aberrations in rat spermatogonia [7].

To determine the effect of ethanol in the germ cell, we studied the level of damage in the SC of mouse spermatoocytes treated with this substance for 21 days.

AGRADECIMIENTOS.

Quiero hacer patente mi agradecimiento a los sinodales, por sus finas atenciones, valiosas sugerencias y aportaciones.

PRESIDENTE DRA. ROSARIO RODRIGUEZ ARNAIZ.

PRIMER VOCAL DRA. PATRICIA RAMOS MORALES.

SEGUNDO VOCAL DR. EDUARDO MADRIGAL BUJAIAR.

TERCER VOCAL MED. CIR. FABIO ABDEL SALAMANCA GOMEZ.

SECRETARIO DR. PEDRO ROSENDO MORALES RAMIREZ.

SUPLENTE DR. GERARDO HEBERT VAZQUEZ NIN.

SUPLENTE DR. RENE DE JESUS CARDENAS VAZQUEZ.

A LETICIA, MARCOS, DANIEL Y PABLO....LO QUE MAS QUIERO.

Alguna vez Jose Martí decía que sólo existe un niño hermoso en el mundo y que ese niño lo tenía cada madre....¿que le podría decir a ese gran poeta? ¡yo tengo tres! y por si fuera poco tengo una compañera. Juntos los hemos visto crecer y un buen día los veremos partir. Al final quedaremos los dos, caminando ,soñando, frente al mar y bajo un cielo muy azul.

En ésta ocasión no seré modesto, tengo a mi lado una gran compañera, tres hijos, un corazón vivo, mis manos, la imaginación y la alegría. ¿que más se le puede pedir a la vida?

Con cariño admiración y respeto para mi madre, hermanos y sobrinos:

Graciela y Gonzalo...Donato y Pepe

Martha y Hector...Citlali, Susana y Mestli

Yolanda y Juan Carlos...Carlos

Leticia y Jorge..Judith y Jorge

Tomás y Carmela ...Tomás o Carmela

Maribel y Fernando

Alicia.

Ivan

Raul

Así como a

Doña María Mijangos, Don Amadeo Aragon, Jorge, Sabi, Ivan, Maru, Juan Luis
y Luis.

A MIS AMIGOS Y A MIS CAMARADAS...DE SIEMPRE.

Puedo decir que soy un hombre afortunado, ya que la vida ha sido muy generosa conmigo, pues en el camino he conocido personas sensibles, críticas, solidarias, luchadoras, honestas, consecuentes y alegres...en pocas palabras ...buenas personas....:

Lourdes Romo, María Angoa, Guillermo Bojorques, Guadalupe Herrera, Alfredo Patiño, Alfredo Santana , Julio (Omar) y Gibanel, Ismael, Omar y Francis, Jaime y Violeta, Tere y José Luis, Marina Meneses, José Luis Ayala, Luz María Suarez, Margarita y Doroteo, Efrain Cruz, Cristina Rivas, Gerardo Batun, Raquel Trejo, Graciela Delhumeau, María de Jesus Castañeda, María Gómez , Herminia López Santana, Hortencia Montellanos, Hector Mendoza, Ernesto Alva, Gloria Mesquita, Milagros Gómez, Resalía Torres, Roberto Martínez, Asunción Orozco, Leticia Flores, Gloria Cordova, Raúl Valdés, Efrain Calvo, Joe Hanssen, George Novack, Cesar Nicolas Molina, José Mexica, Mario Macias, Arturo Butron, Arturo Abundio Perez, Victor Centeno, Raúl Quezada, José Luis Herrera, Hector de la Cueva, Lidia Aoki, Josefa Lagunas, Socorro Delgadillo, Araceli Mercado, Helvia Pelayo, Martín Solano y Juan Espinoza.....

A MIS MAESTROS:

Y no sólo he tenido amigos.....existen personas que a través del tiempo y sin darse cuenta, la vida los ha convertido en maestros.....hombres y mujeres excepcionales que además de su calidad humana han contribuido a la formación integral de sus alumnos con sus enseñanzas y ejemplo.

A su memoria más profundo agradecimiento, respeto y admiración. En particular a los Maestros: Antonio Hernandez Corzo, Luz María Suarez Soto, Adriana Becerril, Eduardo Madrigal y Cesar Nicolas Molina.

ESTUDIO DEL EFECTO ETANOL, TEQUILA Y BRANDY SOBRE EL COMPLEJO SINAPTONÉMICO DE ESPERMATOCITOS DE RATON.

I.	RESUMEN.	1
II.	INTRODUCCIÓN.	3
	II.1. EL TESTÍCULO.	3
	II.2. EL COMPLEJO SINAPTONÉMICO.	6
	II.2.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN.	6
	II.2.2. CITOLOGÍA.	12
	II.3. LAS BEBIDAS ALCOHOLICAS.	14
	II.3.1 COMPONENTES.	14
	II.3.2 TEQUILA Y BRANDY.	16
	II.4. ALCOHOL.	17
	II.4.1 ABSORCIÓN Y METABOLISMO.	17
III.	ANTECEDENTES.	20
	III.1. ALCOHOL, BEBIDAS ALCOHOLICAS Y MUTAGÉNESIS. ..	20
	III.2. ALCOHOL Y HORMONAS SEXUALES MASCULINAS.	21
	III.3. COMPLEJO SINAPTONÉMICO Y DAÑO GENÉTICO.	23
IV.	HIPÓTESIS DE TRABAJO.	26
V.	OBJETIVOS.	27
VI	MATERIALES Y MÉTODOS.	28
VII.	RESULTADOS.	31

VIII.	DISCUSIÓN.	33
	VIII. 1. COMPLEJO SINAPTONÉMICO Y AGENTES FÍSICOS Y QUÍMICOS.	33
	VIII.2. HIPÓTESIS PARA EXPLICAR LA GENERACIÓN DE ALTERACIONES EN EL CS.	36
	VIII. 3. BEBIDAS ALCOHÓLICAS Y DAÑO EN EL COMPLEJO SINAPTONÉMICO.	41
	VIII.4. BEBIDAS ALCOHÓLICAS Y POLACIÓN CELULAR EN TESTÍCULO.	44
IX.	CONCLUSIONES.	46
X.	BIBLIOGRAFÍA.	47
XI.	TABLAS.	64
	TABLA 1. CONTENIDOS DE ALCOHOL ETILICO DE ALGUNAS BEBIDAS ALCOHÓLICAS.	64
	TABLA 2. CONGÉNERES Y CONTENIDO DE ETANOL EN CERVEZA, VINO Y DESTILADOS.	65
	TABLA 3. CARACTERÍSTICAS Y COMPONENTES DE TEQUILA Y BRANDY.	66
	TABLA 4. CONGÉNERES SEMIVOLÁTILES DE GINEBRA.	67
	TABLA 5. CONGÉNERES SEMIVOLÁTILES EN WHISKIES SCOTCH.	68
	TABLA 6. CONGÉNERES SEMIVOLÁTILES EN BOURBONES.	69
	TABLA 7. CONGÉNERES SEMIVOLÁTILES EN TEQUILA	70
	TABLA 8. MINERALES EN VINOS Y CERVEZAS.	71

	TABLA 9. VITAMINAS EN CERVEZAS.	72
	TABLA 10. CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS EN BEBIDAS ALCOHÓLICAS.	72
	TABLA 11. GENOTIPOS DE LA ALCOHOL DESHIDROGENASA.	73
	TABLA 12. PESOS DE RATONES TRATADOS CON ETANOL, TEQUILA Y BRANDY.	74
	TABLA 13. PESO DE ANIMALES TRATADOS CON SOLUCIONES EQUIVALENTES A 3 GRAMOS DE ETANOL.	75
	TABLA 14. PESO DE TESTICULOS.	75
	TABLA 15a. EXPERIMENTO I.	76
	TABLA 15b. EXPERIMENTO II.	77
	TABLA 15c. EXPERIMENTO I + EXPERIMENTO II.	78
	TABLA 16. VARIABLES ESTADISTICAS EXPERIMENTO I.	79
	TABLA 17 VARIABLES ESTADISTICAS EXPERIMENTO II.	80
	TABLA 18. VARIABLES ESTADISTICAS EXPERIMENTO I + EXPERIMENTO II.	81
LOS	TABLA 19. FRECUENCIA DE CÉLULAS EN PAQUÍTENO DE TESTIGOS.	82
	TABLA 20. FRECUENCIA DE CÉLULAS EN PAQUÍTENO EN ANIMALES TRATADOS CON ETANOL.	83
	TABLA 21. FRECUENCIA DE CÉLULAS EN PAQUÍTENO EN ANIMALES TRATADOS CON TEQUILA.	84
	TABLA 22. FRECUENCIA DE CÉLULAS EN PAQUÍTENO EN ANIMALES TRATADOS CON BRANDY.	85

XII GRÁFICAS.

	GRÁFICA 1. RUPTURAS TOTALES EXPERIMENTO I.	86
	GRÁFICA 2. RUPTURAS TOTALES EXPERIMENTO II.	87

GRÁFICA 3.. RUPTURAS TOTALES EXPERIMENTO I

+ EXPERIMENTO II. 88

XIII FOTOGRAFÍAS Y FIGURAS.

FOTOGRAFÍA 1. CÉLULA EN PAQUÍTENO. 89 a

FOTOGRAFÍA 2. RUPTURA DEL CS. 89 b

FOTOGRAFÍA 3. RUPTURA DE ELEMENTO LATERAL. 90

FIGURA I. DURACIÓN DE LA MEIOSIS EN RATÓN. 91

**XIV ANEXO I. (ARTÍCULOS PUBLICADOS CON LOS RESULTADOS
EXPERIMENTALES DE ESTE TRABAJO).**

**XIV.1. EFFECT OF ETHANOL IN THE SYNAPTONEMAL
COMPLEX OF MOUSE SPERMATOCYTES. 93**

**XIV. 2. SYNAPTONEMAL COMPLEX DAMAGE IN MOUSE
SPERMATOCYTES EXPOSED TO TEQUILA AND
BRANDY. 96**

I. RESUMEN.

I. RESUMEN.

Actualmente se sabe que el etanol es mutagénico carcinogénico y teratogénico a través de su primer metabolito, el acetaldehído. Además de lo anterior, también puede alterar la capacidad reproductiva de los individuos del sexo masculino.

La espermatogénesis es un proceso biológico en el que a partir de una espermatogonia (diploide) se obtienen espermatozoides (haploides). Para que ocurra lo anterior es necesario que haya procesos de división meiótica y de diferenciación celular (espermioagénesis). Durante la profase meiótica se da el apareamiento de los cromosomas homólogos, intercambio de información genética y segregación cromosómica. En el curso de estos acontecimientos, aparece una estructura proteica conocida como Complejo Sinaptonémico (C.S.) asociada a los fenómenos anteriores. Esta estructura puede sufrir cambios cuando hay alteraciones cromosómicas, o cuando los organismos están expuestos a algunos agentes químicos o físicos, entre los que destacan: radiaciones, compuestos alquilantes, antimetabólicos y hormonas esteroides.

Considerando que: el etanol puede modificar el material hereditario, los niveles de testosterona y que no se conoce cuál es el efecto que podrían tener el etanol, tequila y brandy en el C S, este trabajo tuvo como objetivo principal, determinar el tipo y la frecuencia de posibles alteraciones en el CS, en espermatozoides de ratones tratados con distintas dosis de etanol, tequila y brandy (equivalentes a 1, 2 y 3 gr de etanol por kg de peso, D 1, D2 y D3 respectivamente). Para lograr lo anterior a lotes de 3 ratones se les administraron con las soluciones mencionadas, por vía oral y durante tres semanas. El experimento se realizó por duplicado. Los testigos negativo y positivo se administraron de manera análoga con solución salina y ciclofosfamida (20mg/kg). respectivamente Transcurrido el tiempo de exposición, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical,

se obtuvieron las células germinales por métodos mecánicos, se fijaron y se elaboraron las preparaciones citológicas. Para determinar el tipo y frecuencia de alteraciones en el CS (rupturas del CS y de los elementos laterales) se analizaron 30 células en paquiteno. El análisis estadístico se realizó empleando análisis de varianza, prueba de Tuckey y t de Student, con el objeto de determinar si existían diferencias entre los grupos testigo y los tratados con las bebidas alcohólicas.

Los resultados encontrados indican que el etanol, tequila y brandy pueden provocar rupturas en el C S o en los elementos que lo forman, dependiendo de la concentración utilizada. Los ratones tratados con etanol (D3), tequila(D2 y D3) y brandy (D3) mostraron diferencias significativas en el número de rupturas con respecto al testigo negativo.

El daño observado podría explicarse a partir de las propiedades mutagénicas del etanol (vía, acetaldehído), las sustancias presentes en el tequila y brandy, y a posibles cambios en los niveles de andrógenos.

II. INTRODUCCIÓN.

ESTUDIO DEL EFECTO DEL ETANOL TEQUILA Y BRANDY SOBRE EL COMPLEJO SINAPTONÉMICO DE ESPERMATOCITOS DE RATÓN.

II. INTRODUCCIÓN.

II.1. EL TESTÍCULO.

El testículo es un órgano que está rodeado por una cápsula, conocida como túnica albugínea, la cual contiene a los túbulos seminíferos; estos están separados por un intersticio, donde se encuentran las células de Leydig, vasos sanguíneos y linfáticos. Los capilares no penetran en los túbulos y no son fenestrados, por lo que las sustancias deben pasar a través de la pared capilar o entre las células endoteliales; aparentemente no hay uniones herméticas entre éstas. La membrana que limita a los túbulos, está compuesta por una lámina basal, una o varias capas de células mioideas y otra lámina basal (Fawcett et al. 1969 y 1970; Russell, 1990).

En los túbulos seminíferos existen dos compartimentos, uno basal y otro adluminal, el primero está ocupado por las espermatogonias, espermatocitos en reposo y células de Sertoli. En el compartimento adluminal se encuentran los espermatocitos que han iniciado la división meiótica, espermátidas en distintos grados de diferenciación y espermatozoides. Las células de Sertoli en contacto parcial con la lámina basal, forman uniones herméticas entre ellas, dando origen a una barrera, que algunos autores denominan hematotesticular y que de manera general impide el paso libre de sustancias hacia el compartimento adluminal. Todos los nutrientes, hormonas y sustancias que influyen en el desarrollo de la espermatogénesis deben pasar a través de las células de Sertoli (Russell y Peterson, 1985).

En el epitelio seminífero existen diferentes asociaciones de células germinales, en estados específicos de división o diferenciación celular, estas asociaciones son de composición constante y aparecen con una secuencia fija. La serie de etapas sucesivas que ocurren entre dos apariciones de una misma asociación celular se conoce como ciclo del epitelio seminífero. Cada asociación tiene una longitud dentro de los túbulos, al conjunto de estas asociaciones se les denomina onda del epitelio seminífero. El ciclo se refiere a los cambios que tienen lugar en un punto dado del túbulo durante un período de tiempo, mientras que la onda se refiere a las distintas asociaciones celulares a lo largo del túbulo en cualquier momento (Parvinen, 1982).

En el testículo ocurren una serie de procesos, entre los que destaca la espermatogénesis que tiene como resultado final la producción de espermatozoides. Este proceso implica divisiones mitóticas y meióticas y un proceso de diferenciación celular, conocido como espermiogénesis, que se da después de que ocurre la segunda división meiótica (Bernard, 1990).

Las células dentro de los túbulos seminíferos interactúan directamente unas con otras, la interacción con las células intersticiales se da vía mensajeros químicos. Las células de Leydig son reguladas en su actividad esteroidogénica principalmente por la hormona luteotrófica (LH), mientras que la hormona folículo estimulante (FSH) regula muchas de las funciones de las células de Sertoli.

En general se acepta que la FSH y la LH no actúan directamente sobre las células germinales, el control de la espermatogénesis se da principalmente a través de la acción de estas hormonas sobre las células somáticas testiculares, las cuales generan las condiciones que se requieren en los túbulos para que las células germinales se puedan desarrollar (Fritz, 1990).

Como ejemplo de las interacciones están las células miodes peritubulares que contienen sustancias que modulan la actividad de las células de Sertoli: la proteína P-Mod-S, cuya regulación está bajo el control de andrógenos (Fritz, 1990) , realiza la secreción de transferrina y de una proteína unidora de andrógenos en las Sertoli (Skinner et al. 1985). Las células miodes también secretan factores de crecimiento que modulan la actividad de la aromatasa y la del activador de plasminógeno (Fritz, 1990). Se ha propuesto que el plasminógeno juega un papel importante para abrir las uniones herméticas, para que de esta forma, los espermatozoides en reposo migren hacia el compartimento adluminal; se ha observado que las concentraciones mayores de esta sustancia, se dan durante los estados VII y VIII, justamente cuando se inicia la meiosis (Parvinen et al. 1986).

La existencia de distintas asociaciones celulares en los túbulos seminíferos y el comportamiento bioquímico de las células de Sertoli, sugiere que estas células presentan estados metabólicos cíclicos, que podrían estar ligados a los estados específicos del epitelio seminífero. La unión de FSH a receptores membranales de las Sertoli varía a lo largo del túbulo; en el estado I es máxima y mínima en los VI y VII, de manera análoga la adenil ciclasa responde más a los estímulos de la FSH en los estados II y III y la síntesis de AMPc es alta en los estados I-III, mientras que en los VI-VII, la respuesta es muy pobre (Parvinen et al. 1986; Linder et al. 1991).

En relación a la susceptibilidad a andrógenos se ha observado que las células de Sertoli tienen receptores citoplásmicos y nucleares que se unen a la cromatina incrementando la síntesis de RNAPol. La concentración máxima de testosterona se da durante los estados VII-VIII y la de receptores durante el XIV justamente cuando ocurre la división meiótica. Estas observaciones sugieren que la acción de los andrógenos está relacionada con el inicio de la meiosis, mientras que las primeras etapas del ciclo del epitelio seminífero están

reguladas por eventos asociados con la acción de la FSH. A lo anterior hay que agregar que existen sustancias capaces de inducir o detener la meiosis, las primeras tienen una concentración máxima en las etapas VII-VIII, mientras que las segundas no son secretadas de manera cíclica, se sugiere que podrían evitar que otros estados diferentes a VII-VIII no inicien la meiosis (Parvinen, 1982; Parvinen et al. 1986).

De lo anterior podemos concluir que en la actualidad sólo se conocen parcialmente los mecanismos bioquímicos e interacciones celulares que se dan durante todo el proceso de la espermatogénesis y que aún resta para conocer con exactitud los mecanismos que expliquen el inicio y control de las divisiones mitóticas así como de la diferenciación celular.

II.2. EL COMPLEJO SINAPTONÉMICO.

II.2.1. Estructura y función.

De manera general, la reproducción sexual implica la formación de gametos haploides, cuyos cromosomas homólogos se han recombinado de manera recíproca. Para que esto ocurra, es necesario que se lleve al cabo la meiosis, proceso en el que se dan el apareamiento, recombinación y segregación cromosómica. La meiosis puede ser de dos maneras: quiasmática y aquiasmática. La primera está asociada con la presencia de una estructura proteica conocida como Complejo Sinaptonémico (CS), que en la segunda está ausente (Bernard, 1990).

Actualmente se considera que el CS es una estructura necesaria, pero no suficiente, para que se de el apareamiento de homólogos, recombinación genética y segregación cromosómica. Aunque los mecanismos que explican

estos fenómenos no se conocen de manera exacta, cada vez hay más información que nos permite comprenderlos: composición del CS, enzimas que participan en la recombinación, estructura de los cromosomas meióticos, por mencionar solo algunos (Moens, 1994; Carpenter, 1994; Weiner y Kleckner, 1994; Roeder 1995; Cook, 1997).

Durante la década de los años 50 se dió un notable desarrollo en la microscopía electrónica y en las técnicas citológicas, lo que trajo como consecuencia un mayor conocimiento de la ultraestructura de la célula. En 1956, Moses (citado por Moses, 1969), utilizando cortes seriados y tinción con ácido fosfotúngstico, describió en los espermatoцитos del crustáceo *Cambarus clarkii*, una estructura asociada con los cromosomas paquiténicos, que en 1958 denomina Complejo Sinaptonémico. En 1969, Moses propone el término Complejo Sinaptonémico (CS), concepto que en la actualidad es aceptado por la mayoría de los autores (Moses, 1969; Esponda, 1981).

El CS alcanza su máxima estructuración durante el paquiteno y desde el punto de vista morfológico está formado por:

a) Los elementos laterales (EL) (se denominan Elementos Axiales cuando aún no se da o se ha completado la sinapsis), están constituidos por dos ejes de 40 nm de diámetro, cada uno de éstos está asociado a la cromatina de su respectivo cromosoma homólogo; los elementos laterales están separados por un espacio de escasa densidad y aproximadamente 120nm de ancho, que se conoce como espacio central o espacio de apareamiento.

b) Los elementos transversos de 5nm de diámetro aproximadamente que se encuentran en el espacio central y que aparentemente salen de los elementos laterales.

c) El elemento central de 30 nm que se encuentra en la parte central del espacio de apareamiento (entre los dos elementos laterales), tiene menor densidad que los elementos laterales y mayor que los transversos.

En general, existen muchas similitudes en el CS de las diferentes especies estudiadas: los elementos laterales, transversos y central están siempre presentes y las dimensiones son muy parecidas (Moses, 1968, 1969; Esponda 1981, Vázquez- Nin et al. 1993). Aunque existe consenso en considerar que los elementos laterales son estructuras unitarias, existen observaciones que muestran que cada elemento lateral está constituido por dos o tres filamentos. (Moses, 1968; Del Mazo y Gil- Alberti, 1986; Dietrich et al. 1992).

Se ha observado que el CS está asociado con la membrana nuclear. Los elementos laterales al unirse con la membrana interna se ensanchan tomando forma de embudo, en la zona de asociación las dos membranas nucleares se evaginan hacia el citoplasma, en esta zona se observan filamentos muy finos (4-6 nm) que van desde los elementos laterales hasta el citoplasma adyacente a la asociación (Moses, 1969; Esponda y Jiménez-Martin 1973). También, en distintas especies, se han descrito asociaciones del complejo sinaptonémico con el nucleolo (Esponda y Jiménez-Martin 1975; Pathak y Hsu, 1979).

Sobre el elemento central del CS se han descrito unas estructuras, que pueden ser esféricas u ovoides, de 100 nm de diámetro aproximadamente, conocidas como Nódulos de Recombinación (NR) (Carpenter, 1979). La frecuencia y distribución de estos nódulos está en relación con el número de quiasmas y eventos de intercambio recíproco. Se clasifican como tempranos y tardíos, los primeros son abundantes, de tamaño variable y aparecen en cigoteno asociados a los elementos axiales que aún no se aparean y en los que ya iniciaron la sinapsis; los segundos aparecen asociados al complejo sinaptonémico durante el paquíteno cuando los homólogos están

completamente sinapsados. De manera general se ha propuesto que los NR están relacionados con la búsqueda de sinapsis, recombinación y formación de *chiasmata*. En particular se propone que los nódulos tempranos marcan los sitios en donde se llevarán al cabo las reacciones de intercambio y que los tardíos son complejos multienzimáticos que catalizan las reacciones de intercambio recíproco. En estas estructuras se han localizado las proteínas Dmc1 y Rad 51, que son análogas a Rec A, y están involucradas en procesos de reparación y recombinación (Von Wettstein et al. 1984; Glamann, 1986; Sherman et al. 1992; Carpenter, 1994; Ashley et al. 1995; Roeder, 1995;). Aunado a lo anterior, hay evidencias que refuerzan la posibilidad de que en el sitio donde se encuentran los NR se lleve al cabo la recombinación, ya que en espermatoцитos de rata y ratón se ha detectado DNA en la zona donde están situados los NR (Vázquez-Nin et al. 1993).

Con respecto a la composición química del CS, los primeros estudios se empezaron a realizar en la década de los años 60 empleando métodos citoquímicos y bioquímicos, a partir de los cuales se concluyó en primera instancia que ésta estructura era de naturaleza proteica (Moses, 1968; Sheridan y Barmet, 1969; Comings y Okada, 1970). Posteriormente empleando métodos inmunológicos, un grupo de investigadores reportó la presencia de actina y miosina en el CS (De Martino et al. 1980), sin embargo otros autores no han logrado detectar estas sustancias (Spyropoulos y Moens, 1984).

