

## **PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA**

### **“ALTERACIONES REPRODUCTIVAS EN LA RATA MACHO CAUSADAS POR LA EXPOSICIÓN DIARIA AL 3- METILCOLANTRENO DURANTE LA MADUREZ SEXUAL”**

**CONDEMI, SANTIAGO– LU: 1046233**

Lic. En Biotecnología

Tutor:

**Dra. Faletti, Alicia Graciela CEFYBO – Centro de Estudios Farmacológicos y  
Botánicos (UBA-CONICET). Facultad de Medicina, UBA.**

Co-Tutor:

**Lic. Rhon Calderón Eric Alejandro CEFYBO – Centro de Estudios  
Farmacológicos y Botánicos (UBA-CONICET). Facultad de Medicina, UBA.**

Co-Tutor interno:

**Lic. Cardozo Julián Universidad Argentina de la Empresa (UADE)**

**Octubre 26, 2017**



**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA  
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

## Agradecimientos

A Alicia

A Eric y Rocío

A Marcela y Enzo

A todo el CEFYBO

A mis compañeros de la facu

A Julia

A mis papás

Gracias por su ayuda y el apoyo que me dieron durante todo este trabajo.

## Resumen

En este trabajo, se estudió el efecto del 3-metilcolantreno (3MC), hidrocarburo poliaromático, sobre la fisiología reproductiva de la rata macho y la capacidad de la  $\alpha$ -naftoflavona (ANF), antagonista de receptores de hidrocarburos aromáticos (AhR), de prevenir estos efectos. Para ello, se utilizaron ratas inmaduras diariamente inyectadas con 3MC (0.1 o 1 mg/kg) y/o ANF (80 mg/kg). Se registró periódicamente el peso corporal de los individuos y la retracción del prepucio. Los animales fueron eutanasiados a los 60 días de vida, se evaluó el peso y longitud del testículo y del epidídimo, y se realizaron análisis histológicos del testículo. Además, se determinó la calidad de los espermatozoides a través del recuento espermático, viabilidad, morfología y motilidad. No se encontraron diferencias significativas en el peso de los animales, en los órganos evaluados, en la motilidad de los espermatozoides, ni se observaron alteraciones histológicas entre los distintos grupos experimentales. Sin embargo, los animales tratados con 3MC, expuestos a ambas dosis, presentaron un retraso madurativo evidenciado por la retracción del prepucio. Por otro lado, los animales tratados con 3MC 0.1 mg/kg exhibían disminución significativa en el porcentaje de espermatozoides normales. Los animales solo tratados con ANF, presentaron aumento en el número de espermatozoides respecto a los animales controles, aunque este aumento no resultó significativo. Sin embargo, este antagonista fue capaz de prevenir el aumento en el porcentaje de espermatozoides anormales inducido por 3MC. Dada la dispersión encontrada en algunas determinaciones es necesario continuar con estos estudios, especialmente afinando las técnicas experimentales y aumentando el número de casos. Sin embargo, estos resultados nos indican que (i) la exposición diaria a 3MC durante la pubertad retrasa la maduración sexual y altera la morfología espermática; y (ii) la administración diaria de ANF revierte el efecto del 3MC sobre el retraso de la madurez sexual, a través, al menos en parte, de un mecanismo dependiente de AhR.

## Abstract

In this work we investigated the effect of 3-methylcholanthrene (3MC), a polycyclic aromatic hydrocarbon, on the physiology of the male rat reproductive system and the ability of the  $\alpha$ -naphthoflavone (ANF), an antagonist of aryl hydrocarbon receptors (AhR), to reverse its effect. To this end, sexually immature rats were daily injected with 3MC (0.1 or 1 mg/kg) and/or ANF (80 mg/kg). Body weight and preputial separation were periodically recorded. Animals were killed at 60 days of age and we evaluated the weight and length of testis, the epididymis weight, and the testicular morphology by histological evaluation. We also studied some parameters to determine the quality of the spermatozoa (sperm count, viability, morphology and motility). No differences were found in body and organ weight, sperm motility or changes in the testicular morphology among the different groups. However, animals treated with 3MC, in both doses, exhibited a delayed maturation as evidenced by preputial separation. Moreover, animals treated with 3MC 0.1 mg/kg exhibited a higher percentage of spermatozoa with morphological abnormalities, and the ANF treatment was able to prevent this effect. Since we found an important dispersion in our determinations, further studies are necessary to improve the experimental methodologies and to increase the number of animals. However, these results indicate that (i) daily exposure to 3MC during the pubertal period delay the sexual maturity and alters the sperm morphology; and (ii) daily administration of ANF is able to prevent the 3MC-induced changes, mediated by, at least in part, an AhR-dependent mechanism.

## Contenido

Resumen.....	3
Abstract .....	4
Estructura del informe .....	7
Introducción .....	8
Antecedentes .....	9
Hidrocarburos aromáticos policíclicos.....	9
3-Metilcolantreno .....	11
Receptor de hidrocarburos poliaromáticos.....	12
Flavonoides .....	14
Estructura del testículo .....	16
Epidídimo .....	18
Espermatogénesis.....	19
Onda espermatogénica: estadio y ciclo del epitelio seminífero .....	22
Espermatozoide .....	23
Efectos del 3MC y la ANF sobre la fertilidad en hembras.....	26
Hipótesis y objetivos .....	27
Objetivos específicos: .....	27
Materiales y Métodos .....	28
Animales.....	28
Retracción del prepucio.....	30
Conteo o densidad espermática .....	31
Morfología espermática: .....	31
Motilidad espermática: .....	32
Viabilidad espermática:.....	32
Técnica de la Eosina.....	33
Histología del testículo:.....	35
Análisis Estadístico .....	37

Resultados .....	38
Peso corporal .....	38
Retracción del prepucio.....	39
Peso y longitud de las gónadas.....	40
Recuento espermático .....	41
Morfología espermática.....	42
Motilidad espermática .....	44
Viabilidad espermática.....	44
Histología del testículo:.....	45
Discusión .....	46
Conclusiones: .....	50
Bibliografía: .....	51

## **Estructura del informe**

Este proyecto incluye varios apartados. La introducción, en la que se menciona la relevancia del tema en estudio y se describen los compuestos implicados. La sección siguiente está dedicada a los antecedentes ya publicados sobre el tema. Luego, en la sección de objetivos generales, específicos y la hipótesis, se plantean los interrogantes que buscamos validar con los resultados obtenidos. Seguido a ello se encuentra el apartado de la metodología, donde se describen los materiales, los protocolos y los procedimientos experimentales empleados. A continuación, se presentan los resultados obtenidos en función del análisis estadístico realizado: seguido de la discusión de los mismos y las conclusiones. Finalmente, en la sección bibliografía se citan los trabajos consultados para redactar los antecedentes y la discusión de los resultados de este proyecto.

## **Introducción**

La contaminación ambiental es uno de los problemas más importantes que afecta al planeta, y se refiere de la introducción de sustancias u agentes físicos al medio ambiente, en cantidad tal que provocan alteraciones en la biosfera. Es por ello que, en la actualidad, la protección y conservación del ambiente representa uno de los retos más importantes para la humanidad.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs, por sus siglas en inglés), en su gran mayoría, surgen como subproducto o contaminante de alguna actividad antropogénica y afectan a toda la biosfera. Los PAHs están presentes a lo largo de todo el planeta y la exposición a estas sustancias puede ocurrir en diversas situaciones. Desde el punto de vista toxicológico, el origen más común es el humo del tabaco y los alimentos fritos y asados. Son compuestos persistentes en el ambiente con vida media prolongada por ser químicamente estables y sufrir escasa o nula metabolización, lo que los hace sumamente peligrosos.

Desde la década del 50, la incidencia de la contaminación ambiental sobre la salud reproductiva de los hombres viene aumentando notablemente. Estudios epidemiológicos mostraron que, en regiones industrializadas, los casos de cáncer de próstata y testículo, y las malformaciones reproductivas son cada vez más frecuentes, mientras que otros parámetros, como la calidad del espermatozoide y del semen, disminuyeron notoriamente. Los PAHs pueden ser, en parte, responsables de este deterioro de la salud.



## Antecedentes

### Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) son un extenso grupo de compuestos orgánicos, formados por la fusión de dos o más anillos aromáticos, como bencenos o anillos pentagonales. Muchos de ellos están constituidos únicamente por carbono e hidrógeno creando estos anillos, por lo que también se les conoce como “hidrocarburos polinucleares”. En general, se encuentran formando parte de mezclas complejas y tienen efectos adversos sobre la salud. Muchos de estos PAHs tienen sustituyentes halogenados, tales como cloro o bromo, convirtiéndolos en contaminantes más persistentes aún y más tóxicos.

Muchos de estos compuestos no tienen utilidad y son sintetizados sin ningún fin, ya que en su mayoría se originan como subproducto o contaminante de alguna actividad antropogénica. Gran parte de los PAHs se forman durante la combustión incompleta de sustancias o mezclas como el carbón, petróleo, gasolina, desechos, madera y tabaco. Aquellos hidrocarburos que no son halogenados pueden tener origen al cocinarlos ya que se forman por pirolisis de aminoácidos, ácidos grasos y carbohidratos. Están presentes en los derivados crudos o refinados del petróleo, en productos comerciales como el asfalto, el alquitrán o breas, pesticidas, productos farmacológicos, etc.

Debido a su naturaleza semivolátil, los PAHs pueden estar tanto en fase gaseosa como sólida, dependiendo de su masa molecular (Li *et al.*, 2014). Típicamente, los PAHs que se encuentran en el suelo o en el agua se acumulan por deposición atmosférica o por la utilización de agua en procesos industriales. En general, la exposición no se produce a un solo PAH, sino a mezclas. Se considera que la principal fuente de exposición humana a los PAHs es la alimentación, ya sea por la formación de PAHs durante la cocción o por contaminación ambiental de los alimentos. Desde el punto de vista toxicológico, el origen más común es el humo del tabaco o los alimentos fritos y asados.

Si bien estos contaminantes poseen distintas características y potenciales tóxicos, la mayoría de ellos comparten similares propiedades:

- Son persistentes en el ambiente con vida media prolongada por ser químicamente estables y sufrir escasa o nula metabolización
- Son poco hidrosolubles y altamente lipofílicos, especialmente aquellos que presentan masas moleculares elevadas por lo que tienen gran capacidad de almacenarse en el tejido adiposo, exhibiendo bioacumulación
- Tienen gran capacidad de acumularse en la cadena alimentaria, exhibiendo biomagnificación
- Producen efectos nocivos sobre la salud.

Existen más de cien PAHs en el ambiente y generalmente se encuentran en forma de mezclas complejas (Mumtaz *et al.*, 1996). Dieciséis PAHs están incluidos dentro de los 129 contaminantes ambientales de mayor importancia según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (Keith y Telliard *et al.*, 1979), de los cuales algunos de ellos son carcinogénicos (Denissenko *et al.*, 1996; Boström *et al.*, 2002). Dentro de los PAHs más estudiados se incluyen los derivados del pireno como el Benzo(a)pireno (BaP) y derivados del antraceno como el 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA). En este trabajo en particular, nos centraremos en el estudio del 3-metilcolantreno desde el punto de vista toxicológico.