El desarrollo de procedimientos para aislar el C.S. y de métodos inmunocitoquímicos fue un paso importante para estudiar la composición de este organelo: Los resultados iniciales mostraron que los elementos laterales estaban constituidos por proteínas de 190, 30 y 33 kDa y que en la región central existía una proteína con una movilidad electroforética de 48,000, y se concluía que estas proteínas eran sintetizadas durante la profase meiotica

(Heyting et al. 1985, 1987, 1988 y 1989; Moens et al. 1987; Smith y Benavente, 1992).

En la actualidad se cuenta con mayor información acerca de las proteínas que constituyen el CS en diferentes especies. Así tenemos que en algunos mamíferos, los Filamentos Transversos están constituidos por una proteína denominada SCPI (Sinaptonemal Complex Protein I), la cual está constituida por aproximadamente 976 aminoácidos. El extremo N-terminal se encuentra localizado en la vecindad del elemento central, mientras que el C-terminal está sobre o dentro de los elementos laterales; tal vez forma dímeros cuyos extremos N-terminal se unen en el elemento central y la parte C-terminal se encuentra anclada en los elementos laterales. También se ha observado que el extremo C-terminal presenta afinidad con el DNA y que existen muchas similitudes entre las SCPI de hamster, de rata y del hombre (los genes que codifican la SCPI humana, están en el cromosoma 1 (1p12-p13). En el caso de levaduras existe una proteína análoga conocida como ZIP I (Meuwissen et al. 1992 y 1997; Yuan et al. 1996; Schmekel et al. 1996).

En lo referente a los elementos axiales y laterales, se ha mencionado la existencia de dos proteínas que son específicas de las células meióticas de mamíferos: la SCP2 y la SCP3 (COR 1) (Heyting, 1996).

La primera se localiza en los elementos axiales y laterales, es decir, antes, durante y después de la sinapsis. Se cree que podría facilitar el apareamiento de los homólogos (Dietrich y Vink, 1992; Lammers et al. 1995). La segunda se localiza en los elementos axiales y laterales de cigóteno a diplóteno. También se ha detectado en los ejes cromosómicos y en las regiones cercanas al centrómero durante la metafase I, por lo cual se ha sugerido que podría ser un elemento que favorece la unión de las cromátidas hermanas durante esta etapa (no se ha detectado en la metafase mitótica) (Dobson et al. 1994). Esta

proteína es susceptible de fosforilarse, lo que ocurre en mayor grado del paquíteno temprano al medio; y se especula si estos cambios están relacionados con los cambios morfológicos que tiene el C.S., sin embargo, aún no se conoce el significado biológico de este fenómeno (Lammers et al. 1995).

En adición a las proteínas anteriores, podemos citar otras que no necesariamente son específicas de la profase meiótica pero que también pueden estar asociadas al CS: la topoisomerasa II y la proteína BRCA I (breast cancer). La topoisomerasa II se encuentra localizada a lo largo de los elementos laterales y se cree que es importante en la condensación de los cromosomas, la recombinación genética y que tal vez podría ser un requerimiento para el paso de la profase meiótica a la metafase I (Moens y Earnshaw, 1989; Cobb et al. 1997). La BRCA-I es una proteína constituida por 1863 aminoácidos y algunas mutaciones de ésta, se relacionan con cáncer de mama y ovario. El gene que la codifica está en el cromosoma 17 (17q21) y se considera como un supresor tumoral. Está localizada en sitios discretos a lo largo de los elementos axiales y laterales, en zonas en las que se ha detectado la rad 51, por lo que se sugiere que participa en los procesos de recombinación y reparación. Se ha demostrado que otra proteína de esta familia, la BRCA-2, está relacionada con la susceptibilidad a cáncer de mama y que participa en la reparación del daño provocado en el DNA por radiaciones (Scully et al. 1997). Junto con estas dos proteínas también se han detectado otras dos, la Atm y Atr que funcionan como cinasas que podrían estar involucradas en el control del ciclo celular (Keegan et al. 1996; Scully et al. 1997).

Aun no se conoce con exactitud como es que se da, la relación del CS con el material genético, hay estudios que muestran que las secuencias teloméricas (TTAGGG)_n están asociadas con las partes terminales del CS de los autosomas, mientras que otras secuencias de DNA satélite menor se localizan

en la región centromérica del CS; en contraste, otras secuencias de DNA satélite mayor, no tienen preferencia por este organelo. De estas observaciones se concluyó que dependiendo del tipo de secuencias de DNA, la cromatina tiene diferentes propiedades de asociación con el CS (Moens y Pearlman, 1990). Con respecto a la relación del DNA con el espacio que existe entre los elementos laterales, únicamente se ha demostrado que hay DNA en zonas específicas, que coinciden con la presencia de NR (Vázquez-Nin et al. 1993).

II. 2.2. CITOLOGÍA DEL C.S.

Hasta 1970 los estudios del CS se habían realizado empleando microscopía electrónica y técnicas de tinción y corte, lo cual facilitó su conocimiento (Comings y Okada, 1970). Años más tarde, se empezaron a realizar observaciones con microscopía de luz y electrónica, en células dispersas y utilizando técnicas de impregnación argéntica. Los resultados de todas estas técnicas han permitido conocer la evolución del CS durante la profase meiótica, que es muy similar en las distintas especies estudiadas (Dresser y Moses, 1979; Fletcher, 1979; Pathak y Hsu, 1979; Pathak y Elder, 1980; Pathak et al. 1982; Suresh y Chaganti, 1980; Dietrich y Mulder, 1981).

Durante la profase meiótica, los elementos laterales se empiezan a organizar durante el leptóteno. El cigóteno, para su estudio, se divide en temprano, medio y tardío. En el temprano los elementos laterales no se han ensamblado completamente, los elementos son muy finos y no se pueden seguir en toda su longitud, se inicia el apareamiento en algunas pequeñas regiones formando el CS, los cromosomas sexuales no se distinguen y los nucleolos pueden estar asociados con las terminaciones no apareadas. En el cigóteno medio los elementos laterales se pueden seguir en toda su longitud, los autosomas

presentan distintos grados de sinapsis, se pueden observar nódulos de recombinación, los ejes de los cromosomas sexuales no se distinguen y el nucleolo puede estar asociado con los ejes apareados o desapareados. En la etapa tardía el ensamble del CS en los autosomas es total, presentan torcimientos, pudiendo haber tres o más nodos, también se observan nódulos de recombinación y los ejes de los cromosomas sexuales no se observan (Greenbaum et al. 1986; Bhagirath y Kundu, 1986).

El paquíteno de manera análoga, también se puede dividir formalmente en temprano, medio y tardío. En el temprano se observan claramente los autosomas apareados, se presentan nódulos de recombinación, el nucleolo tiende a desaparecer, los ejes de los cromosomas sexuales ya son visibles y empiezan a aparearse. En la medida que avanza el paquíteno, los cromosomas se acortan, de tal modo, que en la etapa media estos adquieren su mínima longitud, tienen una gran cantidad de nodos y el número de nódulos de recombinación disminuye en relación a las etapas anteriores, el nucleolo se observa como una estructura granulosa ligada al CS y los cromosomas sexuales se han apareado totalmente. Durante el paquíteno tardío nuevamente se aumenta la longitud de los autosomas y empiezan a separarse, desinapsis, los sexuales incrementan su tinción y adquieren formas irregulares, el nucleolo se ve mas granuloso y tiende a desaparecer (Solari, 1980; Navarro, et al. 1981; Guitart et al. 1985).

El diplóteno se divide en predifuso y difuso. En la primera etapa la desinapsis aumenta, los sexuales pueden estar apareados o desapareados, en ocasiones el X se observa como una estructura doble y finalmente en la etapa difusa los elementos laterales se han desapareado totalmente, los puntos terminales de unión son los últimos en desaparecer (Dietrich y De Boer, 1983).

Finalmente, podemos decir que el CS es una estructura que está asociado con el reconocimiento y apareamiento cromosómico así como en el intercambio de información genética entre los cromosomas homologos.

II.3. LAS BEBIDAS ALCOHÓLICAS.

II.3.1. COMPONENTES.

Las bebidas alcohólicas pueden dividirse en vinos, cervezas y espirituosas: los vinos se elaboran de frutas, miel o leche fermentadas; las cervezas se producen a partir de la fermentación de granos y las espirituosas generalmente se obtienen de la destilación de vinos, cervezas o jugos fermentados de caña de azúcar, agaves o cactáceas. Están constituidas fundamentalmente por agua y etanol, que es el principal componente fisiológicamente activo y cuyas concentraciones pueden ir por lo general del 3% al 55 % aproximadamente (Tabla 1). Además de estas sustancias existe una pequeña fracción formada por un conjunto de compuestos que colectivamente reciben el nombre de congéneres, que pueden clasificarse en volátiles, semivolátiles y no volátiles. Los congéneres son los responsables de la variedad de sabores, aromas y colores en las diferentes bebidas. El contenido es específico para cada una y este depende de la materia prima con que se elaboran, el proceso de fermentación, destilación, tipo de almacenamiento y tiempo de envejecimiento (Mc Analley, 1988).

Congéneres Volátiles.

a) alcoholes, además de etanol han sido reportados más de 45 alcoholes diferentes, entre los que destacan, el metanol, propanol, isobutanol, butanol,

isopentanol (Tabla 2). A la mezcla de estos alcoholes se les conoce genéricamente como aceite de Fusel, que significa licor inferior (Schreier, 1979; Greizerstein, 1981). Las concentraciones permitidas en México para tequila y brandy se dan en la tabla 3 (Secretaria de Comercio y Fomento Industrial 1983a, 1983b).

b) aldehídos y ésteres, el acetaldehído es el aldehído que se detecta con más frecuencia en las bebidas alcohólicas. En relación a los ésteres, éstos son los que determinan parcialmente el aroma de las bebidas, entre los más frecuentes están el acetato de etilo y el etil formiato, sin embargo se han detectado aproximadamente 100 diferentes en las distintas bebidas (Tabla 2) (Schreier, 1979; Mc Analley, 1988).

c) ácidos y fenoles, se han identificado cerca de 130 ácidos en las diferentes bebidas alcohólicas, los más comunes son el ácido acético, succínico, tartárico, málico y cítrico, estos se forman generalmente durante la fermentación. Los fenoles son los principales responsables del aroma, generalmente se mezclan en las bebidas durante el proceso de almacenamiento y envejecimiento en barriles de roble; los más comunes son el fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, guayacol, p- etil fenol, eugenol (Lehtonen, 1983).

Congéneres Semivolátiles.

Estos compuestos se han encontrado en cervezas, vinos y destiladas, el contenido y concentración es variable en cada bebida y su significado no se conoce (Tablas 4, 5, 6, 7) (Mc Analley, 1988).

Congéneres No Volátiles.

Estos están constituidos por minerales, vitaminas, carbohidratos y proteínas. Generalmente se encuentran en cervezas y vinos, pero no en las destiladas, ya que en éstas se eliminan durante el proceso de destilación (Tablas 8, 9, 10) (Mc Analley, 1988).

II.3.2. EL TEQUILA Y EL BRANDY.

Dos de las bebidas que más se consumen en México son el brandy y el tequila. El primero se obtiene a partir de la destilación de vinos elaborados con uva fresca, cuyos mostos fueron sometidos a la fermentación alcohólica, una vez destilado se almacena en barriles de roble blanco para que adquiera las características organolépticas deseadas. El tequila es un aguardiente que se obtiene a partir del Agave tequilana (Weber), que oficialmente se cultiva en cualquier población del Estado de Jalisco y en parte de los Estados de Guanajuato, Nayarit y Michoacán. El proceso de elaboración comprende la cocción de los núcleos centrales de la planta, los que posteriormente son molidos para obtener los jugos que se fermentan para destilarlos finalmente. Existen tres tipos de tequila: blanco, reposado y añejo. El primero se envasa de inmediato, el reposado es el tequila blanco que se almacena dos o tres meses en barricas de encino, mientras que el añejo es aquel que permanece almacenado por un período mas largo, hasta que adquiere un color ámbar. Las normas oficiales de México para estas bebidas se dan en la tabla 3 (Secretaría de Comercio y Fomento Industrial 1983a, 1983b).

II.4. ALCOHOL

II.4.2. ABSORCIÓN Y METABOLISMO

Cuando se ingiere alcohol, se absorbe rápidamente por difusión en duodeno y yeyuno (80%) y más lentamente en estómago e intestino largo. Entre los factores que afectan la absorción del etanol se tienen: la concentración de alcohol, el flujo sanguíneo en el sitio de absorción, las propiedades irritantes del alcohol, el grado de ingestión, el tipo de bebida, el contenido de alimentos en el estómago, deficiencias proteicas, temperatura corporal, ejercicio físico, ciclo menstrual y características raciales (Agarwal y Goedde, 1990).

El hígado es el órgano donde el etanol se oxida casi en su totalidad a acetaldehído. Hay tres mecanismos para que esto se lleve al cabo: el sistema de oxidación microsomal (SOM) localizado en el retículo endoplásmico liso, la catalasa localizada en los peroxisomas y la alcohol deshidrogenasa (ADH) presente en el citosol. Una vez que esto ocurre, el acetaldehído se transforma en acetato por medio de la aldehído deshidrogenasa (ALDH), este metabolito puede dar origen a cuerpos cetónicos, ácidos grasos, aminoácidos y esteroides vía la Acetil Co A (Leiber y De Carl, 1972; Lieber, 1981).

El SOM es dependiente de NADP y está ligado al citocromo P450; en el paciente alcohólico se incrementa la actividad de este mecanismo y lo hace mas tolerante al etanol, además aumenta la producción de acetaldehído el que provoca una variedad de efectos tóxicos en la célula. Aunado a lo anterior, la inducción del SOM juega un papel importante en la hepatotoxicidad de un gran número de drogas y compuestos carcinogénicos, a través de un incremento en el metabolismo de estas sustancias (Koop y Coon, 1985).

Con respecto a la catalasa, se sabe que puede estar involucrada en la oxidación de una gran variedad de alcoholes a sus correspondientes aldehídos, en general se acepta que la contribución de esta enzima en la oxidación del etanol es mínima (Lieber et al. 1987).

La ADH es la enzima mas importante en el metabolismo del etanol, que además puede oxidar una gran variedad de alcoholes primarios, secundarios, terciarios y cíclicos. La ADH tiene una distribución universal en los distintos seres vivos (animales, plantas y microorganismos). Esta enzima, en la especie humana está formada por un dímero proteico constituido por dos subunidades con un peso de 40 000 daltons cada una (Agarwall y Goedde, 1990). Actualmente se conocen siete loci diferentes: ADH1, ADH2, ADH3, ADH4, ADH5, ADH6, ADH7 que codifican las subunidades, α , β , γ , π , χ , μ y σ respectivamente. Las diferentes formas moleculares de ADH se dividen en seis grupos, I, II, III, IV, V y VI, de acuerdo con su composición y las propiedades cinéticas y electroforéticas (Tabla 11) (Deuster et al. 1985; Eriksson, 1987; Agarwal y Goedde, 1990).

Las isoenzimas de la clase I están formadas por asociaciones diméricas al azar de las subunidades alfa, beta y gamma codificadas por ADH1, ADH2, ADH3, se sabe que los dos últimos genes son polimórficos. Estas isoenzimas tienen una alta capacidad para metabolizar el etanol y son las más importantes en el metabolismo de éste. Se localizan principalmente en el hígado pero también pueden estar presentes en el riñón, tracto gastrointestinal y pulmones. Los genes que codifican este grupo se han localizado recientemente en el cromosoma 4, entre q21 y q24 (Smith et al. 1971, 1973, 1985; Agarwal y Goedde, 1990). La clase II lo constituyen enzimas formadas por dos monómeros π y solo se han localizado en hígado (Ditlow et al. 1984). Las del grupo III están formadas por dímeros de péptidos χ , son poco frecuentes, se localizan en varios tejidos como hígado, riñón y se asume que no participan

significativamente en la oxidación del etanol en el hígado. Los genes que codifican los monómeros también se han localizado en el cromosoma 4 en la región q21 - q24 (Julia et al. 1987; Agarwal y Goedde, 1990). La clase IV se expresa preferentemente en estómago, pero también se localiza en pequeñas cantidades en hígado, piel y córnea. El locus ADH7 codifica para las subunidades μ y σ . La V se ha detectado únicamente en el epitelio gástrico y el homodímero está codificado en el gene ADH6. Finalmente la clase VI, ha sido descrita en algunos mamíferos y hasta ahora no ha sido localizada en la especie humana. El dímero VI presenta muchas similitudes con el de la clase IV (Zheng et al. 1993; Arnon et al. 1995; Hsu et al. 1995; Rivero et al. 1997).

En relación a la ALDH, una vez que el etanol se transforma en acetaldehído, éste se metaboliza rápidamente por medio de esta enzima. Existen cuatro isoenzimas; una en el citosol, dos mitocondriales y una microsomal. Basándose en su movilidad electroforética se han clasificado en: I, II, III y IV, la primera se mueve más rápidamente hacia el ánodo que la II, seguida por la III y la IV (Harada et al. 1985; Mac Karell et al. 1986; Eriksson, 1987; Takase et al. 1989). La ALDH I y II se encuentran principalmente en hígado, riñón, intestino y cerebro, la III en estómago, pulmones y testículos y la IV se encuentra en hígado y riñón (Agarwal y Goedde, 1990). Estudios recientes indican que la información genética para la clase I se localiza en el cromosoma

9, la de la clase II en el 12 y la de la clase III en el 17. Con respecto a la IV, se han identificado varios dímeros cuyos alelos se han denominado como ALDH4, ALDH5, ALDH6, ALDH7 y ALDH8: los genes de ALDH5 y ALDH6 se han localizado en los cromosomas 9 y 6 respectivamente, mientras que los de ALDH7 y ALDH8 están en el cromosoma 11 (Hsu et al. 1985 y 1995; Braun et al. 1986; Agarwal y Goedde 1990).

III. ANTECEDENTES.

III. ANTECEDENTES

III.1. ALCOHOL, BEBIDAS ALCOHÓLICAS Y MUTAGÉNESIS

La ingesta de bebidas alcohólicas se ha asociado a cáncer en la boca, esófago, laringe, estómago, colon, recto, endometrio e hígado (Winder y Bross 1961; Winder et al. 1977; Polack et al. 1984; Rosemberg et al. 1990; Webster y Weiss, 1989). Existen casos en los que se observa una estrecha relación entre ciertas bebidas y procesos oncogénicos específicos, por ejemplo, algunos vinos se relacionan con cáncer en vías digestivas (Chun-Le et al. 1986; Barra et al. 1990). Considerando esta asociación, grupos de investigadores se han dado a la tarea de establecer si el etanol, acetaldehído, las bebidas alcohólicas o algunos de sus acompañantes, tienen la capacidad de modificar el material genético. Para lograr lo anterior se han empleado distintos métodos del área de la Genética Toxicológica así como distintos modelos biológicos.

El análisis citogenético realizado en linfocitos de pacientes alcohólicos e hijos de madres alcohólicas, muestran en general que los alcohólicos tienen una elevada frecuencia de aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas, sin embargo, los hijos de las madres alcohólicas presentan niveles normales de intercambio de cromátidas hermanas (De Torok, 1972; Mitelman y Wadstein, 1978; Butler et al. 1981; Seshandri et al. 1982; Hedner et al. 1984; Obe et al. 1986; Madrigal et al. 1990). De los resultados obtenidos en cultivos celulares, en los que se probó la actividad mutagénica de distintas dosis de etanol se concluye que el alcohol *in vitro* no tiene efectos mutagénicos (Cadotte et al. 1973; Obe y Ristow, 1977; Obe et al. 1986). Cuando a los cultivos, de linfocitos, además de etanol se les agrega la fracción microsómica S9 de hígado de rata, el etanol se transforma en

acetaldehído y se observa un aumento en las aberraciones cromosómicas. De aquí se concluye que es el acetaldehído el que provoca alteraciones en el material hereditario (Bardr y Hussain, 1977; Jansson, 1982; De Raat et al. 1983; Obe y Anderson, 1987).

En animales de laboratorio también se ha investigado la actividad genotóxica del etanol y del acetaldehído. En ratones, ratas y hamster chino estas sustancias originan aberraciones cromosómicas e incrementos en las frecuencias de intercambio de cromátidas hermanas (Korte et al. 1979, 1981; Obe et al. 1979; Tates et al. 1980). La actividad mutagénica de distintas bebidas alcohólicas, así como de algunos de sus acompañantes han sido investigadas *in vitro*. Se ha visto que algunas variedades de brandis y wiskis no provocan aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos (Hoeft y Obe, 1983), sin embargo, existen otras análogas que si elevan la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas en cultivos de células de hamster chino, con y sin la fracción microsómica S9 (De Raat et al. 1983). Los evaporados de bebidas similares a las anteriores, en cultivos de linfocitos humanos y en presencia o ausencia de activadores metabólicos, también tienen efectos sobre el material hereditario (Hoeft y Obe, 1983).

III.2. ALCOHOL Y HORMONAS SEXUALES MASCULINAS.

Los alcohólicos crónicos frecuentemente presentan hipoandrogenización e hiperestrogenización. Signos de lo primero son la impotencia sexual, atrofia testicular y esterilidad, de lo segundo son, distribución de la grasa corporal siguiendo patrones femeninos y ginecomastia (Valimaki y Ylikahri, 1981; Eagon et al. 1983; Valimaki et al. 1984; Hojnacki et al. 1989).

Para explicar los fenómenos anteriores es necesario considerar el efecto del etanol, del acetaldehído o de ambos, sobre el testículo, eje hipotálamo - hipofisario e hígado así como sus repercusiones en las hormonas y elementos relacionados con el buen funcionamiento reproductor.

La mayoría de los investigadores coincide en que el etanol afecta directa e indirectamente las hormonas esteroideas masculinas. El efecto directo es sobre las células de Leydig, que disminuyen su síntesis de testosterona y el indirecto es sobre el hipotálamo y la pituitaria, que son estimulados para secretar la hormona liberadora de la LH y FSH respectivamente (Van Tiel et al. 1974; Green y Hollander 1980; Cicero, 1981). Los estudios *in vitro* con células de Leydig indican que, el etanol también disminuye la unión de LH a receptores de membrana y que estas células contienen enzimas para metabolizar etanol, con la consecuente disminución de NAD y reducción en la síntesis de testosterona (Mendelson et al. 1983; Hojnacki et al. 1989). Además el etanol y el acetaldehído inhiben a las enzimas microsómicas involucradas en la esteroidogénesis como son la 3 β hidroxí esteroide deshidrogenasa, la 17 O oxidoreductasa y la 17 β hidroxí esteroide óxido reductasa que convierte la androestenodiona en testosterona. Estos cambios metabólicos contribuyen a la disminución en los niveles de testosterona (Cicero y Bell, 1980; Cicero et al. 1980, Mendelson et al. 1983). También, en respuesta a la baja en los niveles de testosterona, hay un aumento en la producción de LH (que es regulada por la hormona liberadora de LH) (Cicero et al. 1980; Hojnacki et al. 1989).

En el hígado, el alcohol estimula la degradación de testosterona, a través de la 5 α reductasa y de varias aromatasas, la primera inicia el catabolismo hepático de la testosterona, mientras que las segundas promueven la conversión de andrógenos a estrógenos (Cicero et al. 1980; Cicero, 1981). En este órgano existen proteínas que se unen a estrógenos que regulan la concentración de

estrógenos en los machos, el etanol disminuye esta proteína provocando un incremento en los estrógenos.

En los alcohólicos con daño hepático se incrementan los niveles de prolactina, que inhibe la producción de andrógenos, la liberación de factores gonadotróficos y disminuye la producción de testosterona. Los niveles elevados de prolactina se han asociado con el desarrollo de ginecomastia en pacientes alcohólicos (Van Thiel y Gavaler, 1982). La disminución de los niveles de testosterona está relacionado con alteraciones en la espermatogénesis, lo que aunado al aumento de los niveles de estrógenos, provoca la feminización del paciente alcohólico (Hojnacki et al. 1989).

III.3. COMPLEJO SINAPTONÉMICO Y DAÑO GENÉTICO.

Los avances metodológicos que se dieron en la década de los años 70s como son el empleo de nuevos procedimientos de tinción histológica, elaboración de preparaciones con células dispersas, y el uso de microscopía de luz y electrónica, han permitido conocer mejor la morfología de las células germinales y la evolución de éstas durante la profase meiótica (Esponda, 1981). De manera paralela, estos conocimientos se han empleado para conocer las modificaciones que sufre el complejo sinaptonémico cuando existen alteraciones cromosómicas y/o problemas de fertilidad y el impacto de agentes químicos y físicos (Moses, 1979).

Se ha observado que cuando hay inversiones pericéntricas heterocigóticas el patrón de apareamiento cromosómico se altera, hay formación de CS pero en algunos casos se originan asas de inversión y en otros asinapsis (De Pertigo et al. 1989; Gabriel-Robes et al. 1986, 1988a). En el caso de las inversiones heterocigóticas paracéntricas, también se han descrito asas en los bivalentes

apareados (Porman et al. 1981; Moses et al. 1987) Cuando hay translocaciones recíprocas balanceadas durante la meiosis, tanto en hombres como en animales, se han descrito estructuras cromosómicas multivalentes, que se reflejan en el CS como formas multiaxiales (Ferguson et al. 1983; Gabriel-Robes et al. 1988b; Luciani et al. 1987; Barlow y Hulten 1997).

Con referencia a los individuos con problemas de fertilidad, en algunos casos se ha observado que pueden estar asociados con alteraciones del apareamiento cromosómico, entre las que se pueden mencionar; desinapsis parcial en algunos bivalentes, estructuras multiaxiales y asas (Mittwoch y Mahadevaiah, 1972; Templado et al. 1981; Vidal et al. 1982; Egoscue et al. 1983; Luciani et al. 1987).

En relación al efecto de los agentes físicos sobre el C.S. de espermatozoides, podemos decir que los rayos γ provocan alteraciones en el comportamiento del CS: los rayos γ originan principalmente estructuras multiaxiales (Kaliniskaya et al. 1986a, 1986b; Borodin et al. 1994) y los X, fragmentaciones, asinapsis autosómicas parciales y totales, multiaxiales, asas, anillos y asociaciones heteroteloméricas (Cawood y Breckon, 1983, 1985; Masumbuko et al. 1992).

El estudio del efecto de los agentes químicos sobre el CS es más reciente y hasta nuestro conocimiento son pocos los que se han estudiado, pues en la literatura no se mencionan más de 10, entre los que podemos citar: mitomicina C, ciclofosfamida, sulfato de vinblastina, colchicina, dietil-etil-bestrol, estradiol, testosterona, acetato de ciproterona y tequila. En su conjunto provocan alteraciones como fragmentaciones, anomalías sinápticas y estructuras multiaxiales (Golstein, 1986; Allen et al. 1987; 1988; Baker et al, 1988; Tapia et al. 1992; Masumbuko et al. 1993; Tepperberg et al. 1997).

En células femeninas de rata y ratón, también hay estudios del efecto de agentes químicos y físicos sobre el C.S., sin embargo, los experimentos son pocos, debido tal vez a dificultades de carácter metodológico. Entre éstos podemos citar los realizados con radiaciones ionizantes y ciclofosfamida. En general el tipo de alteraciones encontradas es muy similar a la descrita en espermatozoides, pero existen grandes diferencias cuantitativas; por ejemplo en el testigo negativo las fragmentaciones llegan a 45%, mientras que en los tratados es mayor del 50%. Se han dado dos explicaciones, una considera que el número elevado de rupturas se da de manera natural en los testigos y que ésta se incrementa con el tratamiento. La otra considera que probablemente es resultado de la metodología empleada y que ésta se incrementa debido a la acción de los agentes estudiados (Cusidó et al 1995; Johannisson et al. 1994; Reiner y Ocker, 1997).

Los mecanismos exactos que explican estos fenómenos no se conocen, no obstante el daño en el C.S. se explica fundamentalmente a partir del modo de acción de los agentes estudiados y de la magnitud de la exposición (Backer et al. 1988; Tepperberg et al 1997).

IV. HIPÓTESIS DE TRABAJO.

IV. HIPÓTESIS DE TRABAJO.

Considerando:

1. Que el etanol y algunas bebidas alcohólicas tienen propiedades mutagénicas (Obe y Anderson 1987; Madrigal, et al. 1990).
2. Que el complejo sinaptonémico puede reflejar cambios en el material hereditario y/o alteraciones en el desarrollo normal de este organelo, como resultado de la actividad de agentes mutagénicos (Moses et al. 1977, 1990; Allen et al. 1988, 1990).
3. Que la ingesta de bebidas alcohólicas puede provocar alteraciones en el proceso espermatogénico y en la fertilidad de los pacientes alcohólicos (Van Thiel et al. 1982; Agarwal y Goedde 1990).
4. Que los andrógenos, estrógenos e inhibidores de la testosterona pueden provocar cambios en la estructura del C.S. (Masumbuko et al. 1992 y 1993)

Entonces es probable que:

Al tratar ratones con distintas dosis de etanol, tequila o brandy, haya daño que pueda manifestarse como cambios estructurales del complejo sinaptonémico y modificaciones en la proporción de células en paquíteno, en relación a la población general de las células de testículo.

V. OBJETIVOS.

V OBJETIVOS.

Para demostrar la validez o no de la hipótesis propuesta en este trabajo se plantean los siguientes objetivos:

1. Determinar las posibles alteraciones estructurales en el complejo sinaptonémico en células de testículo de ratón, producidas por etanol, tequila y brandy.
2. Establecer la proporción de células en paquíteno en relación a la población celular total.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS.

a) Reactivos: metanol (Baker), ácido acético (Baker), cloruro de sodio (Baker), cloruro de potasio (Baker), nitrato de plata (Baker), xilol (Baker), ácido fórmico (Baker), gelatina (Bioxon), ciclofosfamida (Schering), etanol (96° APSA), tequila (Sauza blanco 40° G.L.) y brandy (Presidente 38° G.L.).

b) Ratones NIH (sw) de tres meses de edad y con peso de 25 - 30 grs, se trataron con las dosis de las bebidas alcohólicas. La obtención de las dosis a probar se establecieron a partir del método de Lorke (1983) y de la información aparecida en la literatura, que relaciona el grado de intoxicación con la cantidad de alcohol ingerida (Garriott, 1988). Las dosis que se administraron diariamente, por vía oral (empleando una cánula) y durante tres semanas fueron: 1, 2 y 3 grs de etanol por kg de peso, (Dosis 1, Dosis 2 y Dosis 3) , utilizando soluciones de etanol al 20 % (96° G.L.), tequila (Sauza blanco) al 20% (40° G.L.) y brandy (Presidente) al 18 % (38° G.L.) Estas dosis corresponden a un estado de sobriedad, excitación y estupor respectivamente.

Los grupos testigo negativo y positivo recibieron un tratamiento similar en cuanto a la forma de administración y duración, en el primer caso se empleó una solución salina fisiológica (0.9% de NaCl) y en el segundo ciclofosfamida (20 mg/kg).

Los experimentos se efectuaron por duplicado utilizando grupos de tres ratones por cada tratamiento y se designaron como Experimento I y Experimento II.

De manera paralela a los experimentos anteriores, se administró, por vía oral y por tres semanas, a cuatro grupos de cuatro ratones cada uno, una solución fisiológica, etanol, tequila y brandy (3 gr/kg/día). Estos animales se pesaron

antes del inicio de la primera administración y antes desacrificarlos. Los testículos también se pesaron (Tabla 12, 13, 14)

c) Obtención de células. Una vez terminado el tratamiento, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajeron los testículos a los que se les quitó la túnica albugínea. El tejido se colocó en 3 ml de una solución de KCl 0.075 M y las células se dispersaron, resuspendiéndolas con una pipeta Pasteur ($\theta=3\text{mm}$). Posteriormente se dejó sedimentar el tejido y el sobrenadante se puso en un tubo de ensayo, esta operación se repitió dos veces más. A continuación se centrifugó durante 10 minutos a 1500 rpm, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron nuevamente en 10 ml de KCl, esta operación se repitió dos veces.

Después de la última centrifugación, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 10 ml de fijador (ácido acético:metanol, 1:3), a continuación se centrifugó 10 minutos a 1500rpm se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 3 ml de fijador.

Con la suspensión celular se hicieron las preparaciones, dejando caer tres gotas en un portaobjetos previamente lavado y desengrasado; las laminillas se dejaron secar al aire (Evans, 1964).

d) Impregnación argéntica. A las laminillas se les agregaron dos gotas de nitrato de plata al 50 % y una gota de una solución de gelatina (100 ml de agua destilada, 2 gr de gelatina y 0.05 ml de ácido fórmico). Se colocaron un cubreobjetos y se dejaron actuar a los reactivos durante dos minutos aproximadamente y a una temperatura de 70° C. Posteriormente, se lavaron con agua desionizada. Se deshidrataron con xilol y se montaron con resina sintética (Howell y Black, 1980).

e) Análisis de las laminillas La revisión de laminillas se realizó a 1250 aumentos. Se analizaron 30 células en paquíteno por cada ratón, en la perspectiva de establecer si existen alteraciones análogas a las descritas en la literatura, como son rupturas en el C.S., elementos laterales, multiaxiales y fallas sinápticas (Backer et al 1988; Masumbuko et al. 1993) aunado a lo anterior se determinó el porcentaje de células en paquíteno, en relación a la población total de células germinales. El análisis se realizó a ciegas, al final de la revisión se descodificaron las laminillas y se analizaron los resultados obtenidos.

f) La comparación entre las medias de las frecuencias de alteraciones encontradas en los grupos testigos y los grupos problema, se realizó empleando la prueba "t" de Student, análisis de varianza y prueba de Tukey ($p=0.05$) (Hurley et al 1981), posteriormente se interpretaron los resultados y se postularon hipótesis para explicarlos.

VII. RESULTADOS.

VI RESULTADOS.

1 - Peso corporal y testicular

El peso de los animales, antes y después del tratamiento, mostró una variación de 0.6 a 4.1 gramos (Tabla 12). Al aplicar la prueba estadística de "t" de Student ($p=0.05$) (utilizando la media de la diferencia de peso antes y después del tratamiento), se encontró que con respecto a los grupos testigo, los tratados con 1 y 2 gramos de etanol, 1 gramo de tequila y 1, 2 y 3 gramos de brandy, no presentaron diferencias significativas. Con 3 gramos de etanol y 3 de tequila se encontró que había una disminución significativa de peso. En el caso de los tratados con 2 gramos de brandy hubo un incremento de peso. El peso corporal del grupo adicional tratado con las dosis más altas de etanol tequila y brandy no mostraron una disminución significativa (Tabla 13).

El incremento de peso podría ser resultado del proceso normal de crecimiento, y la disminución en los animales tratados con las dosis más altas, tal vez son resultado de un efecto tóxico más severo.

El peso de los testículos se encontró en un rango de 0.12 a 0.095 gramos y no se encontraron diferencias entre los testigos y los animales tratados con las soluciones de etanol, tequila y brandy equivalentes a 3 gramos de etanol (Tabla 14).

2.- Alteraciones del Complejo Sinaptonémico.

Las alteraciones que se encontraron en los Experimentos I y II fueron: rupturas en el Complejo Sinaptonémico y en los elementos laterales (REL). En el primer caso las células se clasificaron en dos: las que presentaban una ruptura (RCS 1) y las que tenían dos (RCS 2) (Tabla 15a y 15b).

Se analizaron estos parámetros por separado y la suma total de rupturas (STRCS). En los Experimentos I y II se encontró que la alteración que se presenta con más frecuencia es la ruptura simple del complejo sinaptonémico (RCS 1), seguida por las rupturas de los Elementos Laterales (REL) y por último las rupturas dobles del C.S. (RCS 2). Al comparar los resultados obtenidos en los animales tratados con las soluciones alcohólicas con los testigos negativos, se encontró que: a) hay una diferencia significativa en RCS 1 en las dosis 3 de etanol, 2 y 3 de tequila y 3 de brandy, b) cuando se suma el total de alteraciones, se encuentran las mismas diferencias que en el inciso anterior (Tablas 16 y 17. Gráficas 1 y 2).

También se compararon los resultados del Experimento I (Tabla 15a) con los del II (Tabla 15b) utilizando la prueba de "t" de Student, con el objeto de establecer si estos datos eran similares o no, y se encontró que no había diferencias significativas entre las medias de las dosis análogas de cada experimento, por lo que se sumaron los datos (Tabla 15c). Se realizó el análisis de varianza y la prueba de Tukey para cada uno de los parámetros estudiados y se encontró que había diferencias significativas en la dosis 3 de etanol, 2 y 3 de tequila y 3 de brandy, tanto en RCS 1 como en STRCS. En el caso de las REL únicamente se encontró una diferencia significativa en la dosis 3 de tequila (Tabla 15c. Gráfica 3).

3.- Frecuencia de células en paquíteno.

Al cuantificar la frecuencia de células en paquíteno en una muestra de 1000 células de toda la estirpe espermatogénica, tanto en los animales testigos (Tabla 19) como en los tratados con las soluciones alcohólicas (Tabla 20, 21 y 22), se encontró que: en los testigos, negativo y positivo, el número de células en paquíteno estaba en un rango de 194 a 197 mientras que en los en los segundos estaba entre 188 y 211. El análisis estadístico indica que no hay diferencia entre los testigos y los tratados con las soluciones etílicas.

VIII. DISCUSIÓN.

VII. DISCUSIÓN

El conocer la manera en que afectan los agentes químicos al material genético de las células germinales masculinas y la posible herencia de alteraciones a la descendencia, ha motivado el desarrollo de distintas metodologías que se aplican y convergen en éste objetivo. Para lograr lo anterior, se ha utilizado con frecuencia como modelo experimental al ratón; de tal forma, que en la actualidad ya se tienen bien caracterizados morfológicamente los distintos tipos celulares de testículo, se conocen algunas interacciones intercelulares y eventos bioquímicos que se dan durante la espermatogénesis, y los tiempos que son necesarios para que ocurran los diferentes procesos de división mitótica, meiótica y diferenciación celular (Russell, 1990; Moses et al. 1990; Fritz, 1990) (Fig. 1)

El complejo sinaptonémico (C.S.) es una estructura proteica asociada a los cromosomas de la profase meiótica y es un requisito en muchos organismos, aunque no único, para que ocurran el reconocimiento de homólogos, el intercambio de información genética entre éstos, inicio y progresión sináptica, la separación de los bivalentes durante el diplóteno y la segregación cromosómica. Se ha sugerido que los quiasmas son reminiscencias del C.S. y que es uno de los factores que mantienen unidos a los cromosomas durante la metafase I, lo que asegura una buena segregación (Burgoyne y Baker, 1984; Hotta et al. 1985; Warren et al. 1987; Allen et al. 1990).

VII.1. Complejo Sinaptonémico y Agentes Físicos y Químicos.

La interpretación de los resultados encontrados en este trabajo se da en el contexto de los cambios reportados por otros autores en el C.S., cuando

animales de laboratorio son sometidos a la acción de agentes físicos y químicos.

a) Cuando a ratones se someten a distintas dosis de rayos X, se observa que a partir de 24 horas aparecen distintos tipos de alteraciones sinápticas y morfológicas y que éstas persisten hasta 16 semanas después del tratamiento, aunque en menor proporción (Masumbuko et al. 1992). En experimentos similares, además de las alteraciones en el C.S., se observa que el daño puede pasar a metafase I y II, aunque en cantidades menores con respecto a las del C.S. (Cawood y Breckon, 1983, 1985). Esto último debido muy probablemente a que se repara el daño en el C.S. o porque las células mueren y no pasan a la siguiente etapa (Moses et al. 1990; Allen et al. 1990). En otro experimento en el que ratones macho se irradiaron con rayos X, se observó que parte de su descendencia (aproximadamente el 8 %) es estéril y presenta distintos tipos de alteraciones en el C.S. (Kalikinskaya, 1986a, 1986b).

Los rayos γ también provocan un patrón de alteraciones en el C.S. similar a los rayos X, tanto en espermatoцитos como en ovocitos, sin embargo en los últimos la magnitud de alteraciones estructurales es mucho mas grande que en los primeros (Johannisson et al. 1994)

b) A partir de la segunda mitad de la década de los 80s, el C.S. se ha empleado para determinar el impacto de los agentes químicos con actividad mutagénica bien conocida, además los agentes alquilantes que se han estudiado son la ciclofosfamida (10-200 mg/kg) y la mitomicina C (0.5 - 5 mg/kg). Estos compuestos tienen actividad clastogénica, elevan la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas, en médula ósea de ratón (Morales 1980) y espermatogonias (Allen y Latt, 1976a, 1976b). Se sabe que estos fármacos actúan sobre la fase S provocando entrecruzamientos en el DNA, lo cual puede alterar los procesos normales de reparación y síntesis de DNA

(Bempong y Trower, 1975; Adler, 1982; Allen et al. 1976a, 1976b, 1986). El daño que provocan estos agentes químicos en el C.S. empiezan a aparecer a los 3 días y el máximo se observa a los 5 días, tendiendo a disminuir, sin embargo, puede persistir el daño hasta 50 días. Los principales tipos de modificaciones que sufre el C.S. son: fragmentación del C.S. y de los E.L., alteraciones sinápticas y estructuras multivalentes, cuantitativamente predominan las primeras. En ovocitos de ratas tratadas con ciclofosfamida, también se han encontrado los mismos tipos de alteraciones. A partir de lo anterior se asume que estos fármacos actúan en la fase S y que el daño que provocan en el DNA conlleva a daño en el C.S. (Allen, 1988; Moses et al. 1990; Cusido et al. 1995; Johannisson y Ocker 1997).

La aparición continua de daño en el C.S. es una medida a largo plazo de los efectos de la sustancia estudiada y que podrían ser potencialmente heredables. Se ha demostrado que existe una correlación entre el daño provocado por la ciclofosfamida en el C.S. y el daño cromosómico que se observa en metafases I y II. Hay cuatro veces más daño en el C.S. que aberraciones en metafase I y II, tal vez porque se repara el daño o porque las células alteradas se pierden. Usando timidina tritiada se determinó que el daño observado en el C.S., MI y MII se originó en la fase S (Backer et al. 1980; Moses et al. 1990).

c) Con respecto al efecto de la colchicina y el sulfato de vinblastina, que son sustancias que interfieren con la polimerización de la tubulina, con actividad clastogénica, el efecto principal sobre el C.S. es la producción de alteraciones sinápticas y en menor grado estructurales y formación de estructuras univalentes. Estos cambios aparecen en paquíteno temprano y medio, 48 horas después del tratamiento, lo que indica que el daño ocurre durante el leptóteno-cigóteno, justo en el momento de la formación del C.S. (Gibson y Moses, 1986; Allen, et al. 1988; Moses, et al. 1990; Tepperberg et al. 1997).

d) Con el objeto de conocer si el C.S. es alterado por otras sustancias consideradas como no mutagénicas, se han realizado experimentos utilizando estrógenos, andrógenos y un antiandrógeno: benzoato de estradiol, enantato de testosterona y acetato de ciproterona. Las alteraciones que provocan el benzoato de estradiol y el acetato de ciproterona son fundamentalmente fragmentaciones y anomalías sinápticas; no se encontraron estructuras multiaxiales. Esto indica que probablemente los daños observados no tienen relación con alteraciones en el material genético, sino con la estructura proteica del C.S., lo cual podría deberse a una disminución en la testosterona y los cambios que esto provoca en la síntesis de proteínas. Cuando a los animales se les administra testosterona, también se detectan alteraciones en el apareamiento, aunque en menor grado que en los experimentos anteriores. Esto sugiere que podría haber distintos mecanismos en la producción de este tipo de alteraciones. (Masumbuko et al. 1992, 1993; Tepperberg et al. 1997).

VII.2. Hipótesis para explicar la generación de alteraciones en el CS.

El conjunto de trabajos descritos anteriormente nos indican que el Complejo Sinaptonémico puede sufrir alteraciones en su estructura, las cuales pueden ser resultado de la acción de agentes con propiedades mutagénicas plenamente demostradas o bien del efecto que tienen otras sustancias en la fisiología del organismo y que no son clastogénicas. Es decir, las alteraciones en el C.S. pueden estar o no asociadas con el daño en el material hereditario. Los mecanismos que explican el daño parten del agente utilizado y la magnitud de la exposición, y se han propuesto tres hipótesis alternativas:

1) Los agentes alquilantes actúan sobre el DNA produciendo lesiones durante la fase S y los antimitóticos sobre las proteínas específicas (tubulina). Estos

compuestos dan efectos cualitativamente similares pero cuantitativamente diferentes. Teniendo por cierto, que la relación o asociación entre el DNA con sub-unidades proteicas de los elementos laterales, se lleva a cabo al mismo tiempo que el ensamble de filamentos finos que unen a los elementos laterales se sugiere que: (a) el ensamble lineal de los elementos laterales/axiales depende de la interacción subunidad-subunidad y de la unión subunidad-DNA y (b) que la alineación y sinapsis de los elementos laterales resulte de la interacción de filamentos de la región central con subunidades de los elementos laterales y posiblemente con otras proteínas. De esta hipótesis se desprende que la alineación de los homólogos implica la unión de secuencias específicas de DNA con proteínas de los elementos laterales, los cuales posteriormente se unen para formar el C.S. (Moses et al. 1990; Moens y Pearlman, 1990). De acuerdo con lo anterior, la interrupción en la continuidad estructural del C.S. (rupturas), resultante de la acción e interferencia de agentes alquilantes con la replicación y/o reparación de DNA, podría ser la consecuencia de fallas localizadas de la unión DNA-elemento lateral y así provocar discontinuidades. De manera similar, las lesiones inducidas en el DNA durante la fase S, podrían interferir con la unión de proteínas de la región central con el DNA, que es necesaria para el reconocimiento de homólogos y el desarrollo de la sinapsis. El daño generalizado en el DNA podría provocar fallas en dos o mas tipos de interacciones de DNA con proteínas. Una clase podría provocar fragmentaciones del C.S., mientras que otras provocarían un bloqueo en el reconocimiento de homólogos e iniciación sináptica (Moses, 1968; Solari, 1972; Moses et al. 1990:).

Otros autores, en relación con las rupturas o fragmentaciones, mencionan que existe incertidumbre en cuanto a si estas reflejan un daño en la estructura proteica o si esto es una manifestación de rupturas cromosómicas. En el primer caso podría deberse a alteraciones en la síntesis de proteínas, como en

el caso de los andrógenos y estrógeno, y en el segundo a rupturas cromosómicas. (Cusidó et al. 1995; Johannisson y Ocker, 1997).

2) La principal reacción de los antimitóticos es con la tubulina, y provocan fundamentalmente fallas sinápticas. En relación a este hecho se ha postulado que los antimitóticos alteran los procesos sinápticos, al impedir el movimiento rotatorio de los cromosomas durante el cigóteno, esto podría evitar el apareamiento de los homólogos. Se sugiere que las radiaciones también podrían alterar el movimiento de los cromosomas y dar origen a fallas sinápticas (Moses, et al. 1990; Tepperberg et al 1997).

El metabolismo que se da durante la profase meiótica también podría contribuir a la explicación de las fallas sinápticas. Durante la fase S, de manera normal se suprime la síntesis de secuencias específicas de DNA, que posteriormente se replican durante la profase, aparentemente en relación con el apareamiento cromosómico (DNA_{cig}) o con el intercambio genético y reparación (DNA_{paq}). Se ha demostrado que la interferencia en la replicación de DNA_{cig} interfiere con la formación del S.C. (Roth e Ito, 1967; Williams 1970). Se ha postulado que la colchicina podría provocar cambios metabólicos asociados con la formación del C.S. o inhibición de síntesis de DNA_{cig} o DNA_{paq}, originando una pérdida en el control genético que regula el apareamiento o discontinuidades al momento que se forma el C.S. Este postulado también se ha propuesto en el caso de las fallas sinápticas provocadas por hormonas esteroides (Roth y Parchman, 1971; Hotta, et al. 1984; Allen, et al. 1988; Masumbuko et al, 1992 y 1993).