La mayoría de estos compuestos, halogenados o no, producen respuestas biológicas y/o tóxicas por interactuar con receptores específicos denominados receptores de hidrocarburos aromáticos (AhR) (Carlson y Perdew, 2002; Deninson y Nagy, 2003; Fujii-kuriyama y Mimar, 2005). Muchos de estos compuestos se comportan como “disruptores endócrinos” por múltiples mecanismos dependientes o no del AhR. Se denomina disruptor endocrino a todo agente exógeno que produce efectos adversos sobre la salud en un organismo vivo o en su progenie, como consecuencia de cambios en alguna función endócrina. Puede interferir con la síntesis, secreción,

transporte, metabolismo, unión, acción o eliminación de las hormonas en el organismo que son responsables de los procesos de homeostasis, reproducción y desarrollo. (Kavlock *et al.* 1996).

Muchos reportes de las últimas dos décadas afirman que el aumento de la exposición a este tipo de sustancias ha generado una reducción significativa en la capacidad reproductiva masculina (Andersson *et al.*, 2008; Carlsen *et al.*, 1992; Jouannet *et al.*, 2001; Safe 2012).

### **3-Metilcolantreno**

El 3-metilcolantreno (3MC) es una sustancia color amarillo pálido que se cristaliza del benceno y el éter. Su fórmula química es  $C_{21}H_{16}$ , su masa molar es de 268.35 g/mol y tiene un punto de fusión de 180 °C. Se lo utiliza en la investigación bioquímica como agente carcinógeno experimental. Es un importante xenobiótico (exógeno) con importantes efectos adversos sobre los organismos vivos, por lo que se lo encuentra en la Lista Especial de Sustancias Peligrosas para la Salud confeccionada para los Estados Unidos y citado por su potencial carcinógeno y mutágeno.

El 3MC puede generarse por pirólisis del colesterol o fitoesteroles durante la cocción de alimentos, o por la combustión incompleta de materiales orgánicos (Fieser y Fieser, 1949; Köller, 1964; Rodgman y Perfetti, 2013). Es por ello que, la combustión del tabaco es considerada una fuente usual de exposición al 3MC (Rodgman y Cook, 2009; Pleil *et al.*, 2010). Asimismo, puede ser sintetizado por compuestos derivados de esteroides con estructura similar al colesterol.

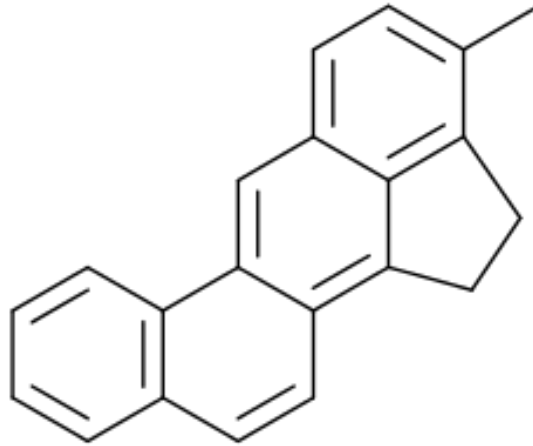


Figura 1: Estructura química del 3-metilcolantreno

### Receptor de hidrocarburos poliaromáticos

Como ya mencionamos, la mayoría de los PAHs causan una respuesta tóxica en diferentes organismos a través del AhR. AhR es un factor de transcripción activado por ligando, y es la primera proteína implicada en la cascada de señalización que induce la expresión de diferentes genes, incluyendo aquellos que codifican para las enzimas capaces de metabolizar los xenobióticos (Hahn, 2002; Shimada, 2006). La transducción de señales originadas por la activación de este receptor también puede culminar en una alteración en los procesos de desarrollo embrionario, mantenimiento del embarazo, función ovárica, diferenciación celular (Hernández-Ochoa *et al.*, 2009). Debido a que estos receptores están bien conservados en muchas especies, desde invertebrados a vertebrados (Hahn, 2002), se cree que juegan un rol fundamental en varios procesos fisiológicos de organismos superiores y que podrían estar afectando directamente a nuestra especie.

Los ligandos de este receptor pueden ser compuestos naturales o sintéticos. Muchos PAHs han sido identificados como ligandos del receptor AhR y aunque estos ligandos posean diferentes estructuras, comparten similares características: i) Tamaño, ii) Estructura planar y iii) Carácter hidrofóbico. Se cree que estas características están implicadas en la afinidad del ligando

por el AhR (Esser *et al.*, 2009). Estos ligandos, agonistas o antagonistas, deben ingresar a la célula atravesando la membrana plasmática y unirse al AhR en el citoplasma, donde se encuentra asociado a distintas proteínas, entre ellas dos proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas del inglés Heat-shock protein) de unos 90-kDa denominada (HSP90) (Perdew, 1988; Denis *et al.*, 1988), una proteína de 38 kDa tipo inmunofilina, P23 y la tirosina quinasa c-SRC (Carver *et al.*, 1997; Ma y col 1997; Meyer *et al.*, 1998). La unión al ligando causa un cambio conformacional que se presume que expone una señal de localización nuclear presente en AhR resultando en la translocación de todo el complejo al núcleo (Pollenz *et al.*, 1994). Dentro del núcleo, el complejo AhR-ligando se disocia de las proteínas asociadas y se dimeriza con el translocador nuclear del AhR (ARNT) (Reyes *et al.*, 1992), formando un factor de transcripción activo que se une a elementos reguladores denominados elementos de respuesta a xenobióticos (XRE, por sus siglas en inglés), situados en regiones promotoras de ciertos genes blanco incrementando la transcripción de los mismos (Denison *et al.*, 1988), o suprimiendo la expresión de otros genes blancos (Tijet *et al.*, 2006) (Figura 2). Los principales genes blanco para el AhR codifican para enzimas implicadas en la detoxificación de xenobióticos, tanto de la fase I (en general pertenecientes a la familia del citocromo P450 denominadas CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1) como de la fase II (NADPH-quinona oxireductasa; aldehído deshidrogenasa 4, UDP-glucuronosiltransferasa 1A6, glutatión-S-transferasa, etc.) (Denison *et al.*, 1988; Nebert *et al.*, 1993). Estos elementos se encuentran presentes en muchos genes que, entre otros, codifican para canales iónicos y transportadores de membrana (Boutros *et al.*, 2004). La activación de AhR también parece intervenir en procesos independientes de la transcripción genómica, activando proteínas quinasas y entrada de iones calcio, todo a nivel citoplasmático. Otros tipos de respuestas originadas por la unión de ligandos a los receptores AhR pueden ser la alteración de la homeostasis endocrina, la interferencia con la proliferación y la diferenciación celular, por lo que estas respuestas están asociadas a efectos adversos para la salud (Poland y Knutson, 1982; Safe, 1986; Peterson *et al.*, 1993)

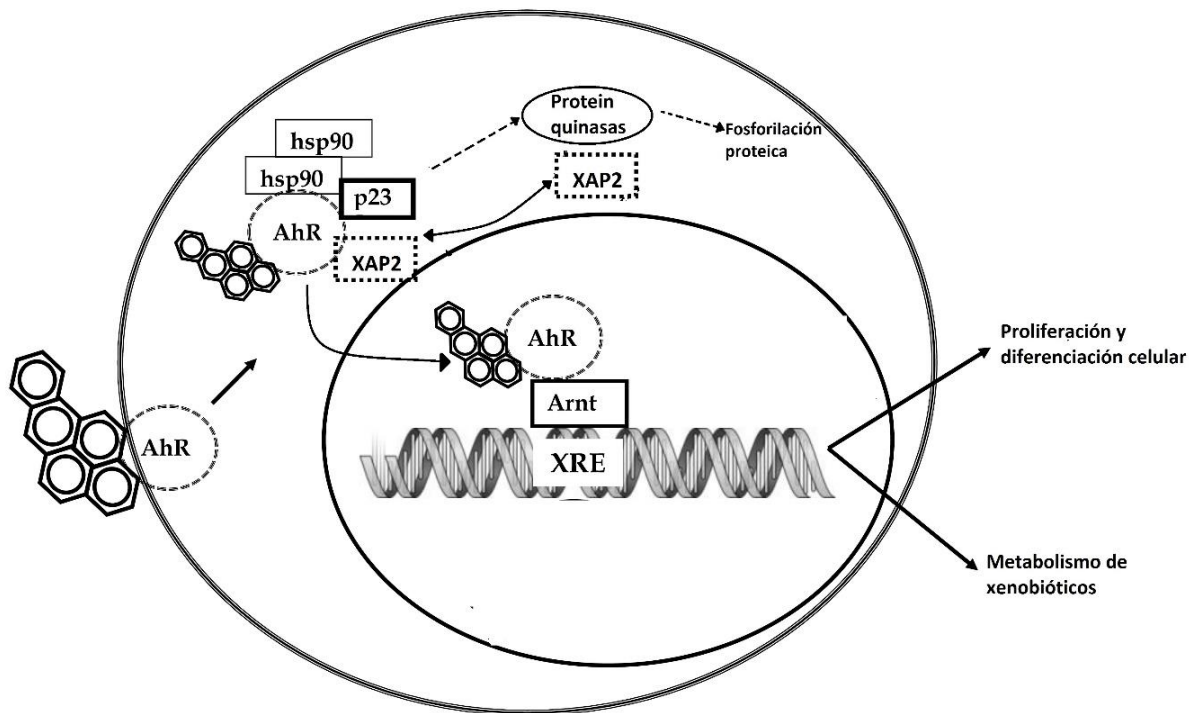


Figura 2: La unión del AhR al ligando promueve la translocación al núcleo y la disociación de las proteínas acopladas al AhR sin ligando, seguida por la dimerización con ARNT. El heterodimero (AhR-Ligando) también puede ejercer sus efectos en el citoplasma por medio de proteínas quinasas que alteran la función de varias proteínas a través de una cascada de fosforilación proteica o a través de un estímulo en la entrada de iones calcio. (modificado de: Androutsopoulos VP. *et al.*, 2009)

### Flavonoides

Los Flavonoides son hidrocarburos aromáticos policíclicos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de piranos, compuesto por dos anillos fenilo (A y B) ligados a través de un anillo del tipo pirano (C) (heterociclo) (Martínez-Flores *et al.*, 2002) (Figura 3). Naturalmente los flavonoides se encuentran distribuidos en gran parte del reino vegetal. Se los

puede encontrar en vegetales, frutas, tés, vinos, etc. Estos compuestos tienen la capacidad de actuar como antioxidantes (Bors *et al.*, 1990), muchos de los cuales poseen actividad citostática, antiangiogénica (Ferrandiz, 1991; Onwukaene, 1995), estrogénica (Breinholt y Larson, 1998) y pueden modular la expresión y la actividad de distintas enzimas específicas pertenecientes a la familia de citocromo P450 (Lu *et al.*, 1995, Lu *et al.*, 1996; Zhai, 1998). También se ha reportado que estos compuestos tienen actividad antibacteriana y antialérgica, son capaces de inhibir la peroxidación de lípidos y regular sistemas enzimáticos por ser antioxidantes.

Muchos flavonoides son ligandos del AhR y son capaces de producir distintos efectos según la concentración en que se encuentran (Lu *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 1996). Este tipo de compuestos pueden actuar como agonistas o antagonistas del receptor. Por lo general a los niveles en los que se los incorpora en la dieta tienen tendencia a ser antagonistas.