3) Los radiaciones pueden provocar rearrreglos cromosómicos, entre los que se cuentan las translocaciones, a partir de esto se propone que la presencia de estructuras multiaxiales son reflejo de alteraciones en el material hereditario.

Se da una explicación similar en el caso de los agentes alquilantes(Allen et al 19987; Backer et al. 1988; Cawood y Breckon 1993; Borodin et al. 1994).

Los resultados de este trabajo muestran que la estructura del C.S. de los animales tratados con las soluciones alcohólicas, puede sufrir cambios en función de las concentraciones empleadas y del tipo de bebida, Se encontraron rupturas del C.S. y de los Elementos Laterales. Los animales tratados con ciclofosfamida también presentaron alteraciones, que numéricamente fueron mayores a las encontradas en el resto de los ratones.

Al comparar los resultados de éste trabajo, que ya han sido publicados (Piña et al. 1994, 1997), primero con los descritos en la literatura y después entre ellos se observa lo siguiente:

Los encontrados por otros investigadores, en animales tratados con ciclofosfamida (microscopía electrónica) (Allen et al. 1988, Backer et al. 1987, 1988) y/o tequila (microscopía de luz) (Tapia el al. 1992). coinciden de manera general con los de este trabajo, aunque hay algunas discrepancias.

Los primeros también reportan otro tipo de alteraciones como son: fallas sinápticas (asinapsis parcial o total) y apareamientos ilegítimos (apareamiento entre no homólogos y autoapareamiento de los elementos laterales). La evaluación de las fallas sinápticas y apareamientos ilegítimos es difícil de realizar empleando únicamente microscopía de luz, ya que en ocasiones las primeras podrían confundirse con los procesos normales de apareamiento (cigóteno tardío - paquíteno temprano) o de separación de homólogos (paquíteno tardío - diplóteno temprano), la confirmación o no de estas alteraciones se puede realizar únicamente empleando microscopía electrónica considerando otras características morfológicas (nódulos de recombinación). En el caso de los apareamientos ilegítimos es frecuente que los elementos

laterales de bivalentes, en células pre o post paquíteno, se sitúen de manera paralela, dando la impresión de asociaciones entre no homólogos, esto se puede establecer con exactitud empleando microscopía electrónica, ya que de esta forma se puede determinar si forman un verdadero CS o si sólo están situados paralelamente. En el caso de estructuras multiaxiales, también deben ser confirmadas con microscopía electrónica, ya que podrían ser resultado de sobreposiciones de bivalentes al momento de hacer las preparaciones. En los trabajos citados (Allen et al. 1988, Backer et al. 1987, 1988), primero se hace una evaluación con microscopía de luz y posteriormente se corroboran o no con electrónica.

En relación a los resultados encontrados en el trabajo realizado en ratones tratados con tequila y donde los testigos positivos se administraron con ciclofosfamida (Tapia et al. 1992) destaca lo siguiente:

a) Estos autores encuentran hasta 3.8 desinapsis/ratón en el testigo positivo y hasta 8.2 en los tratados con tequila; en ningún trabajo realizado hasta ahora (Allen et al. 1988, Backer et al. 1987, 1988), en el que se utilice ciclofosfamida, se han encontrado desinapsis. En este trabajo tampoco se encontraron, ni en los testigos positivos ni en los tratados con bebidas alcohólicas. Es probable que estén considerando como desinapsis a los elementos laterales no apareados durante cigóteno tardío o paquíteno temprano y que confundan desinapsis con asinapsis.

b) El número de rupturas en el testigo positivo es muy alto, 49 rupturas/ratón, mientras que los reportados para ciclofosfamida son en promedio de 18.1 (Allen et al. 1988, Backer et al. 1987, 1988). En este trabajo se encontraron en el testigo positivo 15 rupturas/ratón y hasta 10 en los tratados con bebidas alcohólicas. Estas diferencias podrían deberse fundamentalmente a los métodos de impregnación argéntica utilizados (Bloom, y Goodpasture, 1976;

Howell y Black, 1980). Al realizar el análisis con microscopía de luz es frecuente encontrar células donde la impregnación argéntica no es homogénea a lo largo de los bivalentes, dando la apariencia de rupturas. En este trabajo sólo se consideraron pares de homólogos impregnados uniformemente y en los que no había duda de la presencia de rupturas.

c) Reportan un número muy elevado de multiaxiales en el testigo positivo, 12.5/ratón, mientras que los reportados con microscopía electrónica son 7.5, casi la mitad (Allen et al. 1988, Backer et al. 1987, 1988).. En este trabajo no se consideraron este tipo de alteraciones, ya que es muy frecuente que un bivalente se sobreponga a otro de manera perpendicular dando la apariencia de multiaxial y esto podría dar lugar a interpretaciones equivocadas.

En este trabajo se encontraron fundamentalmente rupturas en el CS y en los elementos laterales: en el testigo positivo el análisis estadístico indica que existen diferencias significativas en relación al testigo negativo en los siguientes tratamientos: ciclofosfamida, dosis tres de etanol (3 g/Kg), dos y tres de tequila (2 y 3 g/Kg) y tres de brandy (3g/Kg).

VII.3 Bebidas Alcohólicas y Daño en el Complejo Sinaptonémico.

Para explicar nuestros resultados es importante partir de la siguiente consideración: el C.S. puede sufrir cambios en su estructura como una manifestación de alteraciones en el material genético y/o del metabolismo, resultantes de la exposición a agentes químicos o físicos (Backer et al. 1988, Masumbuko et al. 1993; Johannisson y Ocker 1997).

A las hipótesis que se mencionaron anteriormente para explicar el daño provocado por agentes alquilantes y hormonas esteroides, que en lo esencial

explican los resultados encontrados en este trabajo, hay que agregar lo siguiente:

a) Se ha demostrado que el etanol es mutagénico, a través de su primer metabolito, el acetaldehído (Obe et al. 1987) y que bebidas como el brandy y el tequila son mutagénicas en células de médula ósea de ratón. Además de que los congéneres de éstas son genotóxicos (Madrigal et al. 1991; Piña et al. 1993).

b) El acetaldehído es un compuesto muy reactivo debido a la naturaleza electrofílica del grupo carbonilo, que puede reaccionar con una gran variedad de macromoléculas (ácidos nucleicos, proteínas, fosfolípidos) para formar aductos (Tuma y Sorrell, 1985). Se ha demostrado que el acetaldehído puede formar aductos con la citosina y con nucleótidos que contienen purinas y con desoxinucleótidos (Gaines et al. 1977). También puede reaccionar con compuestos con grupos sulfidrilo como la cistina (Kallama y Hemminki, 1983). Además puede reaccionar con grupos amino del DNA y con grupos amino o tiol de las proteínas para producir entrecruzamientos DNA-DNA, DNA-proteína (Ristow y Obe, 1978; Lambert et al. 1985; Lam, et al. 1986). El acetaldehído puede provocar alteraciones en el desarrollo en ratas, incrementando la pérdida de preimplantaciones, reabsorciones fetales, malformaciones y retraso en el crecimiento (Barilyak y Kosachuck, 1983; Dellarco, 1988). Se ha sugerido que la teratogénesis podría ser el resultado de los efectos del acetaldehído sobre la síntesis de DNA y RNA (Dreosti et al. 1981). Los estudios citogenéticos para determinar la mutagenicidad del acetaldehído muestran que tiene propiedades clastogénicas e incrementa la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas. A lo anterior hay que agregar la capacidad que tiene el acetaldehído de alterar el DNA y las proteínas, lo cual modifica los procesos normales de síntesis y reparación de DNA y en consecuencia la estructura cromosómica normal. Esto podría repercutir en los procesos de apareamiento

de homólogos y en el ensamble de las proteínas que forman el complejo sinaptonémico, dando lugar a problemas de sinapsis y a discontinuidades (Dellarco, 1988).

c) Se han realizado estudios para establecer si algunas variedades de bebidas alcohólicas, los congéneres en general o algunos componentes en particular tienen o no actividad mutagénica. Los congéneres de algunos whiskies japoneses, americanos, canadienses y escoceses, así como los de algunos vinos rojos y brandies franceses resultaron mutagénicos en *Salmonella typhimurium* con y sin la fracción S9. Sin embargo, también se han reportado resultados negativos en algunas cervezas, vinos blancos y ginebras (Nagao et al. 1981; Stoltz, et al. 1982; Feinman y Lieber, 1988). Aunado a lo anterior se ha encontrado que evaporados de alguna variedad de whisky, ron, tequila y brandy incrementan la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (Hoeft y Obe, 1983; Madrigal et al. 1990, 1991; Piña et al. 1993).

Entre los compuestos presentes en las bebidas alcohólicas que se han identificado, aislado y probado su mutagenicidad destacan algunas nitrosaminas y flavonoides como la quercetina y la rutina, los que han resultado ser genotóxicos en sistemas bacterianos (Yahagi et al. 1977; Stoltz, et al. 1982; Rueff et al. 1984; Dorange et al. 1984; Nakayasu et al. 1986).

d) En pacientes alcohólicos se ha encontrado que puede existir una disminución en los niveles plasmáticos de testosterona, lo que explica en parte, la pérdida o disminución de la fertilidad. Por otro lado, ya se ha mencionado que una disminución en los niveles de testosterona pueden ocasionar rupturas en el C.S. (Masumbuko et al. 1993). Es probable que los animales de este experimento hayan sufrido una disminución en los niveles plasmáticos de testosterona, que estarían provocando alteraciones en la síntesis de proteínas, dando origen a las discontinuidades en el CS.

VII. 4. Bebidas alcohólicas y población celular en testículo.

El consumo excesivo de bebidas alcohólicas puede alterar la fertilidad del individuo, se ha observado que los pacientes alcohólicos pueden presentar cambios en la población de células de testículo que van desde una disminución en la cantidad de espermatozoides hasta la pérdida casi total del epitelio germinal (Valimaki et al. 1984; Hojnacki et al. 1989; Agarwal y Goedde 1990). Al comparar estadísticamente el testigo negativo con los grupos tratados con bebidas alcohólicas, no se encontraron diferencias significativas, en relación al número de espermatoцитos en paquíteno y la población general de células de testículo. Cuando se habla de los cambios observados en la población celular de testículo, asociados con el consumo de bebidas alcohólicas, se hace referencia al efecto provocado por la ingesta crónica de etanol. En éste caso, las bebidas administradas no provocaron cambios, tal vez debido a que las dosis no fueron tan altas y a que el tratamiento no fue crónico. Es importante considerar, que éste estudio se realizó en preparaciones de células dispersas y en el futuro habría que complementar éste trabajo, realizando cortes histológicos de testículos de animales tratados de manera análoga, con el objeto de establecer si existen o no cambios en las distintas asociaciones que se dan a lo largo de los túbulos seminíferos

Podemos finalizar diciendo que el etanol, el tequila y el brandy pueden alterar la estructura del Complejo Sinaptonémico. Sin embargo, aún queda por establecer si éste está asociado a daño en el material genético o únicamente es resultado de cambios metabólicos. A lo anterior hay que agregar la posibilidad de que el daño en el CS, afecte la fertilidad del individuo y/o que pueda pasar a su progenie, ya que existen antecedentes que muestran que el daño provocado en el CS por radiaciones, puede modificar la capacidad reproductiva de algunos organismos y que puede pasar a la descendencia (Kaliniskaya et al. 1986 a, 1986b). Como una forma de contribuir a la

explicacion de éstas interrogantes sera necesario realizar en el futuro estudios tendientes a aislar, purificar y caracterizar los distintos componentes de las bebidas estudiadas, en la perspectiva de conocer sus efectos sobre el CS y el material genético de las células meióticas, el metabolismo y fertilidad del individuo, así como los posibles efectos en su descendencia. Todo lo anterior, contribuirá al conocimiento de los mecanismos que explican el daño en el CS y a establecer las medidas preventivas que lo eviten.

IX. CONCLUSIONES.

IX. CONCLUSIONES.

De los resultados encontrados en este diseño experimental podemos concluir que:

1.- La ciclofosfamida, el etanol, el tequila y el brandy pueden provocar rupturas en el Complejo Sinaptonémico y Elementos Laterales.

2.- Que la magnitud del daño depende del tipo y cantidad de la bebida alcohólica administrada.

3.- Al comparar los resultados encontrados en el testigo negativo con los de los tratados, se encontró que las dosis: 3 de etanol (3 g/kg), 2 y 3 de tequila (2 y 3 g/kg) y 3 de brandy (3 g/kg) provocan alteraciones en el complejo sinaptonémico.

4.- No hay cambios en el número de células en paquíteno con respecto a una muestra de la población celular total, en ninguno de los lotes experimentales.

Los resultados de este trabajo son el punto de partida de otros experimentos que nos permitirán conocer, en qué medida las bebidas alcohólicas provocan daños en el C.S y de qué manera afectan la fertilidad de los organismos y a su descendencia.

X. BIBLIOGRAFÍA.

FALTA PAGINA

No. 46

X. BIBLIOGRAFIA

Adler I. D. (1982) Mouse spermatogonia and spermatocyte sensitivity to chemical mutagens. *Cytogenet. Cell Genet.* 33: 95-100

Agarwal D. P. y Goedde H. W. (1990) Alcohol metabolism. En: *Biochemistry and genetic variations in alcohol metabolism, alcohol intolerance and alcoholism.* Springer Verlag. U.S.A. pp 52-65

Allen J. W. (1988) Synaptonemal complex damage in relation to meiotic chromosome aberrations after exposure of male mice to cyclophosphamide. *Mutation Res.* 203: 317-330

Allen J. W. Liang J. C. Carrano A. V. y Preston R. J. (1986) Review of literature on chemical-induced aneuploidy in mammalian mouse germ cells. *Mutation Res.* 167: 123-137

Allen J. W. y Latt S. A. (1976a) In vivo BrdU - 33258 Hoechst analysis of DNA replication: Kinetics and sister chromatid exchange formation in mouse somatic and meiotic cells. *Chromosoma* 58: 325-340

Allen J. W. y Latt S. A. (1976b) Analysis of sister chromatid exchange formation in vivo in mouse spermatogonia as a new test system for environmental mutagens. *Nature (London)* 260: 449-451.

Allen J. W., De Weese G. K., Gibson J. B. Poorman P. A. y Moses M. J. (1987) Synaptonemal complex damage as a measure of chemical mutagen effects on mammalian germ cell. *Mutation Res.* 190: 19-24

Allen J. W., Gibson J. B., Poorman P. A., Backer L. C. y Moses M. J. (1988) Synaptonemal complex damage induced by clastogenic and antimetabolic chemicals: implications for non-disjunction and aneuploidy. *Mutation Res.* 201: 313-324

Allen J. W., Porman P. A., Backer L. C., Westbrook B. C. y Moses J. M. (1990) Synaptonemal complex analysis of mutagen effects on meiotic chromosome structure and behavior. En: *Banbury 34: Biology of Mammalian Germ Cell Mutagenesis.* Cold. Spring Harbor Laboratory Press. U.S.A. pp 155-169

Amon R., Degli Esposti S. y Zein M. A. (1995) Molecular biological aspects of alcohol-induced liver disease. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 19: 928-932

Ashley T., Plug A. W., Xu J., Solari A. J. Reddy G., Golub E. T. y Ward D. C. (1995) Dynamic changes in Rad51 distribution on chromatin during meiosis in male and female vertebrates. *Chromosome* 104: 19-28

Backer L.C., Gibson J B., Moses M.J. y Allen J.W. (1987) Cyclophosphamide induced damage to synaptonemal complex and metaphase chromosomes in mouse meiotic cells, *Environ.Mutagen.*, Suppl. 8: 8

Backer L.C., Gibson J B., Moses M.J. y Allen J.W. (1988) Synaptonemal complex damage in relation to meiotic chromosome aberrations after exposure of male mice to cyclophosphamide, *Mutation Res.* 203: 317-330

Bardr F. y Hussain A. (1977) Action of ethanol and its metabolite acetaldehyde in human linphocytes. In vivo and in vitro study. *Genetics* 86: 52-53

Barilyak I. R. y Kosachuck S. Y. (1983) Embryotoxic and mutagenic activity of ethanol after intra awmniotic injection. *Tsitol Genet.* 17: 57-60

Barlow A. L., y Hulten A. M. (1997) Secuential immunocyto genetics, molecular cytogenetics and trasmission electron microscopy of microspread meiosis I oocytes from human fetal carrier of an unbalanced translocation. *Chromosome* 106: 293-303

Barra S., Franceschi S., Negri E. Talamini R. y La Vecchia C. (1990) Type of alcoholic beverage and cancer of the oral cavity pharynx and esophagus in an italian area with high wine consumption *Int. J. Cancer* 46: 1017-1020

Bempong M. A. y Trower E. C. (1975) Sensitivity of rat testes to inhibitors of nucelic acid sythesis III. The inheritance of mitomycin C induced structural rearrangements of chromosomes. *J. Hered.* 66: 285-289

Bernard J. (1990) Events and mechanism of meiosis. En: *Meiosis* Ed. J. Bernard Cambidge University Press, Gran Bretaña, pp 113-191

Bhagirath T. H. y Kundu Ch. (1986) Sequential analysis of synaptonemal complexes in the repopulating spermatocytes of *Rattus norvegicus* after restricting the germ cell population spermatogonia by gossypol treatment. *J. Cell Biol.* 26: 226-232

Bloom S. E. y Goodpasture C. (1976) An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer region in human chromosomes. *Hum. Genet.* 34: 199-206

Borodin M. P., Enouye M., Oda S., Ikushima T., Takogishi Y. y Yamamore H. (1994) Radio adaptative response in primary mouse spermatocytes revealed by analysis of synaptonemal complexes. *Mut. Res.* 310: 151-156

Braun T. Grzegchik K. H., Bober E. Argawal D. P. Singh S. y Goedde H. W. (1986) The structural gene for the mitochondrial aldehyde dehydrogenase maps to human chromosome 12. *Hum. Genet.* 73: 365-367

Burgoyne P. S. y Baker T. G. (1984) Meiotic pairing and gametogenic failure. Symp. Soc. Exp. Biol. 38: 349-358

Butler M., Sanger W. y Veomett G. (1981) Increased frequency of sister chromatid exchanges in alcoholics. Mutation Res. 85: 71-76

Cadotte M., Allard S. y Verdy M. (1973) Lack of effect of ethanol in vitro on human chromosomes. Ann Genet 16: 55-56

Carpenter A. T.C. (1979) Synaptonemal complex and recombination nodules in wild type (*Drosophila melanogaster* females. Genetics 92: 511-541

Carpenter A. T. C. (1994) The recombination module story-seeing what you are looking at. Bio Essays 16: 69-73

Cawood A. H. y Breckon G. (1983) Synaptonemal complex as indicators of induced structural change in chromosomes after irradiation of spermatogonia. Mutation Res. 123: 149-154

Cawood A. H. y Breckon G. (1985) Induced structural changes in chromosomes of the syrian Hamster after X - irradiation of spermatogonia: comparison of dose - response curves derived from synaptonemal complex and from air - dried preparations of metaphase I. Mutation Res. 144: 19-21

Cicero T. J. (1981) Neuroendocrinological effects of alcohol. Annu. Rev. Med. 32: 123-130

Cicero T. J. y Bell R. D. (1980) Effects of ethanol and acetaldehyde on the biosynthesis of testorane in the rodent testes. Biochem. Biophys Res. Commun 94: 814-823

Cicero, T. J., Bell, R. D., Meyer E. R. y Badger T. M. (1980) Ethanol and acetaldehyde directly inhibit testicular steroidogenesis. J. Pharmacol. Exp. Ther. 213: 228-235

Cobb J., Reddy R. K, Park, R. C. y Handel M. A. (1997) Analysis of expression and function of topoisomerase I y II during meiosis in male mice. Mol Reprod. Dev. 46: 489-489

Comings D. E. y Okada T. (1970) Whole mount electron microscopy of meiotic chromosomes and the synaptonemal complex. Chromosoma (Berl) 30: 269-286

Cook P. R. (1997) The transcriptional basis of chromosome pairing. J. Cell Sci. 110: 1033-1040

Cusidó L., Pujol R., Egozcue J. y Garcia M. (1995) Cyclophosphamide induced synaptonemal complex damage during meiotic prophase of female *Ratus norvegicus*. *Mut. Res.* 329: 131-141

Chun-Le Y., Swaminathan B., Butler L. y Pratt L. (1986) Isolation and identification of rutin as the major mutagen of red wine. *Mutation Res.* 170: 103-113

De Martino C., Capanna E., Nicotra M. R. y Natali P. G. (1980) Inmunochemical localization of contractile proteins in mammalian meiotic chromosomes. *Cell Tissue. Res.* 213: 159-178

De Pertigo A., Gabriel - Robes O. y Rampler Y. (1989) Correlation between chromosomal break point positions and synaptic behavior in human males heterozygous for a pericentric inversion. *Hum. Genet.* 83: 274-276

De Raat W., Davis P. y Bakker C. (1983) Induction of sister chromatid exchanges by alcohol and alcoholic beverages after activation by rat liver homogenate. *Mutation Res.* 124: 85-90

De Torok D. (1972) Chromosomal irregularities in alcoholics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 192: 90-100

Del Mazo J. y Gil-Alberdi L. (1986) Multistranded organization of the lateral elements of the synaptonemal complex in the rat and mouse. *Cytogenet. Cell Genet* 41: 219-224

Dellarco V. (1988) A mutagenicity assessment of acetaldehyde. *Mutation Res.* 195: 1- 20

Deuster G., Hatfield G. W. y Smith M. (1985) Molecular genetic analysis of human alcohol dehydrogenase. *Alcohol* 2: 53-56

Dietrich A. J. J. y Vink A. C. G. (1992) The sequential appearance of components of the synaptonemal complex during meiosis of the female rat. *Genome* 35: 492-497

Dietrich A. J. y Mulder R. J. (1981) A light microscopic study of the development and behavior of the synaptonemal complex in spermatocytes of the mouse. *Chromosoma (Berl)* 83: 409-418

Dietrich J. J. y DeBoer P. (1983) A sequential analysis of the development of the synaptonemal complex in spermatocytes of the mouse by electron microscopy using nitroxiurea and agar filtration. *Genetics* 61: 119-129

Dietrich A. J. J., J. Van Marle, Heyting C. y Vink A. C. G. (1992) Ultrastructural Evidence for a Triple Structure of the Lateral Element of Synaptonemal Complex. *J. Structural Biology*. 109: 196-200

Ditlow C. C., Holmquist B., Morelock M. M. y Vallee B. L. (1984) Physical and enzymatic properties of class II alcohol dehydrogenase isozymes of human liver: PI - ADH. *Biochemistry* 23: 6363-6368

Dobson M. J., Pearlman R. E., Karais Kakis A., Spyropoulos B. y Moens P. (1994) Synaptonemal complex proteins: occurrence, epitope mapping and chromosome disjunction. *J. Cell* 107: 2749-2760

Dorange J., Remeut F. y Dupuy P. (1984) The mutagenic properties of wine due to flavonol reduction of this mutagenicity by technological processes and by aging. *Mutation Res.* 130: 238-244

Dreosti I. E., Ballard F. J., Belling, G. B., Record I. R. y Manuel S. J. (1981) The effect of ethanol and acetaldehyde on DNA synthesis in growing cells and on fetal development in rat. *Alcohol: Clin. Exp. Res.* 5: 357-362

Dresser M. E. y Moses M. J. (1979) Silver staining of synaptonemal complex in surface spreads for light and electronmicroscopy. *Exp. Cell. Res.* 121: 416-419

Eagon P. K., Porter L. E., y Van Thiel D. H. (1983) The role of strogens and androgens in the feminization of the chronic alcoholic male. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* 7: 14-20

Egozcue J., Templado C., Vidal J., Morer - Fargas F. y Marina S. (1983) Meiotic studies in a series of 1100 infertile and sterile males. *Hum. Genet.* 65: 185-188

Eriksson C. J. P. (1987) Genetic aspects of the relation between alcohol metabolism and consumption in humans. *Mutation Res.* 186: 241-247

Esponda P. (1981) El complejo sinaptonémico y la estructura del cromosoma meiótico. *Bioteria - Genetica* II: 83-123

Esponda P. y Jimenez-Martin C. (1973) The attachment of the synaptonemal complex to the nuclear envelope. An ultrastructural and cytochemical analysis. *Chromosoma* 30: 405-417

Esponda P. y Jimenez-Martin G. (1975) Nucleolar organizer ultrastructure in *Allium cepa*. *Chromosoma (Berl)* 52: 73-87

Evans E. P. Breckon G. y Ford C. E. (1964) An air drying method for meiotic preparations from mammalian testes. *Cytogenetics* 3: 289-294

Fainman L. y Lieber C. (1988) Toxicity of ethanol and other components of alcoholic beverages. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* 12: 2-6

Fawcett D. W., Leak L. V. y Heidger P. M. (1970) Electron microscopic observations on the structural components of the blood - testis barrier. *J. Reprod. Fertil* (sup 10): 105-115

Fawcett D. W., Heidger, P. M. y Leak L. V. (1969) Lymphic vascular system of the interstitial system of the testis as revealed by electron microscopy. *J. Reprod. Fertil* 19: 109-120

Ferguson - Smith M. A. y Page B. M. (1983) Pachytene Analysis in Human reciprocal (10:11) Translocation. *J. Medical Genetics* 10: 282-287

Fletcher J. M. (1979) Light microscope analysis of meiotic prophase chromosomes by silver staining. *Chromosoma* (Berl) 72: 241-248

Fritz I. B. (1990) Cell-cell interactions in the testis: A guide for the perplexed en Banbury Report 34: *Biology of Mammalian Germ Cell Mutagenesis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press pp 19-34

Gabriel - Robez O., Jaafar H., Ratomponirina C., Boscher J., Bonneau J., Popescu C. P. y Rumpler Y. (1988a) Heterosynapsis in a heterozygous fertile board carrier of a 3;7 translocation. *Chromosoma* (Berl) 97: 26-32

Gabriel - Robez O., Ratomponirina C., Croquette M. Couturier J. y Rumpler Y. (1988b). Synaptonemal complex in a subfertile man with a pericentric inversion in chromosome 21: heterosynapsis without previous homosynapsis. *Cytogenet Cell. Genet.* 48: 84-87

Gabriel - Robez O., Rotomponirina C., Rumpler Y., Le Marec B., Luciani J. M. y Guichaoua M. R. (1986) Synapsis and synaptic adjustment in an infertile human male heterozygous for a pericentric inversion in chromosome I. *Hum. Genet.* 72: 148-152

Gaines K. C., Salhany J. M., Tuma D. J. y Sorrell M. F. (1977) Reaction of acetaldehyde with human erythrocyte membrane proteins. *FEBS. Lett.* 25: 115-199

Garriott J. C. (1988) Pharmacology of ethyl alcohol. En: *Medico-legal aspects of alcohol determination in biological specimens*. Ed J.C. Garriott PSG. Publishing Company Inc. U.S.A. pp 36-54

Gibson J. B. y Moses M. J. (1986) Effects of vinblastine sulfate on the synaptonemal complex in *Mus musculus*. *Genetics.* 113: 566

Glamann J. (1986) Crossing over in the male mouse analysed by recombination nodules and bars. *Carlsber Res. Commun* 51: 143-162

Golstein P. (1986) Nuclear aberrations and loss of synaptonemal complex in response to diethylstilbestrol (DES) in *Caenorhabditis elegans* hermaphrodites. *Mutation Res.* 174: 99-10

Green L. W. y Hollander C. S. (1980) Sex and alcohol: the effects of alcohol on the hypothalamic - pituitary gonadal axis. *Alcoholism: clin Exp Res* 4: 1-9

Greenbaum I. F., Hale W. y Fuxa K. (1986) The mechanism of autosomal synapsis and the substaging of zigonema and pachynema from deer mouse spermatocytes. *Chromosoma* 93: 203-212

Greizerstein H. B. (1981) Congener contents of alcoholic beverages. *J. Stud. Alcohol* 42: 1030-1037

Guitart M., Coll M., Ponsai M. y Egoscue J. (1985) Sequential study of synaptonemal complex in mouse spermatocytes by light and electron microscopy. *Genetic* 67: 21-30

Harada S., Misawa S., Argawal D. P. y Goedde H. W. (1985) Aldehyde dehydrogenase polymorphism and alcohol metabolism in alcoholics. *Alcohol* 2: 391-392

Hedner K., Wadotein J. y Mitelman F. (1984) Increased sister chromatid exchange frequency in chronic alcohol users. *Hereditas* 101: 265-266

Heyting C. (1996) Synaptonemal complexes: structure and function . *Curr Op. Cell Biol* 8: 389- 396

Heyting C., Dietrich J. J. y Vink C. G. (1985) Structure and composition of synaptonemal complex, isolated from rat spermatocytes. *Eur. J. Cell. Biol.* 36: 307-314

Heyting C., Moens P. B., Dietrich J. J. y Vink C. G. (1987) Identification of two major components of the lateral elements of synaptonemal complex of the rat. *Eur. J. Cell Biol.* 43: 148-154

Heyting C., Dettmers. R., Dietrich J. y Vink C. G. (1988) Two major components of synaptonemal complex are specific for meiotic prophase nuclei. *Chromosoma (Berl)* 96: 325-332

Heyting C., Dietrich J. J., Moens P. B., Dettmers R. J. Offenbergh H. H. y Vink C. G. (1989) Synaptonemal complex proteins. *Genome* 31: 81-87

Hoefl H. y Obe G. (1983) SCE inducing congeners in alcoholic beverages. *Mutation Res.* 121: 247-251

Hojnacki J. L., Cluette - Brown J. E., Mulligan J. J. y Rencricca N. J. (1989) Alcohol sex hormones and plasma lipoprotein alterations. En: *Diagnosis of alcohol abuse*, Ed. R. R. Watson CRC. Press. USA. pp 28-46

Hotta Y., Tabata S. y Stern H. (1984) Replication and nicking of zygotene DNA sequences. Control by a meiosis specific protein. *Chromosoma* 90: 243-253

Hotta Y., Tabata S., Stubbs L. y Stern H. (1985) Meiosis - specific transcripts of a DNA component replicated during chromosome pairing: Homology across the phylogenetic spectrum. *Cell.* 40: 785-792

Howell W. M. y Black D. A. (1980) Controlled silver - staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1 - step method. *Experientia* 36: 1014-1015

Hsu L. C., Chang W. C., Lin S. W. y Yoshida A. (1995) Cloning and characterization of genes encoding four additional human aldehyde dehydrogenase isozymes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 372: 159-163

Hsu L. C., Tanik., Fujiyoshi T., Kurachik y Yoshida A. (1985) Cloning of cDNAs for human aldehyde dehydrogenases 1 y 2 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 3771-3775

Hurley D., Aguilar A., Garybay J. y Landeros J. (1981). *Técnicas de diseño experimental*. Ed por el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados. México D.F.

Jansson T. (1982) The frequency of sister chromatid exchanges in human lymphocytes treated with ethanol and acetaldehyde. *Hereditas* 97: 301-303

Johannisson R y Ocker H. (1997) Cyclophosphamide-induced aberrations of chromosome pairing in pachytene oocytes. *Mut. Res.* 374: 185-192

Johannisson R., Mormel R. y Branderburg B. (1994) Synaptonemal complex damage in fetal mouse oocytes induced by ionizing irradiation. *Mut. Res.* 311: 319-328

Julia P., Boleda M. D., Farres J. y Perez X. (1987) Mammalian alcohol dehydrogenase: characteristics of class III isozymes. *Alcohol (Suppl)* 11: 169 - 174

Kalikinskaya E. I., Bodganov Y. F., Kolomiets O. L. y Shevechenko V. A. (1986a) Analysis of chromosome rearrangements on the basis of synaptonemal complexes in the offspring of mice exposed to X rays. *Genetica* 23: 1119-1126

Kalikinskaya e. I., Kolomiets O. L., Shevchenko V. A. y Bogdanov Y. F. (1986b) Chromosome aberrations in F1 from irradiated male mice studied by their synaptonemal complexes. *Mutation Res.* 174: 59-65

Kallama S. y Hemminki K. (1983) Urinary excretion products after the administration of 14c - acetaldehyde to rats. *J. Appl. Toxicol.* 3: 313-316

Keegan K. S., Holtzman D. A., Plug A. W., Christerson E. R., Brainerd E. E., Flaggs G., Bentley N. J. y Taylor M. (1996) The Atr and Atm protein kinases associate with different sites along meiotically pairing chromosomes. *Genes Dev* 10: 2423-2437

Koop D. R. y Coon M. J. (1985) Role of P - 450 oxigenase (APO) in microsomal ethanol oxidation. *Alcohol* 2: 23-26

Korte A., Obe G., Ingwersen I. y Ruckert G. (1981) Influence of chronic ethanol uptake and acute acetaldehyde treatment on the chromosomes of bone marrow cell and peripheral lymphocytes of Chinese hamster. *Mutation Res.* 88: 389-395

Korte A., slacik E. y Obe G. (1979) The influence of ethanol treatment on cytogenetic effects in bone marrow of Chinese hamster by cyclophosphamide, aflatoxin - B and patulin. *toxicol.* 12: 53-61

Lam C. W., Casanova M. y Heck H. (1986) Decreased extractability of DNA from proteins in the rat nasal mucosa after acetaldehyde exposure. *Fund. Appl. Toxicol* 6: 541-550

Lambert B., Chen Y., He S. M. y Sten M. (1985) DNA cross-links in human leucocytes treated with vinyl acetate and acetaldehyde in vitro. *Mutation Res.* 146: 301-303

Lammers J. H. M., Van Aalderen M., Peters A. H. F. M., Van Pelt A. A. M., Laemers I. C., Rooij D. G., de Boei P., Offenber H. H., Dietrich A. J. J. y Heyting C. (1995) A change in the phosphorylation pattern of the 3000 - 33000 Mi synaptonemal complex proteins of the rat between early and mid pachytene. *Chromosoma* 104: 154-163

Lehtonen M. (1983) Gas-liquid chromatographic determination of volatile phenols in natured destiled alcoholic beverages. *J. Assoc. Off Anal Chem* 66: 62-70

Lieber C. S. (1981) Metabolism and metabolic effects of ethanol. *Sem. Liver Dis.* 1: 189-202

Lieber C. S. y De Carli L. (1972) The role of hepatic microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) for ethanol metabolism in vivo. *J. Pharmacol. Exp. ther.* 181: 279-287

Lieber C., S., Baraone E., Leo A. y Garro A. (1987) Metabolism and metabolic effects of ethanol, including interaction with drugs, carcinogens and nutrition. *Mutation Res.* 186: 201-233

Linder C. C., Heckert L. L., Roberts K. P. y Kim K. H. (1991) Expression of receptors during the cycle of the seminiferous epithelium. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 637: 313-321

Lorke D. (1983) A new approach to practical acute toxicity testing. *Arch. Toxicol.* 54: 275-287

Luciani J. M., Guichaova M. R., Delafontaine D., North M. O., Gabriel - Robez O. y Rumpler Y. (1987) Pachytene analysis in a 17; 21 reciprocal translocation carrier: role of the acrocentric chromosomes in male sterility. *Hum. Genet.* 77: 246-250

Mac Kerell A. D., Blatter E. y Pietruszko R. (1986) Human aldehyde dehydrogenase: kinetic identification of the isozyme for which biogenic aldehydes and acetaldehyde compete. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 10: 266-270

Madrigal B. E., Calderon R. y Diaz Barriga S. (1991) Sister chromatid exchange frequencies induced in vivo and in vitro by the residues of brandy. *J. Toxicol. Environ Health* 32: 479-486

Madrigal E., Piña A., Vidal P., Rubio D. (1990a) Presencia de alteraciones genéticas en pacientes con alcoholismo. *Rev. Mex. Pat. Clin.* 37: 33-35

Madrigal B. E., Rosas A., Ramos A., Rosas E. y Diaz Barriga S. (1990b) Mouse bone marrow cytogenetic damage produced by residues of tequila. *Mutation Res.* 241: 136-137

Masumbuko M. B., Freund M. M. y De Meyer R. (1992) Synaptonemal complex alterations in X - irradiated and in oestrogen treated mice: a comparative study. *Mutation Res.* 282: 3-12

Masumbuko M. B. De Meyer R y Freund M.M. (1993) Synaptonemal complex studies in male mice treated with cyproterone acetate or with testosterone. *Mut. Res.* 303: 45-53

Mc Analley B. H. (1988) Chemistry of alcoholic beverages. En: *Medicolegal aspects of alcohol determination in biological specimens.* Ed. J. C. Garriott PSG Publishing Company Inc. USA. pp 1-35

Mendelson J. H., Ellingboe J. y Mello N. K. (1983) Ethanol induced alterations in pituitary gonadal hormones in human males. *Adv. Exp. Med. Biol.* 126: 485-492

Meuwissen R. L. J., Meerts I., Hoovers J. M. N., Leschut N. J. y Heyting C. (1997) Human synaptonemal complex protein 1 (SCE1): isolation and characterization of the cDNA and chromosomal localization of the gene. *Genomics* 39: 377-384

Meuwissen R. L. J., Offenbergh H. H., Dietrich A. J. J., Riesewijk A., Van Lersel y Heyting C. (1992) A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes, *EMBG* 11: 5091-5100

Mitelman F. y Wadstein J. (1978) chromosome aberration in chronic alcoholics. *Lancet*. 1: 216

Mittwoch U. y Mahadevaiah S. K. (1992) Unpaired chromosomes at meiosis: cause or effect of gametogenic insufficiency? *Cytogenet. Cell. Genet.* 59: 274-279

Moens P. B. (1994) Molecular perspectives of chromosome pairing at meiosis. *Bio Essays* 16: 101-105

Moens P. y Earnshaw C. (1989) Anti-topoisomerase II recognizes meiotic chromosome cores. *Chromosoma* 98: 317-322

Moens P. y Pearlman R. (1990) Telomere and centromere DNA are associated with the cores of meiotic prophase chromosomes. *Chromosoma* 100: 8-14

Moens P., Heyting C., Dietrich J. J. Van Raamsdank W. y Chen Q. (1987) Synaptonemal complex antigen location and conservation *J. Cell. Biol.* 105: 93-103

Morales Ramírez P. (1980) Analysis in vivo of sister-chromatid exchange in mouse bone-marrow and salivary-gland cells. *Mutatin Res.* 74: 61-79

Moses M. J. (1968) Synaptonemal complex. *Ann. Rev. Genet.* 2: 363-412

Moses M. J. (1969) Structure and function of the synaptonemal complex. *Genetics* 61 Suppl. 1: 41-51

Moses M. J. (1979) The synaptonemal complex as an indicator of chromosomal damage. *Genetics* 92: 573-582

Moses M. J., Russell L. B. y Cacheiro N. L. (1977) Mouse chromosome traslocation: visualization and analysis by electron microscopy of the synaptonemal complex. *Science* 196: 892-894

Moses J. M., Poorman P. A., Tepperberg J. H., Gibson J. B. y Backer L. C. (1990) The synaptonemal complex as an indicator of induced chromosome damage. En: *Biology of Mammalian Germ Cell Mutagenesis*, Cold Spring Harbor Laboratory Press pp 113-154

- Nagao M., Takahashi Y., Wabayashik y Segimura L. (1981) Mutagenicity of alcoholic beverages. *Mutation Res.* 88: 147-154
- Nakayasu M., Sakamoto H., Terade M., Nagao M. y Segimura T. (1986) Mutagenicity of quercetine in Chinese hamster lung cells in culture. *Mutation Res.* 174: 79-83
- Navarro J., Vidal F., Guitart M. y Egoscue J. (1981) A method for the sequential study of synaptonemal complex by light and electron microscopy. *Hum. Genet.* 59: 419-421
- Obe G. y Anderson D. (1987) Genetic effects of ethanol. *Mutation Res.* 186: 177-200
- Obe G. y Ristow H. (1977) Acetaldehyde but not ethanol induces sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells. *Mutation Res.* 56: 211-213
- Obe G., Jonas R. y Schimidt S. (1986) Metabolism of ethanol in vitro produces a compound which induces sister chromatid exchanges in human peripheral lymphocytes in vitro: acetaldehyde no ethanol is mutagenic. *Mutation Res.* 174: 47-51
- Obe G., Natarajan T., Meyers M. y Hertog D. (1979) Induction of chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of human blood in vitro and SCEs in bone marrow cells of mice in vivo by ethanol and its metabolite acetaldehyde. *Mutation Res.* 68: 291-294
- Parvinen M. (1982) Regulation of the seminiferous epithelium. *Endocr. Res.* 3: 404-410
- Parvinen M., Kimmo K. y Toppari J. (1986) Cell interactions during the seminiferous epithelial cycle. *Int. Rev. Cytol.* 104: 115-151
- Pathak S. y Elder F. B. (1980) Silver-stained acsory structures on human sex chromosomes. *Hum. Genet.* 54: 171-175
- Pathak S. y Hsu T. C. (1979) Silver stained structures in mammalian meiotic prophase. *Chromosoma (Berl)* 70: 195-203
- Pathak S., Van Turnen P. y Merry D. E. (1982) Heterochromatin, synaptonemal complex and NOR activity in the somatic and germ cells of a male domestic dog *Canis familiaris* (Mammalia, Canidae) *Cytogenet. Cell Genet.* 34: 112-118
- Piña C. A. y Madrigal B. E. (1993) SCE frequencies induced by ethanol, tequila and brandy in mouse bone marrow cells in vivo. *Toxicol. Lett.* 66: 1-5

Piña C. A., Quezada R., Madrigal B.E. (1994) Efect of ethanol in the synaptonemal complex of mouse spermatocytes. *Med. Sci. Res.* 22: 185-186

Piña C. A., Quezada R., Madrigal B.E. (1997) synaptonemal complex damage in mouse spermatocytes exposed to tequila and brandy. *Cancer Det. Prev.* 21(2) 196-200

Pollack E., Momuya Y., Heilbrun K., Stemmermann N. y Green B. (1984) Prospective study of alcohol consumption and cancer. *N. Engl. J. Med.* 310: 617-621

Poorman P. A., Moses M. J., Davisson M. T. y Roderick T. H. (1981) Synaptonemal complex analysis of mouse chromosomal rearrangements. *Chromosome* 83: 419-429

Reiner J. y Ocker H. (1997) Cyclophosphamide-induced aberrations of chromosome pairing in pachytene oocytes. *Mut. Res.* 374: 185-192

Ristow H. y Obe G. (1978) Acetaldehyde induces crosslinks in DNA and causes sister chromatid exchanges in human cells. *Mutation Res.* 58: 115-119

Rivero - Rosas H., Julián - Sánchez E. y Piña E. (1997) Enzimology of Ethanol and acetaldehyde metabolism in mammals. *Arch. Med. Res.* 28: 453-471

Roeder G. S. (1995) Sex and the single cell: meiosis in yeast. *Proc. Natl Acad. Sci USA.* 92: 10450-10456

Rosenberg L., Palmer J., Miller D., Clarke A. y Shapiro S. (1990) A case control study of alcoholic beverage consumption and breast cancer. *Am. J. Epidemiol.* 131: 6-14

Roth T. F. e Ito M. (1967) DNA dependent formation of the synaptonemal complex at meiotic prophase. *J. Cell. Biol.* 35: 247-254

Roth T. F y Parchman L. G. (1971) Alteration of meiotic chromosomal pairing and synaptonemal complex by cycloheximide. *Chromosoma* 35: 9-27

Rueff J., Laires H., Gomez M., Borba H. y Halpern M. (1984) DNA damaging activity of flavonoid containing beverages. *Mutation Res.* 130: 243-246

Russell L. D. (1990) Barriers to entry of substances into seminiferous tubules: Compatibility of morphological and physiological evidence en Banbury. Report 34: *Biology of Mammalian Germ Cell Mutagenesis Cold Spring Harbor Laboratory Press* 3-17

Russell L. D. y Peterson, R. N. (1985) Sertoli cell junction: Morphological and functional correlates. *Int. Rev. Cytol.* 94: 177-182

- Sagawa M., Nadamitsu S., Kondo, K. y Yoshizaki H. (1979) Chromosomal aberrations of DNA lung cell of Chinese hamster after exposure to vinblastine in vitro. *Mutation Res.* 66: 99-102
- Satya-Prakash K. L., Liang J. C., Hsu T. C. y Johnston D. A. (1986) Chromosome aberrations in mouse bone marrow cells following treatment in vivo with vinblastine and colcemid. *Environ. Mutagen.* 8: 273-282
- Scully R., Chen J., Plug A., Xiao Y., Weaver D., Feunteun J., Ashley T. y Livingston D. M. (1997) Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell.* 88: 265-275
- Schmekel K., Meuwissen R. L. J., Dietrich A. J. J., Vink A. C. G., Van Marle J, Van Veen H. y Heyting C. (1996) Organization of SCEI protein molecules within synaptonemal complex of rat. *Exp. Cell Res.* 226: 20-30
- Schreier P. (1979) Flavor composition of wines: A review. *CRC. Crit. Rev. Food Sci. Nutri.* 59-111
- Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (1983a) Norma Oficial Mexicana (NOM-V-18-1983) Bebidas alcohólicas destiladas: Tequila. Dirección General de Normas.
- Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (1983b) Norma Oficial Mexicana (NOM-V-18-1983) Bebidas alcohólicas destiladas: Brandy. Dirección General de Normas.
- Seshadri R., Baker E. y Gutherland G. (1982) Sister chromatid exchange (SCE) analysis in mothers exposed to DNA damaging agents and their newborn infants. *Mutation Res.* 97: 139-146
- Sheridan W. y Barnett R. J. (1969) Cytochemical studies on chromosomes ultrastructure. *J. Ultraestruct. Res.* 27: 216-229
- Sherman J. D., Herickhoff L. A. y Stack M. S. (1992) Silver staining two types of meiotic nodules. *Genome* 35: 907-915
- Skinner M. K. y Fritz I. B. (1985) Testicular peritubular cells secrete a protein under androgen control that modulates Sertoli cell function, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 513: 158-170
- Smith A. y Benavente R. (1992) Identification of a structural protein component of rat Synaptonemal complex. *Ex. Cell Res.* 198: 291-297
- Smith M., Hiroshige S., Duester G., Saxon P., Carlock L. y Wasmuth J. (1985) Confirmation of the assignment of the gene coding for mitochondrial aldehyde

dehydrogenase (ALDH) to human chromosome 12. *Cytogenet Cell Genet.* 40: 748-749

Smith M., Hopkinson D. A. y Harris H. (1971) Developmental changes and polymorphisms in human alcohol dehydrogenase. *Ann. Num. Genet.* 34: 251-271

Smith M., Hopkinson D. A. y Harris H. (1973) Studies on the subunit structure and molecular size of the human alcohol dehydrogenase isozymes determined by the different loci ADH1, ADH2, ADH3, *Ann. Hum. Genet.* 36: 401-414

Solari A. J. (1972) Ultrastructure and composition of the synaptonemal complex in spread and negatively stained spermatocytes of the golden hamster and the albino rat. *Chromosoma* 39: 237-245

Solari A. J. (1980) Synaptonemal complex and associated structures in microspread human spermatocytes. *Chromosoma (Berl)* 81: 315-337

Stoltz D., Savric B., Krewski D., Klassen R., Bendall R. y Junkins B. (1982) Mutagenicity screening of foods. I results with beverages. *Environ. Mutagen.* 4: 477-492

Suresh C. J. y Chaganti S. K. (1980) Silver-stained synaptonemal complex of human pachytene bivalens studied by light microscopy. *Hum. Genet.* 54: 405-408

Syropoulos B. y Moens P. B. (1984) The synaptonemal complex: does it have contractile proteins? *Can. J. Genet. Cytol.* 26: 776-781

Takase S., Urashime S., Yasuhara M. y Takada A. (1989) Studies on aldehyde dehydrogenase type V a isozymes in liver disease. *Alcohol Alcohol* 24: 547-554

Tapia F., Madrigal-Bujaidar E. y Aguirre S. (1992) The effect of tequila in the synaptonemal complex structure of mouse spermatocytes. *Mutation Res.* 281: 283-286