En particular, los flavonoides sintéticos  $\beta$ -naftoflavona (7,8-benzoflavona) (BNF) y  $\alpha$ -naftoflavona (5,6-benzoflavona) (ANF) (figura 3) pueden actuar como agonistas o antagonistas del AhR en distintos sistemas (Merchant *et al.*, 1993; Merchant y Safe, 1995; Brauze *et al.*, 1997; Navas y Segner, 2000; Huang *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2002; Henry *et al.*, 2003; Granberg *et al.*, 2003).

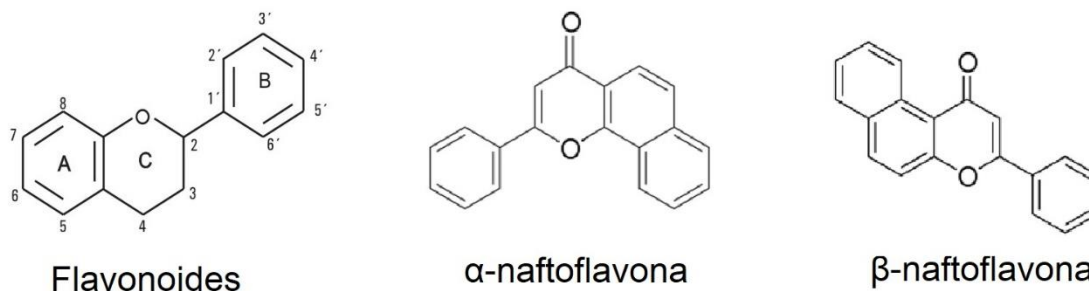


Figura 3: Ejemplo de flavonoides

## Estructura del testículo

El testículo es un órgano altamente especializado que cumple principalmente dos funciones: la generación de gametas masculinas y la producción de hormonas esteroideas sexuales, mayoritariamente andrógenos. Son órganos pares localizados en el escroto por fuera de la cavidad abdominal, sitio cuya temperatura es de 34-35°C, para permitir la espermatogénesis. La superficie posterior del testículo maduro está asociada al epidídimo. El testículo y el epidídimo se encuentran suspendidos en el interior del escroto mediante un cordón espermático, que contiene el conducto deferente, la arteria espermática y los plexos venosos y linfáticos.

El testículo está rodeado por una cápsula de tejido conectivo llamada túnica albugínea y se encuentra dividido en lobulillos que contienen a los túbulos seminíferos (TS). Los TS tienen forma de “U”, están muy enrollados y sus dos extremos desembocan en la rete testis mediante los túbulos rectos. La rete testis es una red de conductos que recogen los productos del epitelio seminífero (Ross y Pawlina, 2007; Kierszenbaun, 2008).

Los TS están constituidos por una luz central y el epitelio seminífero compuesto por dos poblaciones celulares distintas: las células de Sertoli y las células germinales (espermatogonias, espermatocitos y espermátides) (Figura 4). Las uniones intercelulares entre células de Sertoli vecinas conforman la barrera hemato testicular, compuesta por uniones estrechas, comunicantes y adherentes. Dichas uniones están formadas por proteínas integrales de membrana y proteínas asociadas. El epitelio seminífero se encuentra rodeado por una membrana basal y una pared formada por fibras de colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular, junto con células peritubulares (células mioideas contráctiles). Las células peritubulares que rodean a los TS, proveen soporte estructural y la actividad rítmica contráctil necesaria para transportar a los espermatozoides y al líquido testicular a lo largo de los TS y de la rete testis en su camino hacia el epidídimo. El espacio intersticial está compuesto principalmente por fibroblastos, vasos sanguíneos y linfáticos, agregados de células de Leydig (productoras de andrógenos), macrófagos, mastocitos, escasos



linfocitos, células dendríticas y células “natural killer” (NK) (Ross y Pawlina, 2007; Kierszenbaun, 2008).

Los andrógenos son sintetizados por las células de Leydig, localizadas en el intersticio testicular. Esta hormona es la principal responsable de sustentar el proceso de espermatogénesis y del mantenimiento del estado diferenciado de las glándulas accesorias, así como de la manifestación de los caracteres sexuales secundarios.

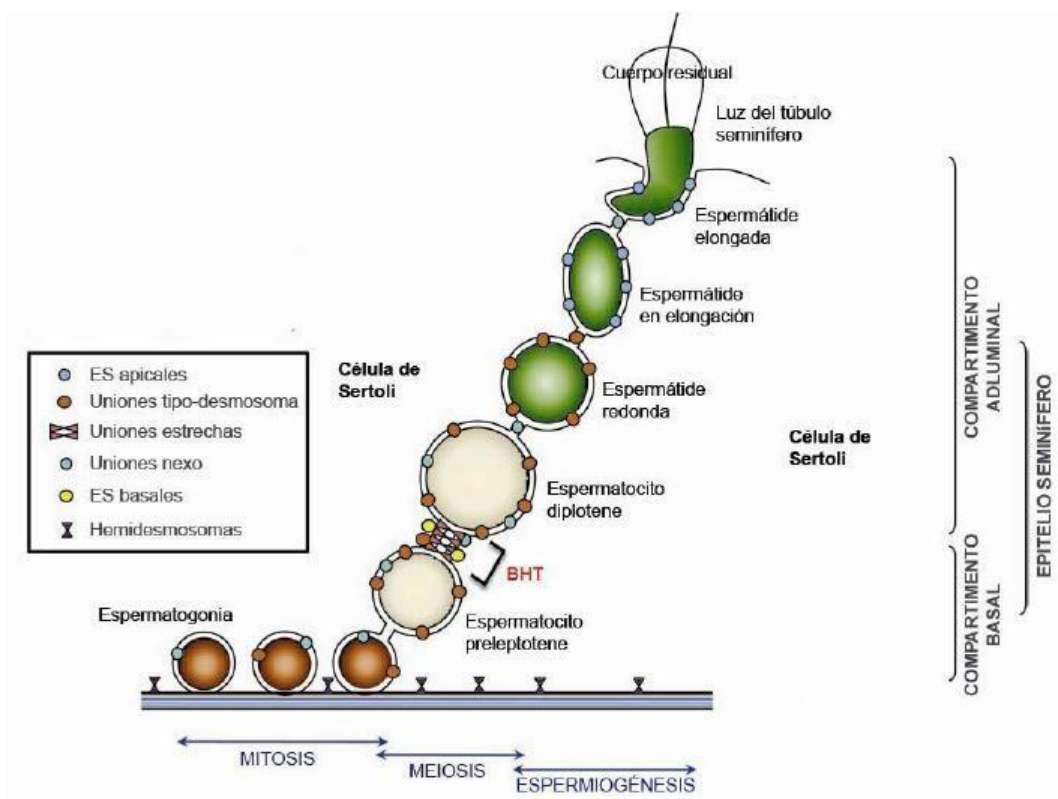


Figura 4: Epitelio seminífero de una rata adulta

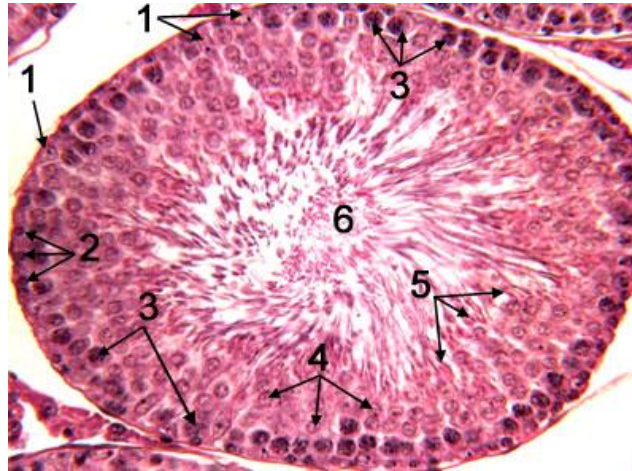


Figura 5: Corte transversal de un túbulo seminífero de rata a un aumento de 400X. Se observan; 1. Células de Sertoli, 2. Espermatogonias, 3. Espermatocitos primarios, 4. Espermátides tempranas, 5. Espermátides tardías, 6. Luz del túbulo seminífero.

El sistema de conductos sexuales comienza en la rete testis, aún dentro del testículo, y continúa con los conductos eferentes que comunican ésta con el epidídimo. Este último órgano se continúa con el conducto deferente.

### **Epidídimo**

El rol del epidídimo es importante en la fisiología del macho, ya que en él los espermatozoides se concentran y a medida que son transportados en su interior van experimentando la maduración espermática. El epidídimo aporta las secreciones y regula el tiempo necesario para que el espermatozoide inmaduro, que abandona el testículo, se convierta en una célula madura con capacidad de fertilización del oocito. Los procesos de resorción que tienen lugar en el epidídimo pueden igualmente modificar al espermatozoide de forma que pueda interaccionar con las diferentes secreciones circundantes. Durante su tránsito por este órgano, los espermatozoides desarrollan su capacidad de fertilización pudiéndose encontrar, en el cuerpo del epidídimo, poblaciones de espermatozoides con capacidad de penetrar los oocitos correspondientes. Finalmente, una vez que los espermatozoides alcanzan la región distal del epidídimo, son

almacenados hasta el momento de la eyaculación. El epitelio que recubre el epidídimo es pseudoestratificado. El sistema de conductos se continúa con el conducto deferente, el cual comunica la región distal del epidídimo con la primera región de la uretra.



Figura 6: Diferente secciones del epidídimo de una rata.

### Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso que se inicia durante el período embrionario a partir de la diferenciación de las células germinales primordiales (CGPs). En roedores, estas células pueden observarse en el epiblasto del embrión bilaminar, en el día 6 del desarrollo embrionario y migran por el mesodermo que rodea al saco vitelino hasta arribar e infiltrarse en la cresta gonadal en desarrollo en el día 11 (McLaren, 1998). Luego, las CGPs se asocian con las células de Sertoli para formar los cordones seminíferos que constituirán, en última instancia, los TS. Las CGPs atraviesan por un período de divisiones mitóticas al final del cual se denominan proespermatogonias. Las proespermatogonias entran en un período de quiescencia hasta el nacimiento. Las proespermatogonias localizadas en la región central de los cordones seminíferos

migran hacia la región basal de los mismos durante los primeros días luego del nacimiento. Durante el proceso de migración, las células experimentan cambios transicionales que resultan en la presencia de espermatogonias morfológicamente diferentes que se localizan hacia la región basal de los TS.

Las proespermatogonias o espermatogonias A simples (As), que se encuentran en la región basal de los TS, proliferan por divisiones mitóticas sucesivas y luego se diferencian para dar origen a un subtipo particular de espermatogonia A que es la que va a continuar con la espermatogénesis a partir de la pubertad. La población de espermatogonias As es considerada como la población de células madre espermatogoniales (SSC) y constituyen la fuente de renovación de las células germinales del testículo. De hecho, la eliminación de esta población celular por radiación, por ejemplo, conduce a una pérdida irreversible de la capacidad espermatogénica del testículo. Es de notar que la población de SSC del testículo sólo puede ser identificada por su potencialidad de restablecer y mantener la espermatogénesis luego de ser trasplantadas a un testículo receptor, ya que no existen marcadores específicos para dichas células (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2006). Luego de dividirse por mitosis, las espermatogonias As se diferencian sucesivamente y proliferan pasando por estadios A1, A2, A3, A4, intermedia y de tipo B (Figura 7). Estas últimas dan origen al espermatocito pre-leptoténico, célula que inicia la meiosis. La primera división meiótica da origen a los espermatocitos II que pasan rápidamente por la meiosis II dando origen a las espermatídes redondeadas haploides. Las espermatídes haploides sufren un complejo proceso de diferenciación llamado espermiogénesis, que paulatinamente las transforma en espermatozoides (Rusell *et al.*, 1990).