Tates A., De Vogel N. y Neuteboon I. (1980) Cytogenetic effects in hepatocytes, bone marrow cells and blood lymphocytes of rat exposed to ethanol in the drinking water. *Mutation Res.* 79: 285-288

Templado C., Vidal F., Marina S., Pomerol J. M. y Egozcue J. (1981) A new meiotic mutation: desynapsis of individual bivalent. *Hum. Genet.* 59: 345-348

Tepperberg J. H., Moses M. J. y Nath J. (1997) Colchicine effects on meiosis in the male mouse. *Chromosome* 106: 183-192

Tuma D. J. y Sorrell M. F. (1985) Covalent binding of acetaldehyde to hepatic proteins: role in alcoholic liver injury. *Prog. Clin. Biol. Res.* 183: 3-17

- Valimaki M. y Ylikahri R. (1981) Alcohol and sex hormones. *Scand J. Clin. Lab. Invest.* 41: 99-105
- Valimaki M., Pelkonen R., Harkonen M. y Ylikahri R. (1984) Hormonal changes in non cirrhotic male alcoholics during ethanol withdrawal. *Alcohol Alcoholism* 19: 235-247
- Van Thiel D. H. y Gavaler J. S. (1982) The adverse effects of ethanol upon hypothalamic pituitary-gonadal function in males and females compared and contrasted. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* 6: 179-185
- Van Thiel D. H., Lester R. y Sherins R. J. (1974) Hypogonadism in alcoholic liver disease: evidence for a double defect. *Gastroenterology* 67: 1188-1194
- Vázquez Nin G. H., Flores E., Echeverría O. M., Merbert H. y Wettstein R. (1993) DNA in synaptonemal complex of rat and mouse spermatocytes and chick oocytes chromosoma. 102: 457-463
- Vidal F., Templado C., Navarro J., Brusadin S., Marina S. y Egozcue J. (1982) Meiotic and synaptonemal complex studies in 45 subfertile males. *Hum. Genet.* 60: 301-304
- Von Wettstein D., Rasmussen S. y Holm P. (1984) The synaptonemal complex in genetic segregation. *Annu. Rev. Genet.* 18: 331-413
- Warren A. C., Chakravarti A., Wong C., Slauchaupt S. L., Halloran P. C., Watkins C., Metaxotou C. y Antonarakis S. E. (1987) Evidence for reduced recombination on the nondisjoined chromosomes 21 in Down Syndrome. *Science.* 237: 652-654
- Webster L. y Weiss N. (1989) Alcoholic beverage consumption and the risk of endometrial cancer. *Int. J. Epidemiol.* 18: 786-790
- Weiner B. M. y Kleckner N. (1994) Chromosome pairing via multiple interstitial interactions before and during meiosis in yeast. *Cell* 77: 977-991
- Williams J. P. G. (1970) Selective inhibition of embryonic deoxyribonucleic acid synthesis by vinblastine. *Cell Tissue Kinet.* 3: 155-159
- Winder E. L. y Bross I. J. (1961) A study of etiological factors in cancer of the esophagus. *Cancer* 14: 389-413
- Winder E., Mushinsky H. y Spivak J. (1977) Tobacco and alcohol consumption in relation to the development of multiple primary cancers. *Cancer* 10: 1872-1878
- Yahagi T., Nagao M., Sieno Y., Matsushima T., Sugimura T. y Masashi O. (1977) Mutagenicities of N nitrosamines on Salmonella. *Mutation Res.* 48: 121-130 62

Yuan L., Brundell E y Höög C (1996) Expression of meiosis specific synaptonemal complex protein I in a heterologous system results in the formation of large protein structures. *Exp. Cell Res.* 229: 272-275

Zheng Y. W., Bey M., Liu H. y Felder M. R. (1993) Molecular basis of the alcohol dehydrogenase-negative deer mouse: Evidence for deletion of the germ class I enzyme and identification of a possible new enzyme class. *J Biol Chem.* 268: 24933-24940

XI. TABLAS.

Tabla 1. Contenidos de alcohol etílico de algunas bebidas alcohólicas (Mc Analley, 1988)

Bebida	%
Cerveza	3.2 - 4.0
Cerveza Inglesa, oscura, espesa y amarga	4.5
Cerveza Inglesa, oscura	6.0
Cerveza oscura fuerte	6.0 - 8.0
Licor de malta	3.2 - 7.0
Sake	14.0 - 16.0
Vino de mesa	7.1 - 14.0
Vino gaseoso o espumoso	8.0 - 14.0
Vinos fortificados	14.0 - 24.0
Vinos aromatizados	15.5 - 20.0
Brandies	40.0 - 43.0
Whiskies	40.0 - 75.0
Vodkas	40.0 - 50.0
Ginebra	40.0 - 48.5
Ron	40.0 - 95.0
Tequila	40.0 - 50.5

Tabla 2. Congéneres y contenido de etanol por medida standar de cerveza (mg/1202), vino (mg/402) y destiladas (mg/1.5 02) (Mc Analley 1988)

	Total del contenido de congéneres									
	Acetaldehido	Formiato de etilo	Acetato de etilo	Metanol	N-propanol	Isobutanol	N-butanol	Isopentanol	Etolol	
Cerveza										
Budweiser	142.5	12.2	13.9	6.8	42.3	37.1	0.6	22.9	13.600	
Michelob	48.6	3.5	9.2	2.6	8.0	5.4	1.6	16.0	13.000	
Miller	64.3	4.6	14.1	3.0	5.4	5.0	1.7	21.5	13.000	
Genesee	55.1	4.7	7.6	3.3	8.5	9.6	0.2	15.0	12.500	
Crene Genesee	76.9	7.5	11.3	3.1	12.0	13.1	1.2	26.4	11.900	
Michelob Lite	120.1	4.5	4.0	1.1	8.1	13.9	1.9	84.5	11.300	
Vinos										
Oporto Taylor Tawny	93.7	14.1	7.5	3.4	6.1	6.8	0.4	18.9	16.400	
Oporto Widmer	115.8	29.6	4.1	10.0	7.2	10.8	1.7	15.0	16.400	
Vermouth Martini & Rossi	108.4	26.0	17.8	2.8	7.6	7.2	0.7	13.1	15.900	
Vermouth Cinzano	58.6	7.7	2.9	1.7	6.1	9.6	1.1	15.3	14.000	
Dulce										
Gallo Burgundy	62.9	8.1	4.0	1.2	5.3	6.1	0.2	20.8	10.900	
Almaden rosé	77.3	9.0	18.9	2.0	7.2	12.4	0.5	16.4	10.000	
Destiladas										
Vodka smirnoff (100 proof)	8.5	0.4	0.7	0.2	2.1	3.3	0.1	0.2	16.700	
J & B Scotch	20.3	1.2	0.6	0.8	2.6	5.8	0.1	6.8	14.100	
Brandy Coronet	36.5	1.1	0.9	0.4	3.4	4.4	0.7	16.2	13.900	
Ginebra Gordon Seca	6.8	0.5	0.9	0.3	3.4	0.1	0.1	0.7	13.800	
Vodka Smirnoff (60 proof)	15.7	0.4	1.9	0.2	4.4	7.0	0.1	0.2	13.600	
Ron Bacardi Light	16.8	0.6	0.8	0.3	3.4	2.5	0.1	3.6	13.500	
Vodka Chex (60 proof)	9.2	0.3	0.7	0.3	3.3	0.1	0.1	3.8	13.400	
Whiskey Hiram Walker	11.5	1.9	2.6	0.4	1.2	1.5	0.1	2.4	13.400	
Scotch de Dewar	48.6	1.1	1.5	0.4	5.2	12.6	0.2	25.2	13.300	
Schnaapps	12.8	0.2	0.5	0.1	2.4	5.7	0.1	3.2	10.200	
Licor Amaretto	13.2	0.7	0.9	0.1	0.1	10.5	0.1	0.1	6.500	

Tabla 3. Características y componentes de Tequila y Brandy (Secretaría de Comercio y Fomento Industrial 1983a, 1983b).

	Brandy	Tequila
Grado de Alcohol (°G.L.)	38-55	38-55
Extracto seco. g/dm³	0.75-33	Tequila Blanco, de 0 a 0.2 Tequila Ropado, de 0 a 5 Tequila Añejo, de 0 a 5
Cenizas. g/dm³	0.05-0.5	0.1
Metanol. mg/100 cm³ de OH anhidro	0-180	0-300
Alcoholes superiores. (aceite fusel o alcoholes de peso molecular superior al etílico). mg/100 cm³	0-335	0-400
Aldehidos. mg/100 cm³ de OH anhidro. (acetaldehido)	4-80	2-30
Furfural. mg/100 cm³ de OH anhidro.	0-5	sin información
Propanol. mg/ 100 cm³ de OH anhidro	sin información	40
Isobutanol. mg/100cm³ de OH anhidro.	sin información	7-200
Alcohol isoamílico. mg/100cm³ de OH anhidro.	sin información	7-200
Butanol mg/100cm³ de OH anhidro.	sin información	1-2

Tabla 4. Congéneres Semivolátiles en Ginebras (mg/l). T = traza (Mc Analley, 1988).

Compuesto	Langueray	Beefeater	Gordon's	Gilbey's	Seagram's
Cyclohexano	-----	-----	-----	T	-----
3-Metil-1-butanol	66	-----	-----	-----	-----
Benceno etanol	86	111	90	T	137
Acido heptanoico	-----	-----	-----	T	-----
Etil caprilato	63	13	T	T	18
Etil ester de ácido dodecanoico (peso mol. 228)	-----	-----	-----	T	-----
Etil ester de ácido dodecanoico (peso mol. 220)	30	11	40	-----	41
Dietoxi etano	-----	-----	-----	T	-----
2-Metil propanol	-----	-----	-----	T	-----
4-Careno (o terpenos similares)	193	488	206	T	525

Tabla 5. Congéneres Semivolátiles en Whiskies Scotch (mg/L) (Mc Analley, 1988).

Compuesto	Johnny Walker	Cuffy Sark	J & B	Chivas Regal	Usher's
Ciclohexano	25	-----	-----	-----	-----
3-Metil-1-butanol	504	1076	1796	906	1222
Benceno etanol	112	128	278	86	108
Etil caprilato o Etil ester de ácido	116	106	123	76	85
Dodecanoico (peso mol. 228)	99	111	57	36	42
Etil ester de ácido dodecanoico (peso mol. 220)	267	241	263	129	173
B-Metil histamina	-----	25	83	17	32
Dietoxi etano	338	38	62	40	14
2-Metil propanol	169	56	91	195	243
Pentil ester de ácido acético	40	39	31	-----	-----

Tabla 6. Congéneres Semivolátiles en bourbones (mg/L) (Mc Analley, 1988).

Compuesto	Jim Beam	Jack Daniels	Weller
Ciclohexano	73	----	----
3-Metil-1-butanol	569	61	849
Benceno etanol	T	300	738
Etil caprilato	98	25	84
Etil ester o ácido dodecanoico (peso mol. 228)	42	----	40
Etil ester de ácido dodecanoico (peso mol. 220)	116	51	152
Dietoxi etano	T	63	383
2-Metil propanol	73	403	241
Urea	----	----	T
Furaldehido	----	48	86

T = Trazas

Tabla 7. Congéneres Semivolátiles en Tequila (mg/L) (Mc Analley, 1988).

Compuesto	Azteca	Cuervo
3-Metil-1-butanol	2056	107
Benceno etanol	105	----
Etil caprilato	51	T
Etil ester de ácido dodecanoico (peso mol. 228)	39	17
Etil ester de ácido dodecanoico (peso mol. 220)	173	27
Dietoxi etano	33	----
2-Metil propanol	66	----
Dimetoxi metano	435	----

T = Trazas

Tabla 8. Minerales en vinos y cervezas (Mc Analley, 1988).

Mineral	Vinos mg/L	Cerveza mg/L	Recomendación (mg)
Cloro	10-80	----	1700-5100
Calcio	29-99	20-70	800-1200
Cobre	0-9	T - 0.4	2-3
Hierro	0-20	T - 0.64	10-18
Potasio	180-1620	130-1040	1875-5625
Sodio	10-200	68-550	1100-3300
Flour	1-10	0.1-0.9	1.5-4.0
Fósforo	30-900	50-300	800-1200
Magnesio	10-350	50-300	300-400
Manganeso	T-51	----	2.5-5.0
Iodo	T	----	0.15
Cromo	----	0.5-22 ug/L	0.05-0.2
Selenio	----	0.2-2.5 ug/L	0.05-2.0

T= Trazas.

Tabla 9. Vitaminas en vinos y cervezas (Mc Analley, 1988)

Vitamina	Vino (ug/Lt)	Cerveza (ug/Lt)
Vitamina B1	0-240	20-60
Vitamina B2	60-220	300-1200
Vitamina B6	220-820	400-900
Vitamina B12	0.009-0.25	5000-20,000
Ac. Fólico	15-21	
Ac. Nicotínico	0.6-4.6	5000-20,000
Biotina	0.6-4.6	0-15

Tabla 10. Contenido de carbohidratos en bebidas seleccionadas (Mc Analley, 1988).

Bebida	Total de carbohidratos (%)
Cerveza	2.1-8.3
Vino	2-12
Cola	12.3
Licores	2.5-35

Tabla 11 Genotipos de la alcohol deshidrogenasa (Agarwal, 1990; Eriksson, 1987).

Gene	Alelo	Subunidad	Combinación	
Clase I				
ADH ₁	ADH ₁	α	αα, αβ ₁ , αβ ₂	
			αγ ₁ , αγ ₂	
ADH ₂	ADH ¹ ₂	β ₁	β ₁ β ₁ , β ₁ β ₂ , β ₁ γ ₂	
			ADH ² ₂	β ₂ β ₂ , β ₂ γ ₁ , β ₂ γ ₂
			ADH ³ ₂	β ₃ β ₃
ADH ₃	ADH ¹ ₃	γ ₁	γ ₁ γ ₁ , γ ₁ γ ₂	
			ADH ² ₃	γ ₂ γ ₂
Clase II				
ADH ₄	ADH ₄	π	ππ	
Clase III				
ADH ₅	ADH ₅	χ	χχ	
Clase IV				
	ADH ₇	σ	σσ	
	ADH ₇	μ	μμ	
Clase V				
	ADH ₆			

Tabla 12. Pesos de ratones (gr) tratados con Etanol Tequila y Brandy D1 =1 D2=2 y D3= 3 g/Kg. X1 = media de peso antes del tratamiento + desviación estandard, X2= media de peso después del tratamiento + desviación estandard. El análisis estadístico se realizó con la prueba de t de Student (p=0.05), considerando la diferencia de las medias de X2-X1. * X1<X2, **X1<X2, ***X1>X2.

Testigo	Etanol	Tequila	Brandy
T(-)	D1 *	D1 *	D1 *
X1 X2	X1 X2	X1 X2	X1 X2
27.4 - 30.2	27.2 - 29.5	28.7 - 32	31.0 - 34.5
28.3 - 33.	30.9 - 34	25.7 - 28	30.0 - 32
28.6 - 31	26.9 - 30	27.2 - 30	29.1 - 32.6
30.0 - 32.3	27.3 - 29	28.8 - 32.5	30.4 - 35.7
25.2 - 28.50	29.0 - 32	27.0 - 29.5	27.5 - 30.7
30.4 - 32.7	30.0 - 34.1	29.2 - 33.5	31.0 - 35.
X1=28.3± 1.8	X1=28.5±1.7	X1=27.7±1.35	X1=29.8±1.3
X2=31.2± 1.7	X2=31.4±2.6	X2= 30.9± 2.0	X2=33.4±1.3
T (+) *	D2 *	D2 **	D2 *
X1 X2	X1 X2	X1 X2	X1 X2
25.5 - 28.0	28.5 - 30.8	30.2 - 33.5	31.7 - 36
27.0 - 26.5	28.6 - 30.0	29.3 - 34	29.1 - 32
28.0 - 29.3	31.8 - 35.0	28.4 - 33.4	28.3 - 30
27.4 - 28.9	29.5 - 31.0	30.8 - 35	29.5 - 33
29.0 - 29.5	26.7 - 30.2	27.9 - 32	26.3 - 29
26.8 - 27.7	27.0 - 31.0	26.6 - 30	27.8 - 30
X1= 27.2±1.1	X1=28.6±1.8	X1=28.8±1.5	X1=28.7±1.8
X2=28.3±1.8	X2=31.3±1.8	X2=33.3±1.16	X2=31.6±2.5
	D3 ***	D3 ***	D3 *
	X1 X2	X1 X2	X1 X2
	29.8 - 31.0	28.8 - 26.5	30. - 34
	29.6 - 30.2	30.3 - 32.5	25.6 - 27
	29.3 - 28.4	29.5 - 28.5	28 - 32
	29.1 - 30.2	32.2 - 30.5	29.8 - 32.5
	28.8 - 30.	30.0 - 28.	26.1 - 29
	29.5 - 31.4	29.4 - 30.5	29. - 31
	X1=29.3±0.36	X1=30±1.8	X1=28.3±1.87
	X2=30.2±1.0	X2=29.4±2.1	X2=30.9±2.5

Tabla 13 Peso de animales (gr.) tratados con soluciones equivalentes a 3 g de etanol/kg de peso. Utilizando la prueba de t de Student ($p=0.05$) para comparar las diferencias de las medias, antes ($\bar{X}_1 \pm$ desviación estandar) y después ($\bar{X}_2 \pm$ desviación estandar) del tratamiento del grupo testigo con las de los tratados con las bebidas alcohólicas, no se encontraron diferencias significativas.

Testigo (-)	Etanol	Tequila	Brandy
28 - 30.1	28.5 - 28.1	30.3 - 30.2	28 - 28.1
26.5 - 28.7	28.6 - 26.9	27.7 - 28.2	31.1 - 32.7
27 - 30	29.1 - 28.5	29.3 - 28.0	29.7 - 28.2
28.7 - 31.0	29.8 - 30.9	26.9 - 29.0	29.4 - 30.0
$\bar{X}_1=27.55\pm 0.9$	$\bar{X}_1=29\pm 0.5$	$\bar{X}_1=28.5\pm 1.5$	$\bar{X}_1=29.5\pm 1.2$
$\bar{X}_2=29.9\pm 0.9$	$\bar{X}_2=28.6\pm 1.6$	$\bar{X}_2=28.8\pm 0.9$	$\bar{X}_2=29.7\pm 2.1$

Tabla 14. Peso de los testículos (gr.) de animales tratados con soluciones equivalentes a 3 g de etanol/kg de peso (\bar{X} = media \pm desviación estandar). Aplicando la prueba de t de Student ($p=0.05$) no se encontraron diferencias significativas.

Testigo	Etanol	Tequila	Brandy
0.09 - 0.088	0.099 - 0.1	0.105 - 0.095	0.104 - 0.098
0.094 - 0.09	0.095 - 0.1	0.096 - 0.088	0.12 - 0.11
0.092 - 0.092	0.09 - 0.092	0.098 - 0.098	0.09 - 0.10
0.12 - 0.098	0.095 - 0.09	0.106 - 0.1010	0.092 - 0.092
$\bar{X}=0.095\pm 0.01$	$\bar{X}=0.095\pm 0.004$	$\bar{X}=0.098\pm 0.005$	$\bar{X}=0.1\pm 0.01$

Tabla 15a. Experimento I. Resultados obtenidos al tratar a ratones NIH (sw) con Etanol (E), Tequila (T) y Brandy (B). (1, 2 y 3 = 1, 2 y 3 g/ Kg) , R.C.S.1 = una ruptura, R.C.S.2=dos rupturas, S.T.R.C.S.=R.C.S.1+R.C.S.2, R.E.L. = rupturas en el elemento lateral, T = Total de rupturas, t (-) = testigos negativos tratados con solución fisiológica, t (+) = testigos positivos tratados con ciclofosfamida, n= número de células analizadas, * = diferencia significativa.

	t (-)	t (+)	E ₁	E ₂	E ₃	T ₁	T ₂	T ₃	B ₁	B ₂	B ₃
R. C.S.1	12	31	15	17	21	19	23	21	15	13	19
R. C.S.2	0	9	0	0	0	0	2	4	1	2	3
S.T.R.C.S.	12	49	15	17	21	19	27	29	17	17	25
R.E.L.	2	10	4	0	7	3	3	5	1	2	1
T	14	59	19	17	28*	22	30*	34*	18	19	26*
n	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90

Tabla 15b. Experimento II. Resultados obtenidos al tratar a ratones NIH (sw) con Etanol (E), Tequila (T) y Brandy (B). (1, 2 y 3 = 1, 2 y 3 g/ Kg) , R.C.S.1=una ruptura, R.C.S. 2 = dos rupturas, S.T.R.C.S.=R.C.S.1+R.C.S. 2, R.E.L. = rupturas en el elemento lateral, T = Total de rupturas, t (-) = testigos negativos tratados con solución fisiológica, t (+) = testigos positivos tratados con ciclofosfamida, n = número de células analizadas, * = diferencia significativa.

	t (-)	t (+)	E ₁	E ₂	E ₃	T ₁	T ₂	T ₃	B ₁	B ₂	B ₃
R. C.S. 1	11	27	14	14	24	15	18	25	14	18	24
R. C.S. 2	0	7	0	0	1	0	3	4	0	0	2
S.T.R.C.S.	11	41	14	14	26	15	24	33	14	18	28
R.E.L.	1	9	2	6	5	2	2	2	1	2	4
T	12	50	16	20	31*	17	26*	35*	15	20	30*
n	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90

Tabla 15c. Suma de los resultados del Experimento I y Experimento II al tratar a ratones NIH (sw) con Etanol (E), Tequila (T) y Brandy (B). (1, 2 y 3 = 1, 2 y 3 g/Kg), R.C.S. 1 = una ruptura, R.C.S.2=dos rupturas, S.T.R.C.S. = R.C.S. 1 + R.C.S. 2, R.E.L. = rupturas en el elemento lateral, T = Total de rupturas, t (-) = testigos negativos tratados con solución fisiológica, t (+) = testigos positivos tratados con ciclofosfamida, n= número de células analizadas, * = diferencia significativa.

	t(-)	t(+)	E ₁	E ₂	E ₃	T ₁	T ₂	T ₃	B ₁	B ₂	B ₃
R. C.S. 1	23	58	29	31	45	34	41	46	29	31	43
R. C.S. 2	0	16	0	0	1	0	5	8	1	2	5
S.T.R.C.S.	23	90	29	31	47	34	51	62	31	35	53
R.E.L.	3	19	6	6	12	5	5	7	2	4	5
T	26	109	35	37	59*	39	56*	69*	33	39	58*
n	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180

Tabla 16. Variables estadísticas total de rupturas encontradas en el Experimento I, t (-) = testigo negativo, E1, E2, E3 = 1, 2 y 3 g de etanol / kg contenidos en una solución de etanol (95° G.L.) al 20%. T1, T2, T3 = 1, 2, 3 g de etanol/kg contenidos en una solución de tequila (40° G.L.) al 20% B1, B2, B3 = a 1, 2, 3 g de etanol/kg contenidos en una solución de brandy (38° G.L.) al 18%. t (+) = 20 mg de ciclofosfamida/kg. X = media, V = varianza, D.E. = desviación estandar, E.E. = error estandar, (*)= diferencia significativa (p< 0.05).

Tratamiento	No. de Células	X	V	D.E.	E.E.	Intervalo de confianza
t (-)	90	0.13333	0.11655	0.34184	0.03603	0.0642313
E1	90	0.17776	0.14782	0.36447	0-04053	0.1086758
E2	90	0.22222	0.17478	0.41807	0.04407	0.1531202
E3 (*)	90	0.34444	0.25081	0.50081	0.05779	0.2753424
T1	90	0.15889	0.15493	0.39361	0.04149	0.1197669
T2 (*)	90	0.30008	0-27978	0.52694	0.05575	0.2308950
T3 (*)	90	0.38839	0.33021	0.57464	0.03057	0.3197669
B1	90	0.15667	0.14045	0.37477	0.03950	0.0973646
B2	90	0.22222	0.17478	0.41807	0.04407	0.1531202
B3 (*)	90	0.35556	0.27665	0.52598	0.05544	0.2864535
t (+) (*)	90	0.55556	0.40699	0.63796	0.06725	0.4864535

Tabla 17. Variables estadísticas del total de rupturas encontradas en el Experimento 2, t (-) = testigo negativo, E1, E2, E3 = 1, 2 y 3 g de etanol/kg contenidos en una solución de etanol (95° G.L.) al 20%. T1, T2, T3 = 1, 2, 3 g de etanol/kg contenidos en una solución de tequila (40° G.L.) al 20% B1, B2, B3 = 1, 2, 3 g de etanol / kg contenidos en una solución de brandy (38° G.L.) al 18%. t (+) = 20 mg de ciclofosfamida / kg. X = media, V = varianza, D.E. = desviación estandar, E.E. = error estandar, (*) = diferencia significativa (p<0.05).

Tratamiento	No. de Células	X	V	D.E.	E.E.	Intervalo de confianza
t (-)	90	0.15556	0.13283	0.3644	0.03542	0.0649736 0.2261375
E1	90	0.21111	0.16841	0.4103	0.04326	0.1405291 0.2816931
E2	90	0.18889	0.15493	0.39361	0.04149	0.1183069 0.2594709
E3 (*)	90	0.31111	0.21673	0.4655	0.04917	0.2405291 0.3816931
T1	90	0.24444	0.15677	0.43216	0.0555	0.1735625 0.3150264
T2 (*)	90	0.33333	0.26966	0.51929	0.05474	0.2627514 0.4039153
T3 (*)	90	0.37778	0.32759	0.57236	0.06333	0.3071958 0.4483595
B1	90	0.20000	0.18427	0.42927	0.04525	0.1294180 0.2705620
B2	90	0.21111	0.21336	0.46191	0.04569	0.1405291 0.2816931
B3 (*)	90	0.28889	0.27516	0.52455	0.05529	0.2183069 0.3594709
t (+) (*)	90	0.65556	0.43059	0.65619	0.06917	0.5849736 0.7261375

Tabla 18. Variables estadísticas de la suma total de ruturas encontradas en los Exp. I y Exp. II., t (-) = testigo negativo, E1, E2, E3 = 1, 2 y 3 g de etanol / kg contenidos en una solución de etanol (95° G.L.) al 20%. T1, T2, T3 = 1, 2, 3 g de etanol / kg contenidos en una solución de tequila (40° G.L.) al 20% B1, B2, B3 = a 1, 2, 3 g de etanol/kg contenidos en una solución de brandy (38° G.L.) al 18%. t (+) = 20 mg de ciclofosfamida / kg. X = media, V = varianza, D.E. = desviación estandard, E.E. = error estandard, (*) = diferencia significativa (p<0.05).

Tratamiento	No. de Células	X	V	D.E.	E.E.	Intervalo de confianza
t (-)	180	0.14444	0.12427	0.35252	0.02628	0.0952054
E1	180	0.19444	0.15751	0.39688	0.02958	0.1452054
E2	180	0.20556	0.16421	0.40523	0.03020	0.1563165
E3 (*)	180	0.32222	0.23079	0.48040	0.03581	0.2729832
T1	180	0.21667	0.17067	0.41312	0.03079	0.1674277
T2 (*)	180	0.31111	0.27135	0.52095	0.03883	0.2618721
T3 (*)	180	0.38333	0.32709	0.57192	0.04263	0.3340943
B1	180	0.15333	0.16173	0.40216	0.02998	0.1340943
B2	180	0.1667	0.19382	0.43934	0.03275	0.1674277
B3 (*)	180	0.32222	0.27545	0.52455	0.03912	0.2729832
t (+)(*)	180	0.60556	0.41895	0.64727	0.04624	0.5563163

Tabla 19. Frecuencia de células en paquiteno en relación al total de los diferentes tipos celulares en testículo, en el grupo testigo negativo tratado con solución fisiológica y el testigo positivo tratado con ciclofosfamida (20 mg/kg).

Ratón	No. de Células	Testigo negativo		Testigo positivo.	
		Paquiteno	Otras	Paquiteno	Otras
1	1000	97	803	215	785
2	1000	175	825	199	801
3	1000	184	816	170	803
4	1000	218	782	187	813
5	1000	202	798	204	796
6	1000	190	810	210	790

Tabla 20. Frecuencia de células en paquíteno en relación al total de los diferentes tipos celulares en testículo, en el grupo testigo negativo tratado con solución salina fisiológica y el grupo experimental tratado con etanol a tres diferentes concentraciones (1, 2 y 3 g de etanol/Kg).

Ratón	No. de Células	Etanol 1.			Etanol 2.			Etanol 3.		
		Paquíteno	Otras		Paquíteno	Otras		Paquíteno	Otras	
1	1000	188	812		191	809		197	803	
2	1000	207	793		219	781		186	814	
3	1000	201	799		205	795		209	791	
4	1000	295	795		169	831		202	798	
5	1000	175	825		194	806		188	812	
6	1000	203	797		187	813		172	828	

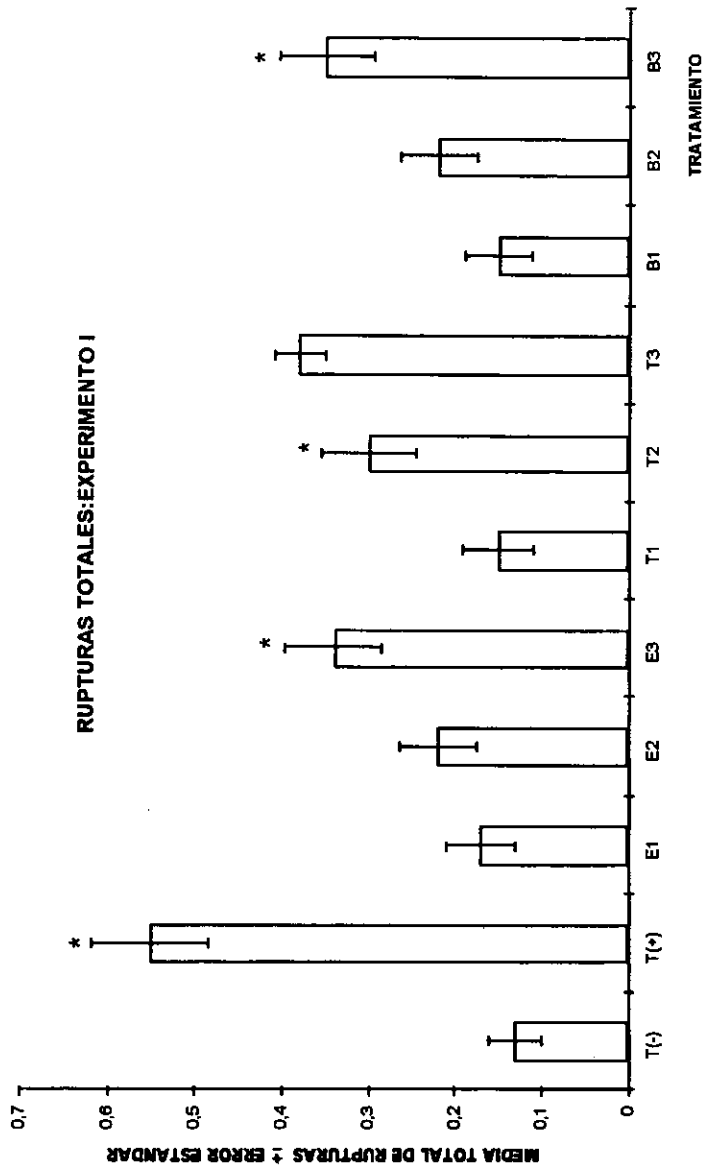
Tabla 21. Frecuencia de células en paquíteno en relación al total de los diferentes tipos celulares en testículo, en animales tratados con tequila. Tequila 1 = 1 g/Kg, Tequila 2 = 2 g/Kg y Tequila 3 = 3 g/Kg.

Ratón	No. de Células	Tequila 1			Tequila 2			Tequila 3		
		Paquíteno	Otras	Otras	Paquíteno	Otras	Otras	Paquíteno	Otras	
1	1000	175	825	825	195	805	805	205	795	
2	1000	180	820	820	178	822	822	195	805	
3	1000	192	808	808	192	808	808	204	796	
4	1000	172	828	828	184	816	816	192	808	
5	1000	205	795	795	191	809	809	186	814	
6	1000	215	785	785	190	810	810	180	820	

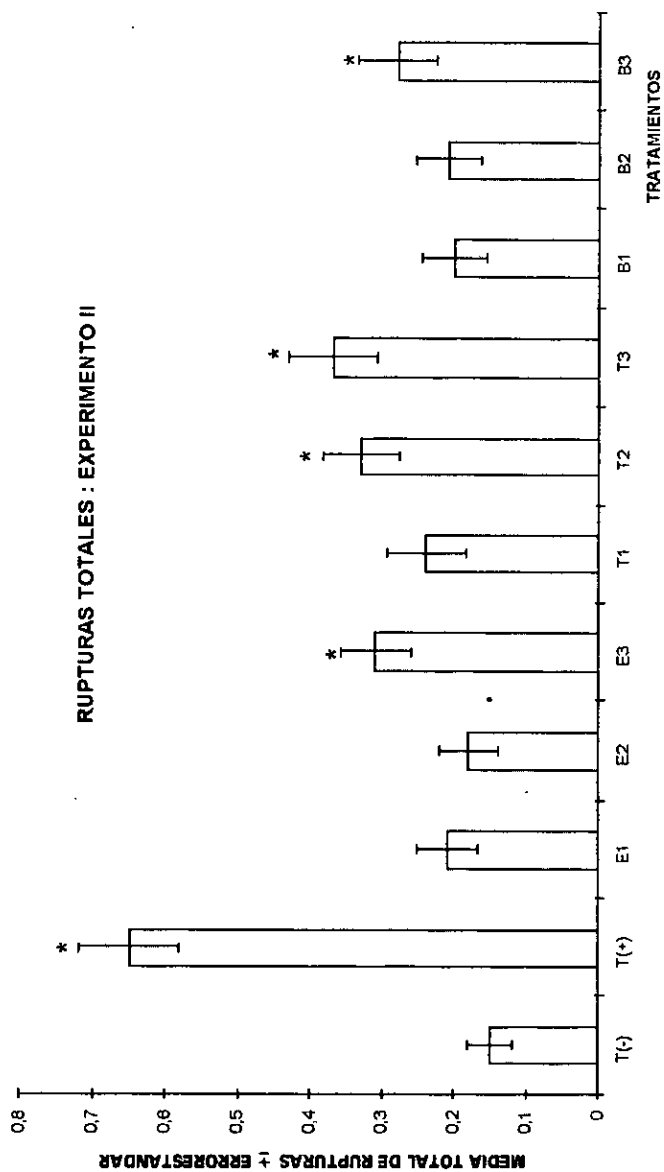
Tabla 22. Frecuencia de células en paquíteno en relación al total de los diferentes tipos celulares en testículo, en animales tratados con Brandy. Brandy 1 = 1, Brandy 2 = 2, Brandy 3 = 3, (g/Kg).

Ratón	No. de Células	Brandy 1.		Brandy 2.		Brandy 3.	
		Paquíteno	Otras	Paquíteno	Otras	Paquíteno	Otras
1	1000	171	829	230	770	202	798
2	1000	210	790	198	702	220	720
3	1000	189	811	228	772	197	803
4	1000	196	804	182	818	203	797
5	1000	209	791	196	804	187	813
6	1000	201	799	185	815	205	795

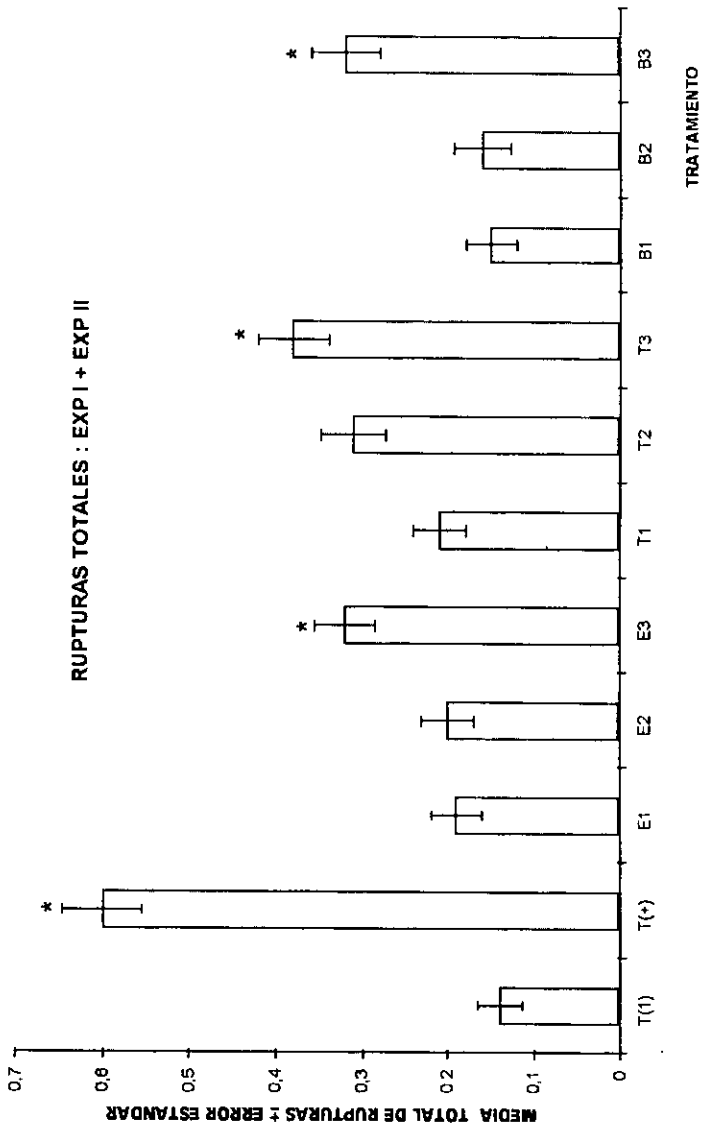
XII.GRAFICAS.



Gráfica No. 1. Experimento I: E=etanol, T=tequila, B=brandy, 1=1, 2=2, 3=3 g de etanol/kg, T(-) = testigo negativo, T (+) = testigo positivo, * Diferencia Significativa



Gráfica No. 2. Experimento II: E=etanol, T=tequila, B=brandy, 1=1000, 2=2000, 3=3000 mg de etanol/kg, T(-) testigo negativo, T(+)=0 testigo positivo, * = Diferencia Significativa



Gráfica No. 3. Experimento I + Experimento II: E=etanol, T=tequila, B=brandy, l=1000, 2=2000, 3=3000 mg de etanol/kg, T(+)= testigo positivo, T(-)= testigo negativo, * Diferencia Significativa

XIII. FIGURAS Y FOTOGRAFÍAS.



FOTOGRAFÍA 1. COMPLEJO SINAPTONÉMICO DE CÉLULA EN PAQUÍTENO



FOTOGRAFÍA 2. .RUPTURA DEL COMPLEJO SINAPTONÉMICO. LA FLECHA INDICA LA RUPTURA.



FOTOGRAFÍA 3. RUPTURA DE LOS ELEMENTOS LATERALES (FLECHA SUPERIOR) Y DEL COMPLEJO SINAPTONÉMICO (FLECHA INFERIOR).

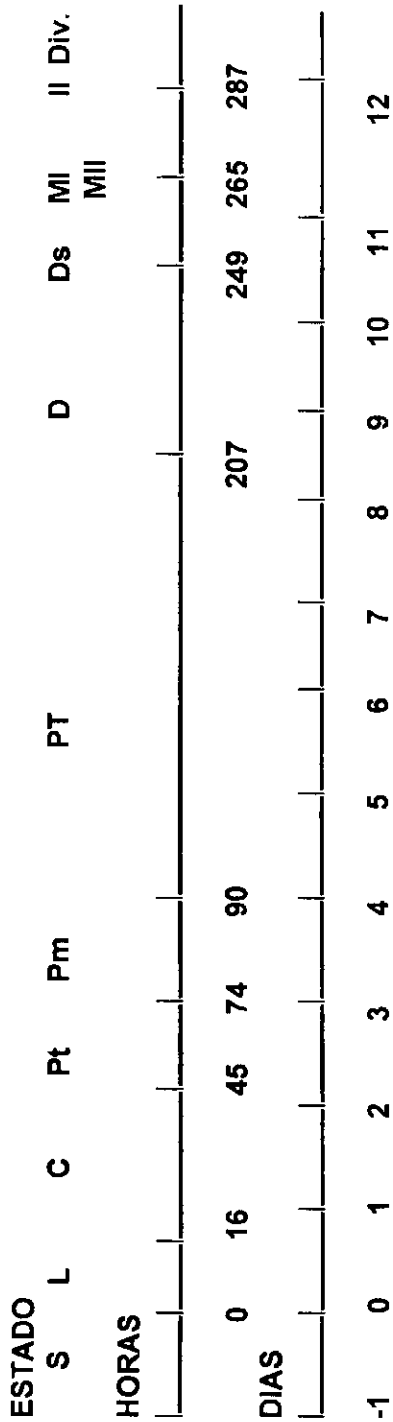


Fig.1. Duración de la meiosis en ratón. S= fase S, L= leptóteno, C = cigóteno, P t = paquíteno temprano, Pm = paquíteno medio, PT = paquíteno tardío, D = diplóteno, Ds = diacinesis, MI = metafase I, MII = metafase II, II Div. = segunda división.

XIV. ANEXO I.

Reprinted From

**MEDICAL
SCIENCE
RESEARCH**

Science and Technology Letters

Rapid publication of concise reports in medical science

Effect of ethanol in the synaptonemal complex of mouse spermatocytes

Arturo Piña-Calva, Raúl Quezada and Eduardo Madrigal-Bujaidar

Laboratorio de Genética, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Carpio y Plan de Ayala, Col. Sto. Tomás, México, D.F.C.P. 11340, México

Keywords: Ethanol, synaptonemal complex, spermatocytes.

Introduction: The synaptonemal complex (SC) is a proteinic structure which appears during the meiotic prophase and is constituted by two lateral elements, transverse filaments and an axis. This organelle is important for the pairing of homologous chromosomes as well as for the interchange of genetic information [1].

In recent years several authors have reported that physical and chemical agents may damage the SC. This finding has led to the conclusion that modifications to the integrity of the SC structure represent a useful genotoxic indicator, particularly when the SC damage has been correlated with chromosomal aberrations in metaphase I and II [2].

Ethanol exposure increases the frequency of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges (SCEs) in the lymphocytes of alcoholics [3], mammalian cells *in vitro* [3, 4] and bone marrow cells of animals *in vivo* [5]. Information is less extensive and conclusive concerning the germ line. A report by Daniel and Roane [6] indicates the presence of aneuploidy in spermatogonia and metaphase I and II in the Chinese hamster. Other reports have shown no chromosomal aberrations in rat spermatogonia [7].

To determine the effect of ethanol in the germ cell, we studied the level of damage in the SC of mouse spermatocytes treated with this substance for 21 days.

Materials and methods: We used male mice (NIH), obtained from the National Institute of Hygiene, with a mean weight of 28.7 g. The animals were maintained in polypropylene cages with food (Purina) and tap water *ad libitum* during the experiment (21 days).

Six animals per dose were given ethanol (Merck, México City, México) (20% diluted in distilled water). The tested doses were 1, 2 and 3 g kg⁻¹ body weight by oral intubation daily. They were selected after the determination of the LD50, and preliminary assays to observe mouse toxicity in subchronic treatment. For comparison of results we used negative (distilled water) as well as positive control animals (cyclophosphamide, Sanfer, México City, México) (20 mg kg⁻¹).

Mice were killed by cervical dislocation on the next day after the end of treatment. The testes were removed, finely disintegrated with scissors and the supernatant separated in a test tube. The cells were centrifuged at 450 g for 10 min and resuspended in KCl (Monterrey, Monterrey, México) 0.075 M at 34°C for 60 min. This resuspension was repeated twice, 5 min each. Finally, the cell suspension was fixed in methanol:acetic acid (Baker, México City, México) (3:1) and air-dried slides were made.

To detect the SC structure we used a silver impregnation method described previously by Howell and Black [8]. In short, each slide was coated with gelatin solution and a 33.3% silver nitrate solution (Baker) at 70°C for 2-3 min, washed with deionised water, dehydrated with xylene and mounted in resin.

To determine the level of SC damage we used an optical microscope (Carl Zeiss, × 100), and included all types of breaks in the whole SC or in the lateral elements. Complex alterations were not included in the scoring. 30 pachytene cells per animal were scored and statistical analysis was performed with the analysis of variance and the Tukey test ($p = 0.05$).

Results and discussion: The mechanisms(s) explaining the observed SC breaks is unknown, although Moses *et al.* [9] have suggested that these lesions may be a reflection of chromosomal alterations induced by mutagens or a secondary effect produced by chemicals on protein synthesis.

An SC light microscope micrograph is shown in Figure 1. The comparison between the number of cases of SC damage induced by cyclophosphamide (CF) and that obtained with negative as well as ethanol-treated animals showed a statistically significant difference. This varied from 76.2% with respect to the control, to 45.9% with respect to the highest ethanol dose (3 g kg⁻¹) (Table 1).

CF clearly increased the frequency of SC alterations in the 3 evaluated types (Table 1). Considering the high dose of ethanol (3 mg kg⁻¹) more than twice the total SC damage was reached in relation to the controls, inducing a statistically significant difference ($p = 0.05$). This indicates genotoxic activity of ethanol on the SC structure of mouse spermatocytes. Otherwise, the two lowest doses of ethanol showed only slight but insignificant increases in SC anomalies. The



Figure 1: Synaptonemal complexes in a pachytene cell of mouse spermatocytes. Silver impregnation technique. Carl Zeiss photomicroscope (× 100).

Table 1 Effect of ethanol, administered orally for 21 days, on the synaptonemal complex (SC) and lateral elements (LE) of mouse spermatocytes

Dose (g kg ⁻¹)	Observed cells	Frequency and types of breaks			Total
		1 break (SC)	2 break (SC)	Break (LE)	
0	180	23	0	3	26
1	180	29	0	6	35
2	180	31	0	6	37
3	179	*41	1	*12	*59
CF 0.020	180	*58	*16	*19	*109 **

CF = Cyclophosphamide.

* As compared with control, $p = 0.05$ (ANOVA and Tukey tests).

** As compared with ethanol treatments, $p = 0.05$ (ANOVA and Tukey tests).

rate of SC lesions produced by this chemical were less pronounced in the 2-break category (Table 1).

CF is an alkylating agent with mutagenic-clastogenic properties detected in different biological systems including spermatogonia. Its breaking capacity in the SC of mammals has also been reported [10, 11]. Therefore, our results agree with those previously observed.

The genotoxic capacity of ethanol has been mainly attributed to its first metabolite, acetaldehyde. This produces DNA crosslinking, interacts with a variety of macromolecules to form adducts (formed by addition of small chemical groups), and disturbs DNA synthesis and repair processes [12]. In our experiment, if we compare the ethanol dosages used with the stages of acute alcoholic influence/intoxication in humans [13], the second dose (2 g kg⁻¹) is approximately equivalent to the manifestations of euphoria, while the high dose would correspond to stupor. On the other hand, 21 days of ethanol ingestion in mice would represent approximately 2.5 years in a human. Considering that genotoxicity was

detected with an elevated dose, our results suggest that chronic alcohol consumption may disrupt the integrity of SC structure.

Ethanol is the main component of alcoholic beverages, and some of these have been shown to be genotoxic in somatic cells *in vivo* [5, 14]. SC anomalies have been observed in patients with fertility disturbances, which are also frequently found in alcoholics. Therefore, we have in progress a study to determine whether chronic ingestion of alcoholic drinks in mice can affect the SC structure.