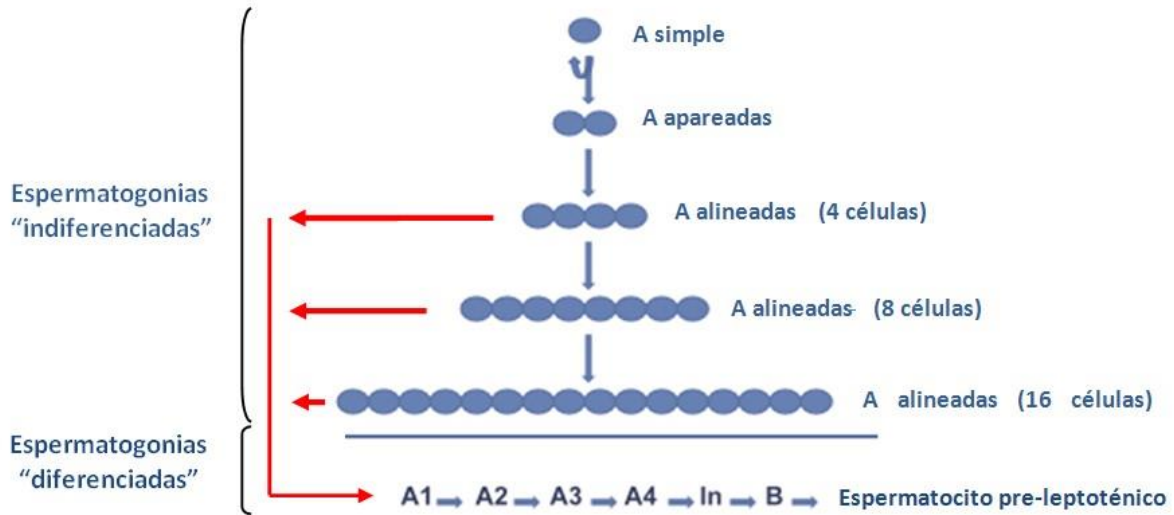


Figura 7: Proliferación y diferenciación de las espermatogonias. Las flechas azules indican divisiones mitóticas y las rojas diferenciación celular. Modificado de Rooij et al., 2012.

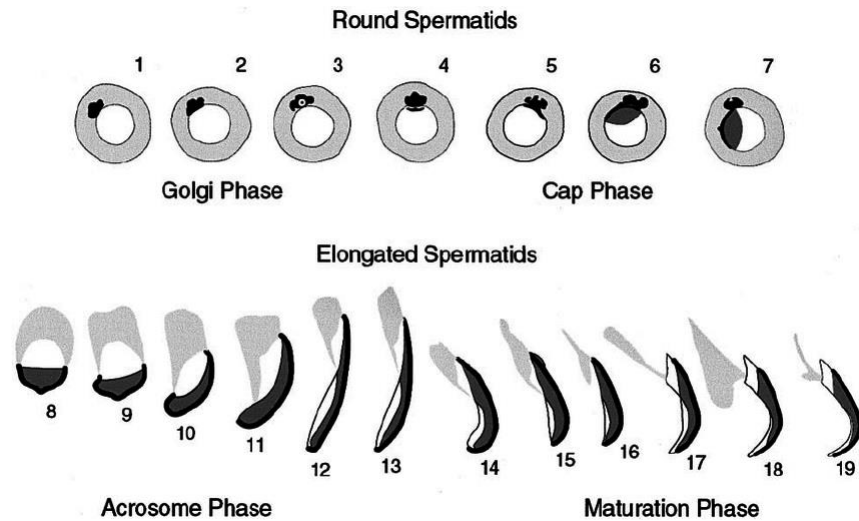


Figura 8: Este diagrama ilustra las 19 etapas de la espermiogénesis en rata, proceso en el cual una espermátide se transforma en un espermatozoide. El acrosoma se va formando gradualmente durante cuatro fases como indica la figura. Las etapas varían según la especie, en este caso, la espermátide de una rata pasa por 19 etapas antes de convertirse en un espermatozoide, pero por ejemplo en el caso del humano solo se distinguen 6 etapas. (Leblond and Clermont (1952))

### **Onda espermatogénica: estadio y ciclo del epitelio seminífero**

El análisis histológico de cortes transversales del testículo murino revela la presencia de asociaciones de células germinales que se encuentran periódicamente juntas. Estas asociaciones celulares frecuentes constituyen un proceso cíclico conocido como el ciclo del epitelio seminífero, término que fue utilizado por primera vez por LeBlond y Clermont en 1952. En 1972, Clermont estableció que, para una dada especie, cada etapa de la espermatogénesis posee una duración constante, por lo que, la diferenciación de las células germinales debería estar regulada por un programa de tiempo fijo y secuencial. Un estadio del ciclo ocupa un segmento lineal a lo largo del TS, representando un área que contiene asociaciones celulares similares. Los estadios se representan, numéricamente, de forma adyacente en una secuencia lineal a lo largo del TS. Este arreglo espacial de los estadios a través de la longitud de los TS constituye la onda del epitelio seminífero. Clermont (1972) definió la onda del epitelio seminífero como la serie completa de asociaciones celulares sucesivas que se encuentran a lo largo del TS.

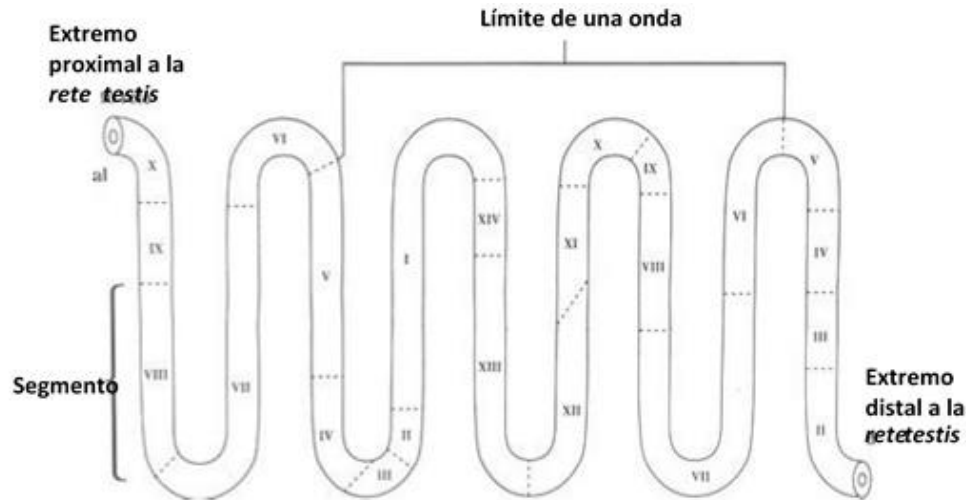


Figura 9: Estadios del epitelio seminífero y la onda espermatogénica. Esquema de una sección longitudinal de un tubo seminífero (TS) de rata, mostrando los estadios designados con números romanos. Los estadios ocupan segmentos discretos en el TS y se ubican en orden descendente desde la rete testis. Cuando se alcanza el final de la serie en el estadio I, ésta comienza nuevamente de forma descendente a partir del estadio XIV. En el esquema se representa una única onda completa del epitelio seminífero. Modificado de Russell *et al.*, 1990.

### Espermatozoide

Un espermatozoide es una célula haploide que constituye el gameto masculino. Es una de las células más diferenciadas y su función es la formación de un cigoto totipotente al fusionarse su núcleo con el del gameto femenino, fenómeno que dará lugar, posteriormente, al embrión y al feto. Se compone principalmente de dos partes: una cabeza y su flagelo, pero dentro de ellas podemos distinguir varias estructuras, que, en orden de la cabeza a la cola, son: acrosoma, núcleo, membrana, cuello, pieza media, cola y pieza terminal.

La cabeza contiene dos partes principales: i) una vesícula que cubre los dos tercios anteriores de la cabeza y contiene enzimas hidrolíticas como la hialuronidasa, y ii) la acrosina y neuraminidasa que facilitan el paso del espermatozoide a través de la envoltura externa del oocito.



Por otro lado, se encuentra el núcleo, que contiene el material genético fuertemente empaquetado, de modo que su volumen queda reducido al mínimo facilitando el transporte y no permitiendo la transcripción. El núcleo y el acrosoma están rodeados de una pequeña cantidad de citoplasma y revestidos por una membrana plasmática que une la cabeza al cuerpo del espermatozoide. Esta membrana tiene altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados que son los responsables de la movilidad del espermatozoide.

La cabeza de los espermatozoides de mamíferos presenta importantes variaciones en la forma entre las diferentes especies. Por ejemplo, es ovoide y discoidal en conejo, toro y cerdo, falciforme en ratón, rata y hámster, y algo aplanado y elipsoide en el hombre (Lizarazo, 2009). En cuanto al tamaño, también existen considerables diferencias (Cummins y Woodall, 1985; Eddy, 2006), mientras que el espermatozoide humano presenta 5-6  $\mu\text{m}$  de longitud y 2,5-3,5  $\mu\text{m}$  de ancho (WHO, 1999), el de la rata tiene 11,7  $\mu\text{m}$  de longitud. Aunque en general se podría aceptar que la mayoría de los mamíferos presentan una población espermática morfológicamente homogénea (Gago et al., 1999).

La cola del espermatozoide se divide en cuatro regiones: cuello, pieza intermedia, pieza principal y pieza terminal. El cuello conecta a la cabeza con el resto de la cola, y está compuesto por un arreglo cilíndrico de nueve columnas de la pieza conectora que rodea a los dos centríolos. Por su parte, la pieza intermedia, se ubica entre el cuello y la pieza principal. Ésta se caracteriza por la presencia de una cubierta de mitocondrias que envuelven a las fibras densas externas y al axonema de ubicación más central. La pieza intermedia termina en el anillo, estructura densa a la que se adhiere el plasmalema y previene el desplazamiento caudal de la cubierta mitocondrial. También, a nivel del anillo terminan dos de las nueve fibras densas y las siete restantes se continúan hacia la pieza principal. La pieza principal del espermatozoide es el segmento más largo de la cola que se extiende desde el anillo hasta la pieza final. El axonema está rodeado por las siete fibras densas externas, que se continúan con las de la pieza intermedia y quedan rodeadas, a su vez, por la vaina fibrosa. La pieza principal disminuye de grosor cerca de la



extensión caudal, sitio en el que terminan las fibras densas externas y la capa fibrosa, y se continúa con la pieza terminal. Por último, la pieza terminal está constituida por el axonema central rodeado por el plasmalema.