1. Engebrecht, J.A., Hirsch, J. and Roeder, G.S. 1980. *Cell*, **62**, 927-937
2. Allen, J.W., Gibson, J.B., Poorman, P.A. *et al.* 1988. *Mutat. Res.* **201**, 317-324
3. Obe, G. and Anderson, D. 1987. *Mutat. Res.* **186**, 177-200
4. de Raat, W.K., Davis, P.B. and Bakker, G.L. 1983. *Mutat. Res.* **124**, 85-90
5. Piña, A. and Madrigal-Bujaidar, E. 1993. *Toxicol. Lett.*, **66**, 1-5
6. Daniel, A. and Roane, D. 1986. *Mutat. Res.*, **164**, 193 (Abstr.)
7. Halkka, O. and Eriksson, K. 1977. In Gross, M.M. (ed.), *Alcohol Intoxication and Withdrawal, Biological Aspects of Ethanol*, pp. 1-6. Plenum, New York
8. Howell, W.M. and Black, D.A. 1980. *Experientia*, **36**, 1014-1051
9. Moses, M.J., Allen, P.A., Tepperberg, J.H. *et al.* 1990. In: Banbury Report. *Biology of Mammalian Germ Cell Mutagenesis*, pp. 113-154. Cold Spring Harbor Press, New York
10. Backer, L.C., Gibson, J.B., Moses, M.J. and Allen, J.W. 1988. *Mutat. Res.* **203**, 317-330
11. Tapia, F., Madrigal-Bujaidar, E. and Aguirre, S. 1992. *Mutat. Res.* **281**, 283-286
12. Dellarco, V.L. 1988. *Mutat. Res.* **195**, 1-20
13. Garriot, J.C. 1988. In: Garriot, J.C. (ed.), *Medico-legal aspects of Alcohol Determination in Biological Specimens*, pp. 36-54. PSG Publishing Co., Massachusetts
14. Madrigal-Bujaidar, E., Calderón-Vargas, R. and Diaz-Barriga, S. 1991. *J. Toxicol. Environ. Health*, **32**, 479-486

Reprint requests to: Dr E. Madrigal-Bujaidar, Laboratorio de Genética, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N. Carpio y Plan de Ayala, México, D.F.C.P. 11340 (México).

Paper received: 18th October, 1993; amended 7th January, 1994.

Cancer Detection and Prevention

Volume 21/Issue 2 1997

EDITOR-IN-CHIEF

H. E. Nieburga, M.D.
University of Massachusetts Medical School,
Box 20, 55 Lake Avenue North
Worcester, MA 01655, U.S.A.
Tel: (212) 534-4991
(508) 856-1822/3
FAX: (508) 856-1824

Assistant Editor: S. A. Kay

Associate Editors:
G. de Thé, M.D.
Pasteur Institute
Paris, France

V. E. Valli, D.V.M., Ph.D.
College of Veterinary Medicine
University of Illinois at Urbana-Champaign
Urbana, Illinois, U.S.A.

PUBLISHER:
Blackwell Science, Inc.
350 Main St.
Malden, MA 02148, U.S.A.

EDITORIAL ADVISORY BOARD

Pierre Band, M.D.
Biometry, Occupational Oncology
Cancer Control Agency of British Columbia
Vancouver, British Columbia, CANADA

Edward Bresnick, M.D., Ph.D.
Molecular Carcinogenesis
University of Massachusetts Medical Center
Worcester, Massachusetts, U.S.A.

Arthur L. Frank, M.D., Ph.D.
Occupational and Environmental Medicine
University of Texas Health Center at Tyler
Tyler, Texas, U.S.A.

Stephen A. Geller, M.D.
Pathology
Cedars Sinai Medical Center
Los Angeles, California, U.S.A.

Philip Gold, M.D., Ph.D.
Medicine
Montreal General Hospital
Montreal, Quebec, CANADA

Robert A. Good, M.D., Ph.D.
Immunology
University of South Florida
St. Petersburg, Florida, U.S.A.

Maureen Henderson, M.B.B.S., D.P.H.
Cancer Prevention
Fred Hutchinson Cancer Research Center
Seattle, Washington, U.S.A.

J. Heinrich Holzner, M.D.
Pathology
Pathology Institute, University of Vienna
Vienna, AUSTRIA

John Horton, M.B.Ch.B.
Clinical Oncology
H. Lee Moffitt Cancer and Research Institute
Tampa, Florida, U.S.A.

H. L. Joachim, M.D.
Immunopathology
Lenox Hill Hospital
New York, New York, U.S.A.

Paul Kleihues, M.D.
Carcinogenesis and Molecular Biology
International Agency for Research on Cancer
Lyon, FRANCE

Hamblyn Letton, M.D.
Surgery
Georgia Baptist Medical Center
Atlanta, Georgia, U.S.A.

Anthony Mastromarino, Ph.D.
Carcinogenesis
University of Texas
M. D. Anderson Cancer Center
Houston, Texas, U.S.A.

Curtis J. Mettlin, Ph.D.
Epidemiology
Roswell Park Memorial Institute
Buffalo, New York, U.S.A.

Anthony B. Miller, M.D.
Epidemiology
University of Toronto Faculty of Medicine
Toronto, Ontario, CANADA

Felix Mitelman, M.D.
Clinical Genetics
University Hospital
Lund, SWEDEN

Israel Penn, M.D.
Surgery
University of Cincinnati Medical Center
Cincinnati, Ohio, U.S.A.

Leonardo Santi, M.D.
Biotechnology
National Cancer Institute
Genoa, ITALY

Arnie J. Sasco, Ph.D.
Cancer Prevention Epidemiology
Institute Agency for Research on Cancer
Lyon, FRANCE

Jeffrey Schlom, M.D.
Tumor Biology
National Cancer Institute
Bethesda, Maryland, U.S.A.

Margaret R. Spitz, M.D.
Cancer Prevention
University of Texas
M. D. Anderson Cancer Center
Houston, Texas, U.S.A.

Philip Strax, M.D.
Mammography, Screening
Strax Institute
Lauderhill, Florida, U.S.A.

Sun Tsung-Tang, M.D.
Immunology
Chinese Academy of Medical Sciences
Beijing, PR CHINA

S. P. Tomasovic, Ph.D.
University of Texas
M. D. Anderson Cancer Center
Houston, Texas, U.S.A.

Lorenzo Tomatis, M.D.
Carcinogenesis
Institute Agency for Research on Cancer
Lyon, FRANCE

Maurice Tubiana, M.D.
Radiation Oncology
Institute Gustave Roussy
Villejuif, FRANCE

Umberto Veronesi, M.D.
Surgery
European School of Oncology
Milan, ITALY

I. B. Weinstein, M.D., Ph.D.
Molecular Carcinogenesis
Columbia University
New York, New York, U.S.A.

John Weisburger, M.D., Ph.D.
Carcinogenesis, Diet
American Health Foundation
Valhalla, New York, U.S.A.

Cancer Detection and Prevention (ISSN 0361-090X) is published bimonthly by Blackwell Science, Inc., 350 Main Street, Malden, MA 02148. Subscription rates per year: U.S. subscribers, \$170 individual and \$530 institution; Canada and Mexico, \$180 individual and \$540 institution; overseas subscribers, \$220 individual and \$580 institution. Single copies are available for \$90.00. Change of address. Send to publisher six weeks prior to move, enclose present mailing label with change of address. Claims for missing issues will be serviced at no charge if received within 90 days of the cover date for domestic subscribers and 6 months for those outside the U.S. Duplicate copies cannot be sent to replace issues not delivered because of failure to notify publisher of change of address. If not completely satisfied, refund available on all unmailed issues. Postmaster: Send address changes to Blackwell Science, Inc., 350 Main Street, Malden, MA 02148.

© 1997 by International Society for Preventive Oncology. All rights reserved. No part of this journal may be reproduced in any form or by any electronic or mechanical means, including information storage and retrieval systems, without the publisher's written permission. Permission to photocopy for internal or personal use or for the internal or personal use of specific clients is granted by Blackwell Science, Inc., for libraries and other users registered with the Copyright Clearance Center (CCC), provided that a fee of \$10.50 per copy of the article is paid directly to the CCC, 222 Rosewood Drive, Suite 910, Danvers, MA 01923. Special requests should be addressed to Blackwell Science, Inc. 0361-090X/97/\$10.50.

Cancer Detection and Prevention is indexed in *Index Medicus, Medium Mediarum, Current Contents/Clinical Medicine, Research Alert, Science Citation Abstracts, Current Awareness in Biological Sciences* and *BIOIS*. For Canadian orders, our GST number is 129964823.

Synaptonemal Complex Damage in Mouse Spermatocytes Exposed to Tequila and Brandy

Arturo Piña-Calva, M.S., Raul Quezada-Medina, Biol., and Eduardo Madrigal-Bujaidar, D.S.

Genetics Laboratory, National School of Biological Sciences, I.P.N. Carpio y Plan de Ayala, Mexico City, Mexico

Address all correspondence and reprint requests to: Eduardo Madrigal-Bujaidar, D.S., Laboratorio de Genética, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N. Carpio y Plan de Ayala, Sto. Tomás México, D.F.C.P. 11340, México.

ABSTRACT: We evaluated the capacity of tequila and brandy to induce synaptonemal complex (SC) breaks in mouse spermatocytes. The alcoholic beverages were 20% diluted in distilled water and administered daily by oral intubation for 21 days (1, 2, and 3 g/kg, six animals per group). A positive control group was administered cyclophosphamide (CP) (20 mg/kg), and another group of mice was treated with distilled water. The results indicated the following: (i) tequila induced a statistically significant increase in SC damage with 2 g/kg and 3 g/kg, and brandy was genotoxic only with 3 g/kg; (ii) CP induced almost a duplication of the total number of breaks produced by tequila or brandy; (iii) the average weight increase in the animals was 3.3 g, but the group treated with the highest dose of tequila showed a slight weight decrease; (iv) the weight of the testes did not show any significant difference among groups of animals; and (v) there were no significant differences between groups with respect to the frequency of pachytene (mean number: 195 in 1000 cells).

KEY WORDS: synaptonemal complex, mouse spermatocytes, tequila, brandy.

I. INTRODUCTION

Alcoholic beverages are complex mixtures composed of water, ethanol, and congeners. The congeners can be volatiles, including more than 45 alcohols, as well as different aldehydes, esters, acids, and phenols. Other congeners are non-volatile compounds including several minerals, vitamins, carbohydrates, and proteins.¹ The excessive or chronic consumption of these types of beverages has been unequivocally correlated with teratogenic and carcinogenic processes.² Therefore, a number of studies to determine the genotoxic potential of several alcoholic beverages (or its components) have been performed in distinct test systems.²⁻⁴ A general conclusion of these investigations is that most but not all beverages possess some degree of genotoxicity. However, the few-experimental studies using in vivo systems have analyzed the genotoxic damage in somatic cells, leaving a gap relative to the effect in germ cells.

Tequila and brandy are two drinks widely con-

sumed in different countries, and their genotoxicity has been previously detected in somatic cells.⁵ Structural damage in the synaptonemal complex (SC) has been successfully used to determine the genotoxic capacity of several chemicals.⁶ As this organelle joins the bivalent chromosomes in the zygotene-pachytene stages of gametogenesis, its alterations suggest the possibility of severe genetic consequences. Considering the importance of alcoholic beverages in human health as well as its genotoxic antecedents, we decided to study the effect of tequila and brandy on the SC of mouse spermatocytes.

II. MATERIALS AND METHODS

Male mice (NIH) obtained from the National Institute of Hygiene with a mean weight of 28.7 g were used for the experiment. The animals were kept in polypropylene cages and permitted to freely consume standard food (Purina, Mexico City) and tap water

during the 21 days of the beverage treatment. The animals were weighed before and at the end of the experiment, and the weight of testes was also recorded at necropsy.

The experimental design and the technique used for observing SC were similar to those previously described.⁷ Six animals per dose were treated daily by oral intubation with tequila or brandy 20% diluted in distilled water. The alcoholic drinks were commercially obtained and corresponded to the group of beverages most commonly consumed in Mexico (Tequila Sauza and Brandy Presidente). The tested doses were adjusted in the diluted beverages to an ethanol content of 1, 2, and 3 g/kg body wt. with an administered volume corresponding to 0.17, 0.35, and 0.52 ml, respectively. These doses were selected after preliminary assays to determine mouse toxicity in a subchronic treatment. We also included two control groups of animals; one of them was administered distilled water, and the other cyclophosphamide, a positive control (20 mg/kg; Sanfer, Mexico City). After 21 days of treatment, the animals were killed by cervical dislocation. The testes were dissected and put into KCl (0.075 M) to be finely minced with scissors; the supernatant was separated in a test tube, centrifuged at 450g for 10 min, and resuspended in KCl (0.075 M) at 34°C for 60 min. This process was repeated twice, with a resuspension time of 5 min each. Finally, the cell suspension was fixed in methanol:acetic acid (3:1), and air-dried slides were made. Each slide was coated with a gelatin solution as well as a 33.3% silver nitrate solution (Baker, Monterrey, Mexico) at 70°C for 2 to 3 min. Then, the slide was rinsed with deionized water, dehydrated with xylene, and mounted in resin.

The scoring of SC damage was done in coded slides with an optical microscope (Carl Zeiss, $\times 100$). We observed 30 pachytene cells per animal and included all types of breaks. The SC breaks were scored in the mid pachytene and detected as discontinuities larger than the width of the whole SC, an organelle formed by two parallel filaments (called lateral elements) and a central filament (central element). In mid pachytene, the lateral elements are intimately associated with each of the chromosomes forming a bivalent. When two breaks were scored, they usually belonged to different SC pairs. This could be determined by counting the number of bivalent chromosomes (19 plus XY) and by observing the continuity

of each SC from one end to the other. Breaks that affected only the lateral element (LE) were observed in the late pachytene with a limited frequency. They appeared as discontinuities in one LE, producing a dislocation of that filament with respect to the other. Complex alterations, such as multiaxial rearrangements were not included in the scoring, as these type of damage are better detected with electron microscopy. The results were statistically evaluated with analysis of variance and the Tuckey tests, with $\alpha = 0.05$. We also determined the relative frequency of pachytene cells in each treatment to the total number of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids. These three types of cells were classified according to their specific features: spermatogonia are the greatest cells in the series, with ovoid or round nuclei and variable staining properties according to the specific type of spermatogonia; spermatocytes were detected by considering the development and degradation of the SC as well as the different stages of chromatin condensation; and spermatids were characterized by a small nuclear size and a defined conformation according to the stage in their differentiation process.⁸⁻¹⁰

III. RESULTS

At the end of the experiment, we observed an average weight increase of 3.3 g, including all groups. A decrease in this parameter was detected only with the highest dose of tequila, but without statistical significance. On the other hand, the weights of the testes at the end of treatment were similar in both the alcohol-treated and the control animals (Table I).

The number of pachytene cells with respect to the population of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids showed a homogeneous distribution in all groups. We found a mean of 195 pachytenes in the treated and control animals, without significant differences between them (Table II).

It was observed that both types of alcoholic beverages caused significant damage in the SC of mouse spermatocytes, but tequila had a stronger effect than brandy. In the three types of SC alterations considered, tequila produced more damage; the total percentage increase induced by this beverage compared with the control level was 50, 115, and 165% with the dosages 1, 2, and 3 g/kg, respectively, while the values determined with brandy were respectively 26, 50,

TABLE I
Weight Measurements of Animals and Their Testes in Mice Treated
for 21 Days with Tequila and Brandy

	Dose (g/kg) ^a	Animal weight (g ± SEM)	
		Day 0	Day 21
Control	0.0	28.3 ± 0.27	31.2 ± 0.70 ^b
Tequila	1.0	27.7 ± 0.55	30.9 ± 0.85 ^b
	2.0	28.8 ± 0.63	32.9 ± 0.71 ^b
	3.0	30.0 ± 0.48	29.5 ± 0.87
Brandy	1.0	29.8 ± 0.54	33.4 ± 0.79 ^b
	2.0	28.7 ± 0.74	31.6 ± 1.05 ^b
	3.0	28.0 ± 0.76	30.9 ± 1.03
CP ^c	0.02	27.2 ± 0.49	27.6 ± 0.4
Testes weight, day 21 (g ± SEM)^d			
Control	0.0	0.093 ± 0.002	
Tequila	3.0	0.097 ± 0.001	
Brandy	3.0	0.098 ± 0.002	
CP	0.02	0.091 ± 0.001	

^a Based on alcohol content after the beverages' dilution.

^b Statistically significant difference with respect to Day 0 (Tukey test, $p = 0.05$).

^c CP = cyclophosphamide.

^d Mean weight of both testes. Statistical differences with respect to control were not significant (Tukey test, $p = 0.05$).

and 123% (Table III). In this table it can also be observed that tequila induced significant differences with respect to control SC damage with the second and third dosages (2 and 3 g/kg), while the damage produced by brandy was significant only with the highest tested dose. On the other hand, our positive control agent (cyclophosphamide) is an alkylating chemical which produces several types of DNA alterations. This compound showed a potent SC-disturbing capacity.

IV. DISCUSSION

Results obtained in the weight measurements indicate that the experimental treatment was not toxic and did not produce a significant health deterioration in the animals, as most groups increased their weight, and the small weight decrease induced by the high dose of tequila was not statistically significant. However, these data suggest that tequila possesses a stron-

ger toxic potential than brandy, a conclusion that agrees with results obtained in the evaluation of the SC damage. The lack of significant toxicity in the animals also is in agreement with the homogeneous distribution of pachytene in all experimental groups, an observation suggesting that cell proliferation was not affected by the chemicals.

SC alterations by the action of alkylating agents, mitotic inhibitors, or ionizing radiation (IR) have been described, and their consequences may relate to chromosome instability, which at least with IR may be the origin of defective offspring or increases in sterility.¹¹ In our study, we found that cyclophosphamide increased by more than four times the SC damage observed in the controls, a result which is congruent with previous reports about the SC-breaking capacity of this chemical. In fact, SC anomalies attributed to cyclophosphamide may persist 50 days after a single administration.^{7,12,13}

According to studies with other chemicals, the SC breaks produced by alcoholic beverages may be

TABLE II
Frequency of Pachytene Cells with
Respect to the Number of
Spermatogonia, Spermatocytes, and
Spermatids

	Dose (g/kg) ^a	Mean of pachytene cells \pm SEM
Control	0	194 \pm 6.1
Tequila	1.0	188 \pm 7.0
	2.0	188 \pm 2.5
	3.0	193 \pm 4.0
Brandy	1.0	196 \pm 5.9
	2.0	203 \pm 8.5
	3.0	202 \pm 4.4
CP	0.02	197 \pm 6.7

Note: The scoring was made in 1000 cells per animal (six mice per treatment). The values showed no significant differences between them (ANOVA, $p = 0.05$). CP = cyclophosphamide.

^a Based on alcohol content after the beverages' dilution.

related to lesions at the premeiotic DNA S phase, which interfere with the union of proteins of the SC central region or its lateral elements with DNA (6). As alcoholic beverages are complex mixtures and the concentration of their components differs among them, it is difficult to establish a correlation between

a specific chemical and the observed damage. A number of compounds, such as flavonoids, heavy metals, caramel, different alcohols and aldehydes, nitrosamine, or *N*-nitrosoproline, may participate in the toxic effects of these beverages, as previously suggested,^{14,15} but ethanol is the main component in these mixtures and its mutagenic capacity is most probably due to the action of acetaldehyde (Ad).¹⁶ It is also known that Ad induces chromosome breakage in embryonic cells of rat, and sister-chromatid exchanges in spermatogonial cells of mouse.^{17,18} It is possible to assume, then, that acetaldehyde also participates as one of the SC-breaking inductors in our study. On the other hand, as ethanol content was similar in both beverages, the excessive damage produced by tequila may be attributed to some of the previously mentioned congeners.

Ethanol was also included in our experiment, and the results have already been published.⁷ The ethanol SC effect was similar to that observed with brandy (total number of breaks with the highest dose equaled 59 and 58, respectively), data that seem to reflect additionally the importance of ethanol-acetaldehyde as a possible SC-disturbing agent.

In summary, our results establish that alcoholic beverages in high concentrations induce damage in mammalian germ cells and suggest that their chronic consumption may affect not only somatic but also germ cells in humans.

TABLE III
Synaptonemal Complex Alterations Induced by Tequila and Brandy
In Mouse Spermatocytes after 21 Days of Oral Administration

	Dose (g/kg) ^a	One break (SC) no.	Two breaks (SC) no.	Break (LE) no.	Total no.
Control	0	23	0	3	26
Tequila	1	34	0	5	39
	2	41 ^b	5 ^b	5	56 ^b
	3	46 ^b	8 ^b	7	69 ^b
Brandy	1	29	1	2	33
	2	31	2	4	39
	3	43 ^b	6 ^b	6	55 ^b
CP	0.02	58 ^b	16 ^b	19 ^b	109 ^b

Note: The number of breaks was scored in 180 cells per dose (30 cells per animal). SC = synaptonemal complex; LE = lateral elements; CP = cyclophosphamide.

^a Based on alcohol content after the beverages' dilution.

^b Statistically significant difference with respect to control. Analysis of variance and Tuckey tests, $p = 0.05$.

REFERENCES

1. McAnally BH. Chemistry of alcoholic beverages. In: Garratt JC, ed. *Medicolegal aspects of alcohol determination in biological specimens*. PSG Publishing, Littleton, Massachusetts, USA, 1988:1-35.
2. Obe G, Anderson D. Genetic effects of ethanol. *Mutat Res* 1987; 186:176-200.
3. Obe G, Rustow H. Mutagenic, cancerogenic and teratogenic effects of alcohol. *Mutat Res* 1979; 65:229-259.
4. Piña A, Madrigal-Bujaidar E, Cassani M. Daño genético producido por bebidas alcohólicas. *Ciencia Desarrollo* 1991; 17: 47-54.
5. Piña A, Madrigal-Bujaidar E. SCE frequencies induced by ethanol, tequila and brandy in mouse bone marrow cells in vivo. *Toxicol Lett* 1993; 66:1-5.
6. Moses JM, Poorman PA, Teppenbergh JH, et al. The synaptonemal complex as an indicator of induced chromosome damage. In: Cold Spring Harbor Laboratory, Ed. *Biology of mammalian germ cell mutagenesis*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1990:113-154.
7. Piña CA, Quezada R, Madrigal-Bujaidar E. Effect of ethanol in the synaptonemal complex of mouse spermatocytes. *Med Sci Res* 1994; 22:185-186.
8. Kofman-Alfaro S, Chandley AC. Meiosis in the male mouse. An autoradiographic investigation. *Chromosoma* 1970; 31: 404-420.
9. Dietrich AJ, Muller RJ. A light microscopic study of the development and behavior of the synaptonemal complex in spermatocytes of the mouse. *Chromosoma* 1981; 83:409-418.
10. Parvinen M, Vinko K, Topari J. Cell interactions during the seminiferous epithelial cycle. *Int Rev Cytol* 1986; 104: 115-155.
11. Kabinskaya Y, Budganor YF, Kolomiets OL, et al. Analysis of chromosome rearrangements on the basis of synaptonemal complexes in the offspring of mice exposed to X rays. *Genetics* 1986; 23:1119-1126.
12. Backer LC, Gibson JB, Moses MJ, et al. Synaptonemal complex damage in relation to meiotic chromosome aberrations after exposure of male mice to cyclophosphamide. *Mutat Res* 1988; 203:317-338.
13. Allen JW, De Weese GK, Gibson JB, et al. Synaptonemal complex damage as a measure of chemical mutagen effects on mammalian germ cells. *Mutat Res* 1987; 190:19-24.
14. Madrigal-Bujaidar E, Rosas A, Ramos A, et al. Mouse bone marrow cytogenetic damage produced by residues of tequila. *Mutat Res* 1990; 241:133-137.
15. Madrigal-Bujaidar E, Calderon R, Díaz Barriga S. Sister-chromatid exchange frequencies induced *in vivo* and *in vitro* by the residues of brandy. *J Toxicol Environ Health* 1991; 32:479-486.
16. Dellarco VI. A mutagenicity assessment of acetaldehyde. *Mutat Res* 1988; 195:1-20.
17. Barilyak IR, Kozachuk SY. Embryotoxic and mutagenic activity of ethanol after intra-amniotic injection. *Tsitol Genet* 1983; 17:57-60.
18. Velazquez N, Mendiola MA, Morales-Ramírez P, et al. Frecuencia del intercambio de cromátidas hermanas producidas por el acetaldehído en espermatogonias de ratón *in vivo*. México: Proceedings, VI Congreso Nacional de Genética; 1995.