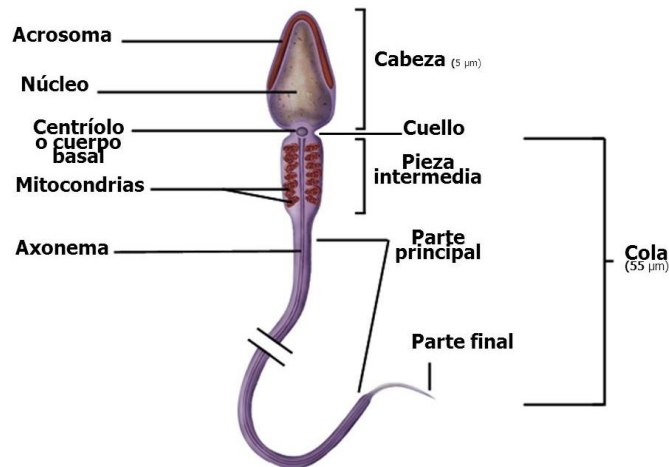


Figura 11: Partes del espermatozoide

Existen numerosos trabajos de investigación que revelan la importancia de la morfología y su asociación con la motilidad espermática. Por ejemplo, algunas anomalías morfológicas han sido asociadas con una fertilidad reducida. Asimismo, cualquier defecto morfológico debido a un proceso de maduración espermático incompleto (defectos en la cola o pequeñas diferencias geométricas en la cabeza) puede originar a su vez un movimiento anormal que incapacite al espermatozoide para su progresión en el aparato genital femenino y la posterior fecundación (Dresdner y Katz, 1981). La morfología espermática ha sido determinada mediante numerosas técnicas, aunque el método más sencillo corresponde a la fijación de una muestra espermática con soluciones de formaldehído o glutaraldehído y el posterior conteo de espermatozoides mediante microscopía de contraste de fases (Björndahl *et al.*, 2002; Briz *et al.*, 1995; Pinart *et al.*, 1999; WHO, 1999). También puede hacerse utilizando técnicas de tinción para hacer valoraciones bajo microscopía de campo claro. Entre los métodos de tinción más empleados

se incluyen la eosina-negrosina (Colas, 1980), el trypan azul y solución Giemsa (Kusunoki *et al.*, 1988).

### **Efectos del 3MC y la ANF sobre la fertilidad en hembras**

Muchos estudios previos demostraron que alteraciones en la funcionalidad del AhR alteran el desarrollo folicular de ratas hembras (Benedict *et al.*, 2000, 2003; Barnett *et al.*, 2007; Hernández-Ochoa *et al.*, 2010). Mattison y Thorgeirsson (1979) encontraron que los folículos primordiales de ratones se destruían por la administración de DMBA, BaP o 3MC, todos ligandos del AhR. Sin embargo, la coadministración de ANF previno este efecto. Por otro lado, en trabajos previos, se demostró que elevadas dosis de ANF (80 mg/kg) induce el desarrollo folicular en ratas (Thompson *et al.*, 2005; Barreiro *et al.*, 2011)

Investigaciones previas del laboratorio observaron que la exposición diaria de ratas a bajas dosis del 3MC, durante la pubertad, destruye los folículos primordiales y altera la madurez sexual de las hembras por interferir con el desarrollo folicular y la ovulación. Además, este PAH también generó daño genético, ya que encontraron un aumento importante en la presencia de micronúcleos en células de médula ósea y un porcentaje alto de degradación genética en oocitos. Todos estos efectos fueron prevenidos por la coexposición a ANF por lo que los efectos del 3MC parecen ser mediados por un mecanismo dependiente del AhR. Por lo tanto, los autores concluyeron que la presencia de esta isoflavona previene tanto la toxicidad sistémica como gonadal causada por el 3MC.

## Hipótesis y objetivos

La mayoría de los estudios realizados hasta hoy se basaron en los efectos que producen tratamientos agudos o crónicos sobre el sistema reproductor femenino. Otros han enfocado sus estudios desde el punto de vista oncogénico donde se evaluó la incidencia o mecanismos de inducción de tumores a largo plazo después de una única o repetidas exposiciones.

Basándonos en los antecedentes mencionados, nuestra hipótesis para esta tesis de licenciatura fue que *la exposición diaria de ratas machos a bajas dosis de 3MC, que no generen toxicidad sistémica, compromete severamente la reproducción futura*. Para ello nuestro objetivo fue: *Estudiar las alteraciones reproductivas generadas, a nivel testicular, por exposición diaria al 3-metilcolantreno durante la madurez sexual*.

### Objetivos específicos:

*Preparación del modelo biológico*: consistió en la administración diaria de dos dosis de 3MC en combinación con una isoflavona sintética, ANF, a ratas machos mediante inyección intraperitoneal. Una vez finalizado el tratamiento, los animales fueron eutanasiados para extraer las muestras correspondientes (testículos, epidídimo) previa observación de los tejidos restantes.

*Examen de los parámetros reproductivos*: una vez obtenidos los testículos y epidídimos se procedió a examinar los parámetros reproductivos inherentes a estos tejidos.

*Análisis histológico*: después de la observación y examen de los parámetros reproductivos se procedió al análisis histológico de los tejidos que consistió en i) preparación del taco del tejido; ii) obtención de los cortes histológicos; y iii) evaluación histológica de los cortes.

## **Materiales y Métodos**

### **Animales**

Se adquirieron ratas machos y hembras adultas de la cepa Sprague Dawley en el bioterio de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Buenos Aires. Una vez adaptadas al bioterio del Instituto CEFyBO, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires (UBA), se las colocó en apareo y a los 15 días de gestación se las separó en jaulas individuales. Se dejaron 10 crías con cada madre para una nutrición homogénea. El destete se realizó a los 21 días de edad y se las agrupó en jaulas apropiadas para comenzar los tratamientos.

Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de luz (14 horas de luz: 10 horas de oscuridad), temperatura (19-23 °C) y humedad (45-65%), y libre acceso a comida y agua fresca, en el bioterio del CEFyBO. La manipulación de los animales y los experimentos fueron realizados bajo las normas internacionales de cuidado y uso de animales de laboratorio, provistas por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina (UBA), siguiendo la “Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio” (National Institute of Health). La eutanasia de todos los animales se realizó por decapitación con guillotina.

### Diseño experimental

Se utilizaron ratas machos inmaduros inyectadas diariamente (alrededor del mediodía) con los agentes mencionados en forma intraperitoneal tal de obtener los siguientes grupos experimentales:

- Ratas tratadas con 3MC: se les inyectó 3MC (0.1 o 1.0 mg/kg de peso) por 20 días comenzando el día 22 de nacidas
- Ratas tratadas con ANF: se les inyectó ANF (80 mg/kg de peso) por 21 días comenzando el día 21 de nacidas
- Ratas tratadas con 3MC y ANF: se les inyectó 3MC y ANF con el mismo esquema y dosis de los grupos anteriores
- Ratas controles: se les inyectó el vehículo (aceite de maíz) utilizado para disolver los agentes mencionados comenzando el día 22 de nacidas.

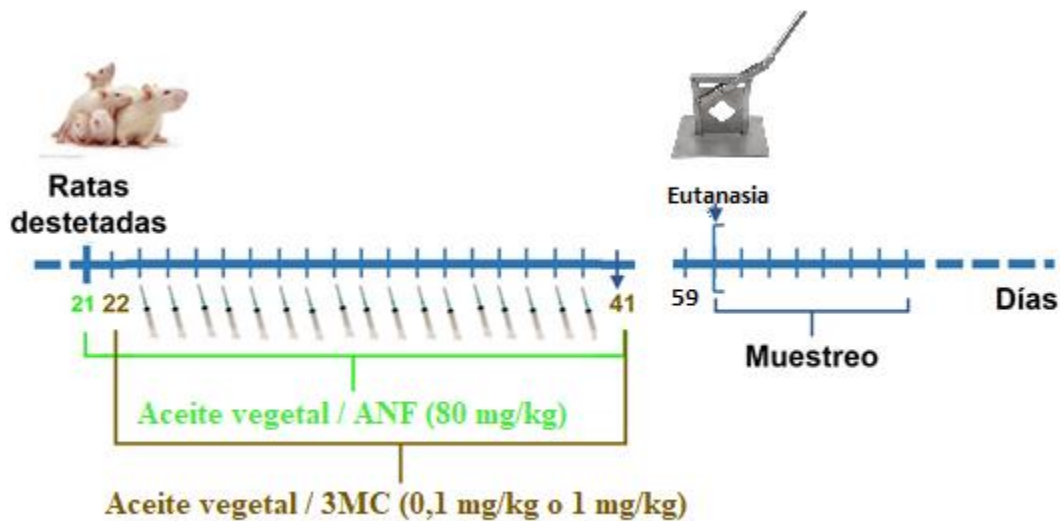


Figura 12: Modelo biológico utilizado: Ratas inmaduras tratadas con vehículo, 3MC, ANF, o ambos agentes.

El tratamiento con ANF comenzó un día antes que el tratamiento con 3MC para disponer del bloqueo de los receptores AhR ya que en trabajos previos se comprobó que 80 mg/kg es la dosis efectiva como antagonista. El volumen administrado en todos los animales no superaba los 0.2 ml.

Se realizó el seguimiento del peso corporal diario y a partir del día 33 se examinó el nivel de retracción del prepucio. A los 60 días de edad, momento en el cual se considera que los machos están reproductivamente maduros, los animales fueron eutanasiados mediante decapitación con guillotina. Se extrajeron ambos testículos con sus epidídimos y cada órgano se procesó según el ensayo a realizar. Inmediatamente después se registró el peso y la longitud de los testículos y epidídimos.

### **Retracción del prepucio**

Debido a que la retracción del prepucio es un indicador de la madurez sexual del animal, a partir del día 33 de vida del animal se examinó diariamente el estado del prepucio con el objeto de determinar el día de la separación o retracción completa. Según antecedentes previos, la separación definitiva ocurre entre los días 50 y 55 en esta colonia de animales (Korenbrodt *et al.*, 1977; Vetter-O'Hagen y Spear 2012).

### **Conteo o densidad espermática**

Un epidídimo de cada animal se colocó en una caja de Petri con 3 ml de buffer fosfato salino (PBS) conteniendo 1.3 mM  $\text{CaCl}_2$  y 1 mM  $\text{MgCl}_2$  y luego de 15 minutos en estufa a 37 °C se abrió la cola del epidídimo utilizando un bisturí para liberar los espermatozoides de su interior. Se dejaron otros 15 minutos para la completa liberación de los espermatozoides. Con una alícuota de la suspensión homogénea de espermatozoides se procedió al recuento celular en cámara de Neubauer bajo microscopio. Los resultados se expresaron en número de espermatozoides por unidad de volumen (millones de células/ml) (Kempinas y Lamano-Carvalho 1988).

### **Morfología espermática:**

La evaluación morfológica del espermatozoide se considera esencial para la evaluación de la calidad de las células germinales masculinas (Trivedi *et al.*, 2010). Por lo tanto, se tomó una alícuota de la suspensión homogénea de espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo diseccionado previamente y se los tiñó con una solución Giemsa al 3% para el análisis morfológico bajo microscopio óptico. Primeramente, se registró el número de espermatozoides normales y aquellos con alguna anomalía y luego se clasificaron las anomalías encontradas en las siguientes categorías: espermatozoide con cabeza amorfa, sin cabeza, sin flagelo, con dos cabezas, o doble flagelo. Se registraron alrededor de 300 espermatozoides por animal.

**Motilidad espermática:**

Otra alícuota de la suspensión homogénea de espermatozoides se colocó en un portaobjetos a 37 °C. En casos en los cuales la concentración celular era muy elevada e impedía realizar un seguimiento individual del movimiento de cada célula, se realizaron diluciones con la misma solución de PBS a 37°C para obtener una concentración que permita analizar sin dificultad la muestra. Se observó bajo microscopio y se filmaron videos de distintos campos de las muestras. Posteriormente, se analizaron dichos videos dividiendo el campo en cuatro cuadrantes y contabilizando células móviles y no móviles. Finalmente, el resultado se informó en porcentaje de células móviles respecto del total.

**Viabilidad espermática:**

Partiendo de la suspensión de espermatozoides ya mencionada la viabilidad celular se analizó mediante la utilización de colorantes excluyentes. Para ello se utilizó una solución de anexina V conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (para detectar apoptosis temprana y luego la combinación de los reactivos, yoduro de propidio (50  $\mu$ g/ $\mu$ l) y Hoechst 33258 (10  $\mu$ g/ml), para distinguir células muertas o vivas. También se realizó otro ensayo utilizando eosina amarilla, siguiendo el protocolo de la OMS (Organización Mundial de la Salud).



### Técnica de la Eosina

Se utilizó una solución de eosina que contenía: 0,67 g de Eosina “Y” y 0,9 g de NaCl en 100 ml de agua destilada y se realizó por duplicado. Para ello se mezclaron 5  $\mu$ l de la solución de espermatozoides anterior con 5  $\mu$ l de la solución de eosina en un portaobjetos y se lo cubrió con cubreobjetos. Luego de 30 segundos de reposo se observó en microscopio de contraste de fases a 400 aumentos y se contaron al menos 200 espermatozoides por portaobjeto. Los espermatozoides teñidos corresponden a células muertas y los no teñidos corresponden a células vivas. Si sólo se tiñe la zona del cuello, o la cabeza tiene una ligera coloración rosa, se considera que el espermatozoide está vivo (Figura 12). Este fenómeno ocurre debido a que se los está tratando con colorantes excluyentes, por lo que aquellas células que se encuentran vivas y son capaces de regular su homeostasis evitan que el colorante entre al interior de la célula, no así aquellas que se encuentran muertas.

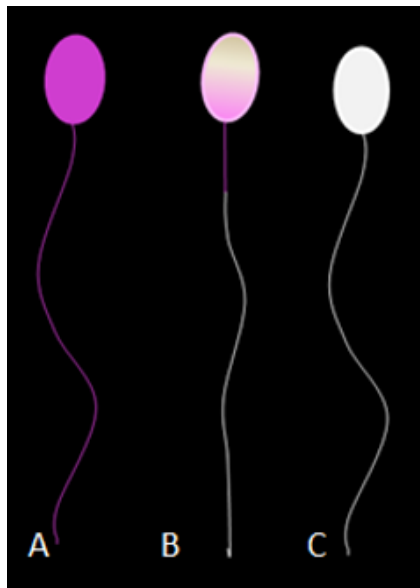


Figura 13: A) Espermatozoide muerto, teñido; B) Espermatozoide vivo, ligeramente teñido; C) Espermatozoide vivo, sin teñir.

Para estudiar el grado de apoptosis, los espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo se mantuvieron en PBS a 37 °C. Dicha solución se incubó con 10 µl de buffer de unión durante 3 minutos, se agregó 5 µl de solución de anexina V-FITC, se mantuvo por 5 minutos a 37°C, después de lo cual se lavó con PBS y se centrifugó a 336 xg durante 3 minutos para volver a suspenderlos en PBS a 37 °C. Luego se realizó la segunda tinción incubando las células con 5 µl de Hoechst 33258 por 5 minutos y 2 µl de ioduro de propidio por 5 minutos. Luego de lavar esta suspensión con PBS se fijaron las células con formaldehído 1% (v/v) durante 10 minutos, se montaron sobre portaobjetos, se cubrieron con cubreobjetos y se observaron bajo microscopio de fluorescencia.

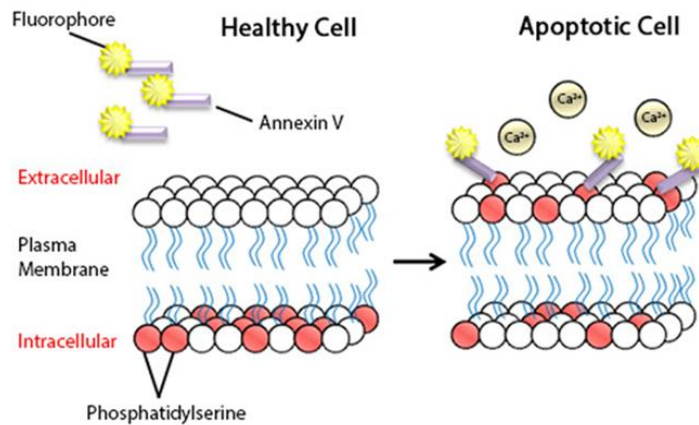


Figura 15: Mecanismo de acción de la anexina V sobre la membrana celular.

Las concentraciones de reactivos y los tiempos de incubación se fueron cambiando para lograr poner a punto la técnica. Para ello se realizaron diluciones seriadas de los colorantes y se varió el tiempo de incubación conforme se veía mayor o menor señal para, de este modo, lograr que un mismo campo pueda ser analizado con los tres filtros diferentes sin dificultad.

Al realizar esta técnica se espera que la anexina V conjugada con el fluorocromo FITC se una a la fosfatidilserina en presencia de  $Ca^{2+}$ , proteína de membrana que se encuentra

presente en la superficie de las células que no pueden regular su homeostasis. Por lo tanto, se considera que aquellas que se encuentren teñidas con este colorante estarán en un estadio de apoptosis temprana. Se considera apoptosis tardía cuando la membrana plasmática ha perdido su integridad y el DNA se hace accesible. Para detectarla se emplean agentes fluorescentes intercalantes en los ácidos nucleicos de doble cadena, como por ejemplo, el Ioduro de propidio. Por su lado el Hoechst es un colorante de ADN que se utiliza para la visualización de núcleos y mitocondrias. Su propósito es distinguir células vivas.

Luego de analizar las muestras los resultados se expresan como porcentajes de apoptosis temprana y tardía respecto al número total de células.

Para todas las técnicas de viabilidad realizadas se utilizaron como control positivo una suspensión de espermatozoides que previamente fue incubada a 50 °C durante 10 min y luego a -18 °C durante 5 minutos, con esto verificamos que todas las células estuviesen muertas para realizar las tinciones.

### **Histología del testículo:**

Luego de diseccionar el animal, un testículo y su epidídimo fueron colocados en solución de Bouin por 24 hs para realizar la fijación. Los testículos se dividieron en mitades para permitir que el fijador penetre en el tejido y así lograr un resultado más homogéneo en toda la masa del órgano. Pasadas las 24 hs, los tejidos se traspasaron a una solución de alcohol 70% (v/v) en la que permanecieron hasta el momento en que se los incluyó en parafina. Para lograr la inclusión, previamente se realizó una deshidratación del tejido mediante pasajes graduales en serie de etanol, xileno y parafina. Se construyó el taco y se cortaron secciones de 5 µm de espesor mediante un micrótomo, se montaron en portaobjetos y luego se colorearon con hematoxilina/eosina para su posterior análisis mediante el uso de un microscopio óptico y el programa ImageJ.

Se tomaron diez fotos, con un aumento de 40X, de diferentes cortes de un mismo testículo, procurando que dichos cortes no sean contiguos. Luego, de cada foto se seleccionaron

al azar diez túbulos seminíferos excluyendo aquellos que presentaban una forma ovalada producto de la propia organización tridimensional del tejido. A cada túbulo se le midió su diámetro externo e interno (luz del túbulo) de manera vertical y horizontal, ya que no son perfectamente circulares. Las mediciones se promediaron y se obtuvieron valores individuales para cada túbulo, expresados en pixeles. Luego, y teniendo en cuenta el aumento en que las fotos fueron tomadas, estos valores se convirtieron a milímetros (mm). Con estas mediciones se analizaron los siguientes parámetros, diámetro total, diámetro de la luz y ancho de la pared del túbulo. Asimismo, se evaluaron posibles anomalías a nivel general tales como indicios de descamación en las paredes, vacuolización celular, y presencia o ausencia de espermatozoides en la luz.

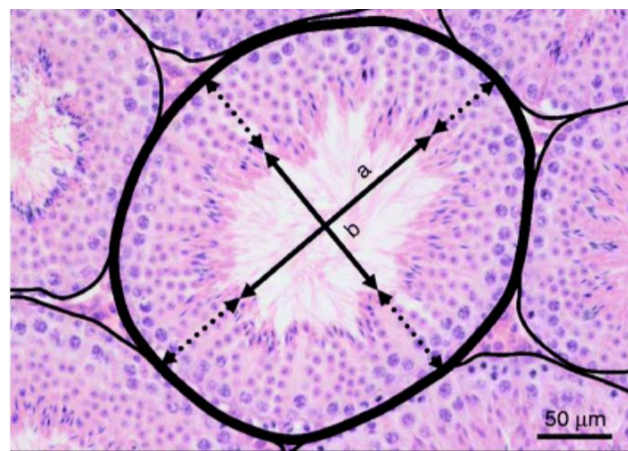


Figura 16: Medición de un túbulo seminífero.

## **Análisis Estadístico**

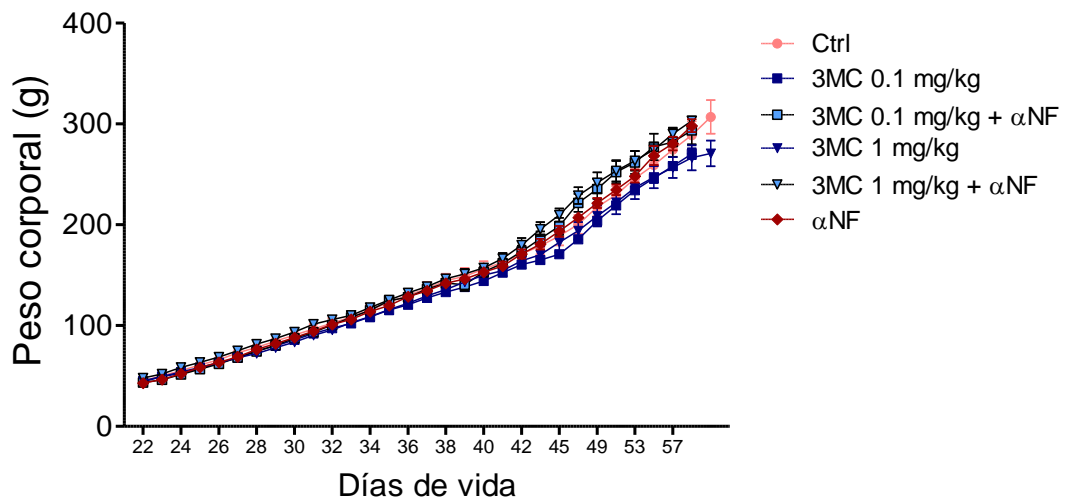
Todos los datos fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) de los valores obtenidos. El análisis estadístico se realizó mediante el programa GraphPad Prism 5.0 para Windows e Infostat. Para comparar el efecto de los tratamientos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor y posterior test de comparaciones múltiples de Dunnett o de dos factores y posterior test de Bonferroni, dependiendo del estudio.

En todos los casos se constató la homogeneidad de varianzas con la prueba de Kruskal-Wallis y la distribución normal de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilks modificado utilizando el programa estadístico Infostat. Para aquellos casos en que no se cumplían alguno de los supuestos de normalidad se realizaron transformaciones a logaritmo natural, cuando la media aumenta proporcional a la varianza, o raíz cuadrada, cuando la media aumenta proporcional al desvío estándar. Las mediciones expresadas en las tablas representan datos crudos. Las diferencias entre los grupos estudiados se consideraron estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ .

## Resultados

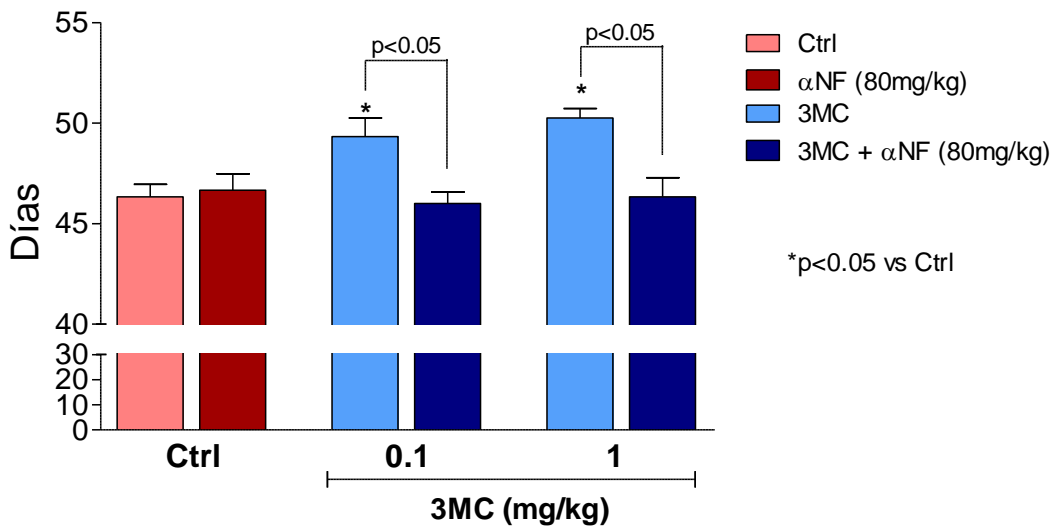
### Peso corporal

En cuanto al peso de los animales, no se observaron diferencias en los pesos corporales entre los distintos grupos.



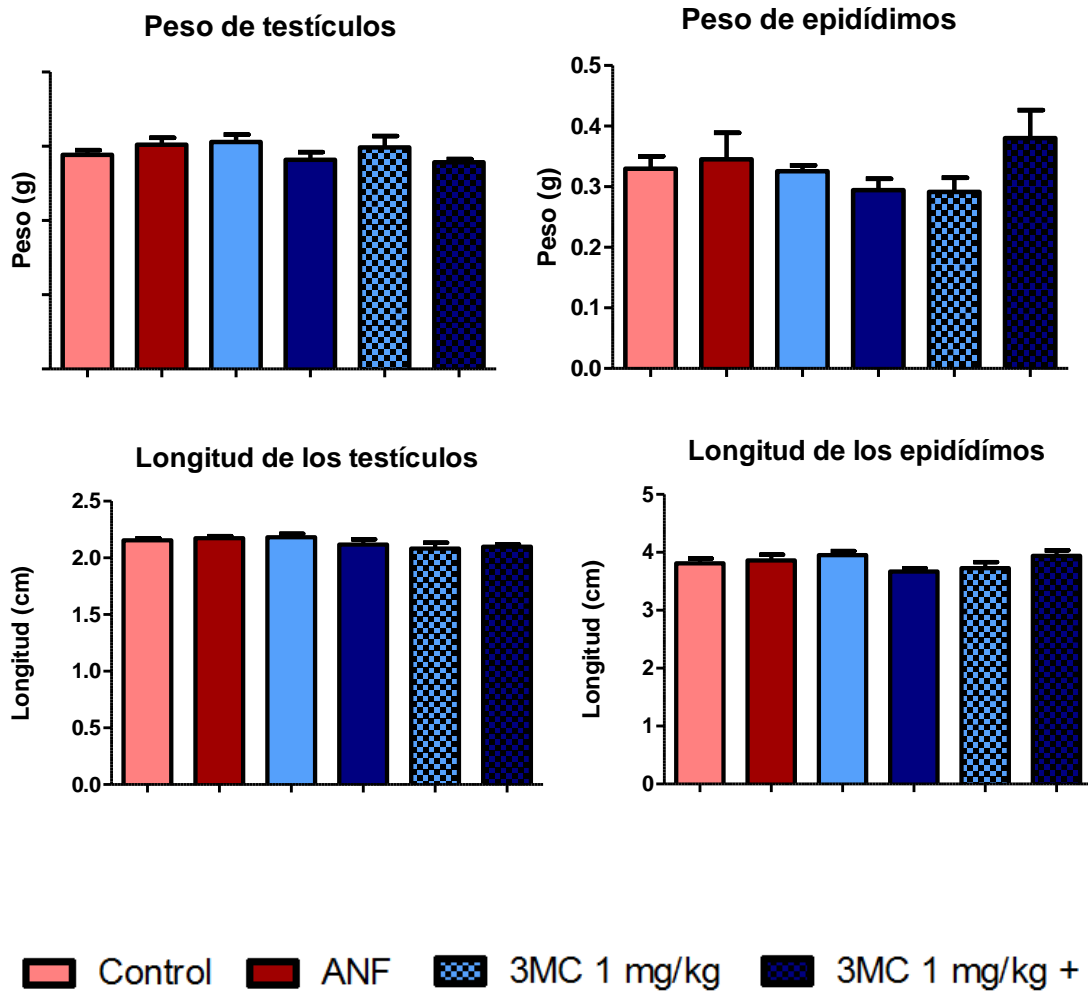
**Retracción del prepucio**

Debido a que la retracción del prepucio es un indicador de la progresión del animal a la pubertad o madurez sexual, a partir del día 33 de vida del animal se examinó diariamente el estado del prepucio. Los animales inyectados con 3MC, en sus dos concentraciones, mostraron retraso de la madurez sexual, expresado en días ( $49 \pm 2$  y  $51 \pm 1$ , para 0.1 y 1 mg/kg respectivamente) comparado con los controles ( $47 \pm 2$ ). El tratamiento con ANF sólo no causó alteraciones en la retracción del prepucio, pero fue capaz de revertir el retraso causado por el 3MC ( $46 \pm 2$  para 3MC 1 mg/kg + ANF y  $46 \pm 1$  para 3MC 0.1 mg/kg + ANF).



### Peso y longitud de las gónadas

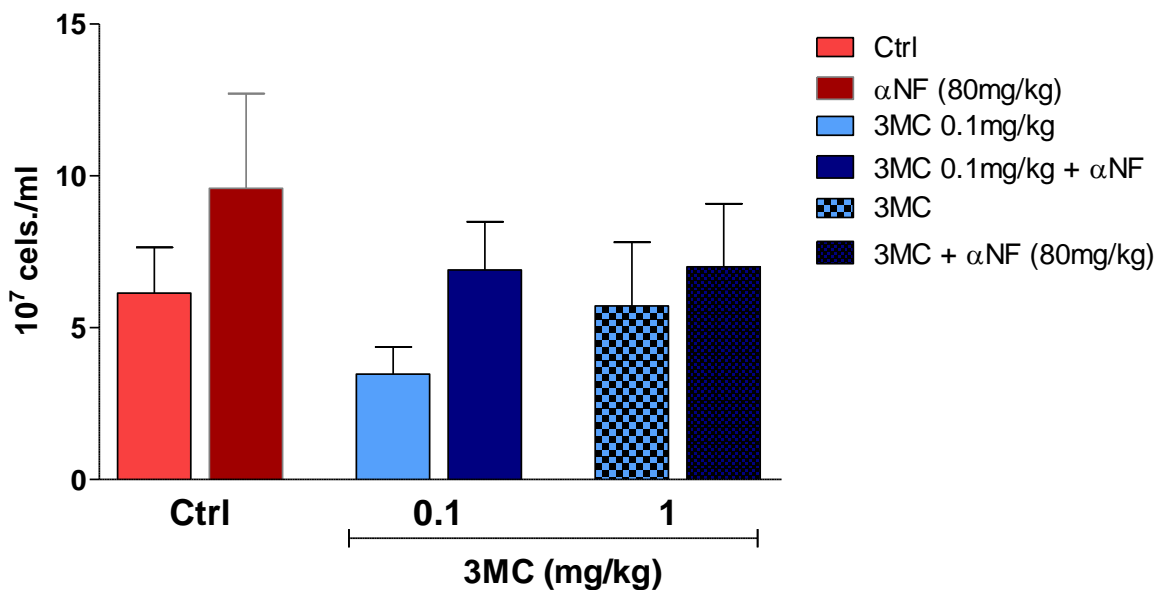
No se observaron diferencias en el peso ni en la longitud los testículos o epidídimos entre los distintos tratamientos.





**Recuento espermático**

Los resultados para el recuento de espermatozoides presentes en la cola del epidídimo evidenciaron que el tratamiento con 3MC 0,1 mg/kg parece disminuir el número total de espermatozoides respecto a los controles. Sin embargo, estos valores no resultaron significativamente diferentes.



### Morfología espermática

El tratamiento con 3MC 0,1 mg/kg provocó una disminución significativa en el porcentaje de espermatozoides con morfología normal respecto a lo obtenido en los animales controles. Al clasificar los espermatozoides anormales según el tipo de alteración morfológica que presentaban, se observó que ninguna de las condiciones generadas presentó valores estadísticamente significativos de algún tipo de anormalidad en particular.

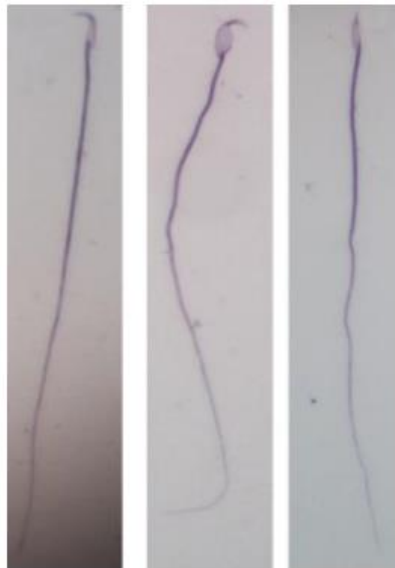
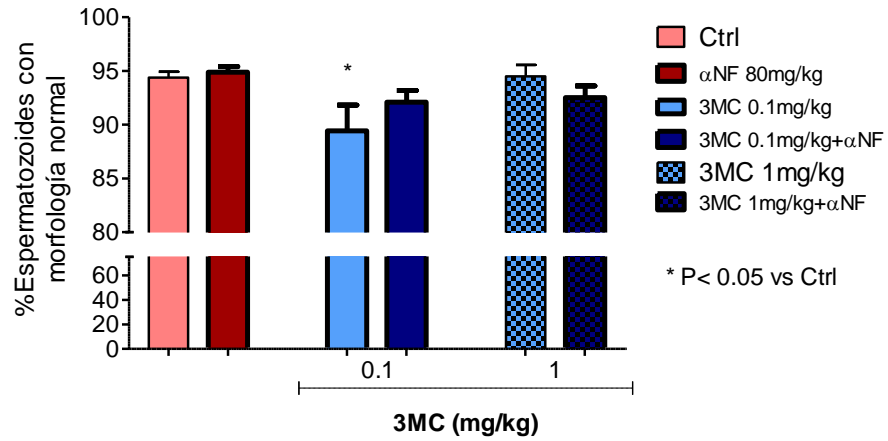
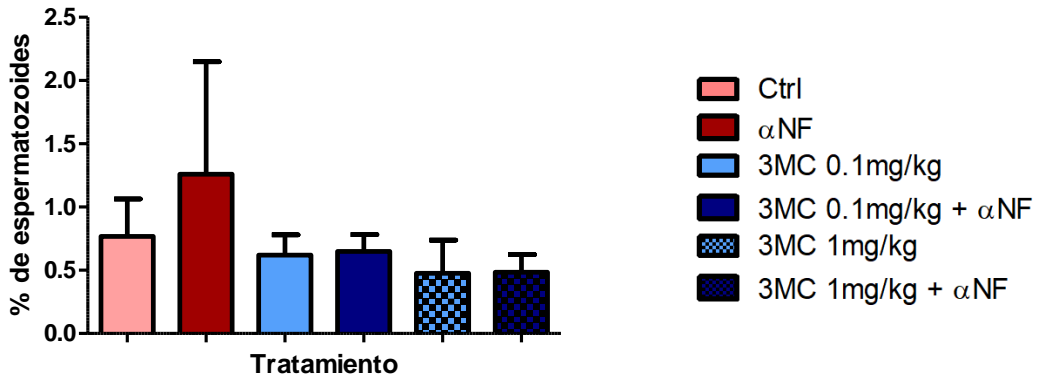


Figura 17: Morfologías observadas durante el ensayo. De izquierda a derecha: Espermatozoide normal, cabeza amorfa, gancho anormal.

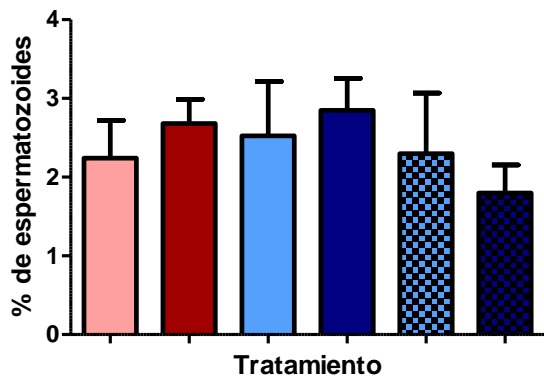
**Morfología Espermática**



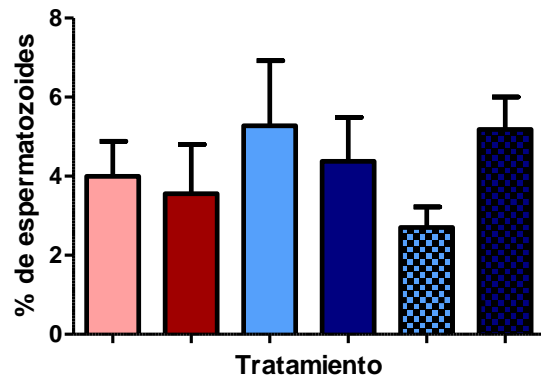
**Cabezas amorfas**



**Ganchos anormales**

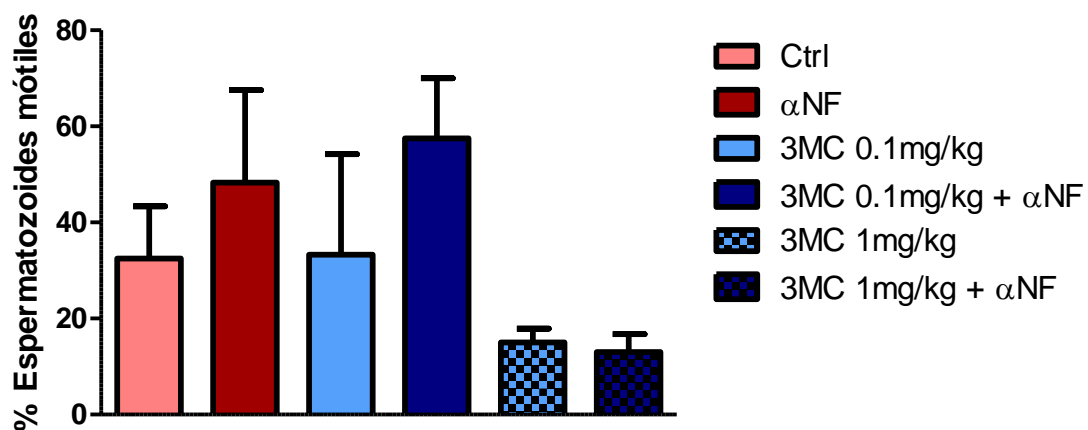


**Cabezas**



### Motilidad espermática

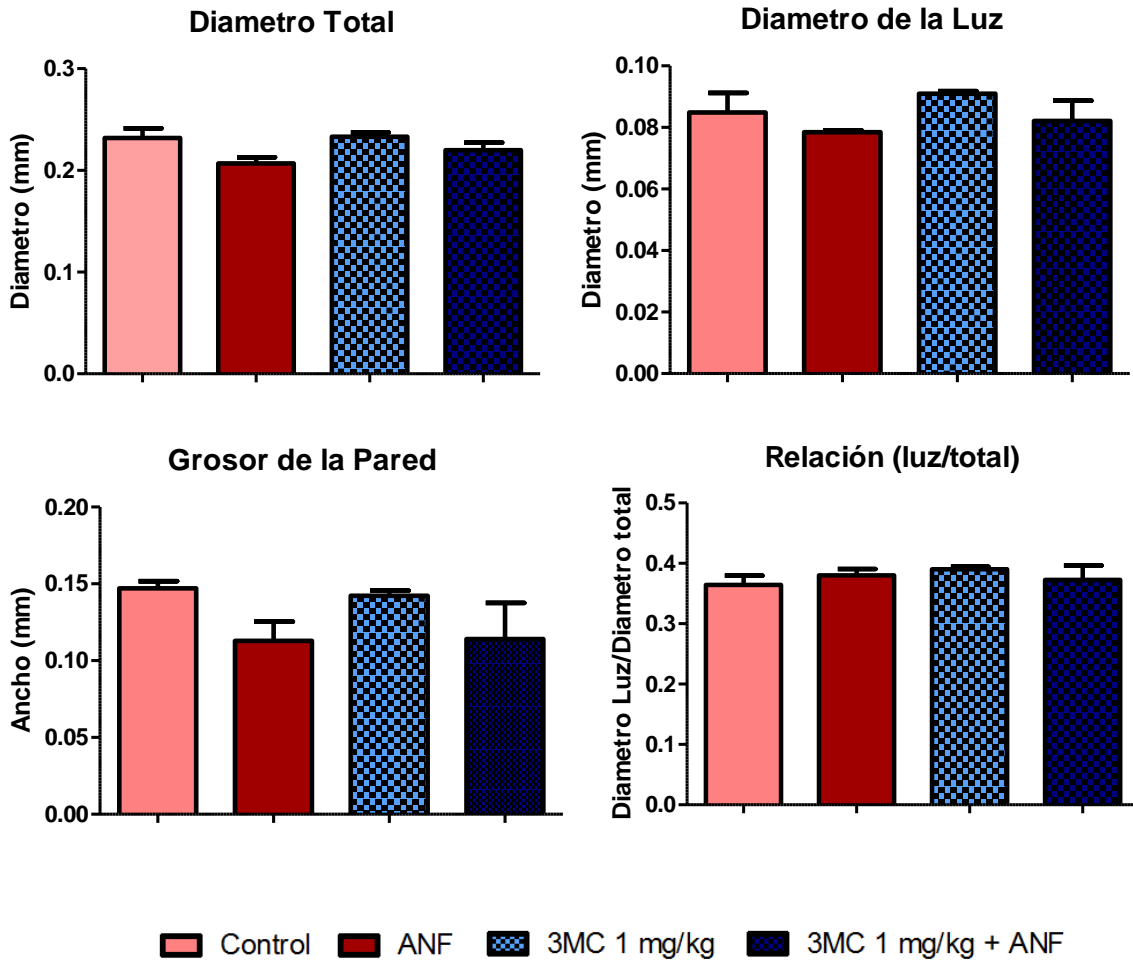
La motilidad espermática es uno de los parámetros para evaluar la calidad del espermatozoide. No encontramos diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales. Cabe destacar que ambos tratamientos que recibieron el 3MC en dosis de 1 mg/kg tanto con el antagonista como sin el mismo presentaron reducidos valores de motilidad por debajo del 20% para ambos casos.



### Viabilidad espermática

Los resultados no fueron los esperados debido a inconsistencias en las mediciones ya que no se logró una correcta puesta a punto de la técnica a pesar de proceder según los protocolos.

**Histología del testículo:**



El tratamiento con 3MC 1 mg/kg no generó diferencias significativas en el diametro total, el diametro de la luz y el espesor de la pared. Las ratas tratadas con ANF exhibían reducción del tamaño total de los túbulos y de la luz y espesor de la pared. En ninguno de los individuos se observaron malformaciones, descamación u otras anomalías a nivel general en el testículo. Por otro lado, la presencia de espermatozoides en el interior de cada túbulo fue homogénea para todos los individuos.

## Discusión

El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de 3MC y ANF sobre parámetros reproductivos del macho durante su maduración sexual, por lo que se utilizaron animales prepúberes. Muchas de los efectos conocidos del 3MC están mediados por receptores de hidrocarburos aromáticos. En consecuencia, utilizamos un antioxidante, ANF, que en ciertas dosis, tales como la aplicada en estos estudios, actúan como antagonista de AhR en múltiples sistemas (Mattinson *et al.*, 1979). Por lo tanto, la exposición al ANF comenzó un día antes de la exposición al 3MC para disponer del bloqueo de los AhR previamente a la presencia del 3MC. Estudios previos en el laboratorio demostraron que dosis diarias de 80 mg/kg es la dosis efectiva para que ANF actúe como antagonista (Barreiro *et al.*, 2011).

Para evaluar si el tratamiento recibido con 3MC y/o ANF podría generar toxicidad sistémica se registró diariamente el peso corporal de los animales. Como no observamos diferencias significativas entre los animales de distintos grupos, podemos sugerir que las dosis aplicadas no estarían generando alteraciones sistémicas en los animales. Sin embargo, no podemos descartar totalmente otra manifestación de toxicidad sistémica.

En cuanto a la retracción del prepucio, indicador de madurez sexual del animal y alcance a la pubertad, observamos diferencias significativas en ambos grupos de animales tratados con 3MC en comparación con los animales controles. Según antecedentes previos, la separación completa de prepucio ocurre entre los 50 y 55 días de nacidas en esta colonia de animales (Korenbrot *et al.*, 1977; Vetter-O'Hagen y Spear 2012). Bajo nuestras condiciones de bioterio, la retracción completa ocurrió entre los 45 y los 49 días de nacidas. Además, nuestro trabajo evidenció que existe una diferencia entre los animales que estuvieron expuestos al 3MC, ya que la retracción completa del prepucio se observó entre los 47 y los 51 en aquellos tratados con 0.1 mg/kg y entre 50 y 52 al tratarlos con 1 mg/kg. Este retraso en la pubertad podría deberse, entre otras causas, a un desbalance hormonal. Vinggaard *et al.*, (2000) observaron que los PAHs podían actuar como antagonistas de receptores de andrógenos humanos cuando usaron células CHO (Chinese hamster

ovary) cotransfectadas con un vector que contenía el receptor humano y otro con un gen reportero. Este trabajo fue confirmado por Kizu *et al.*, (2003) quienes encontraron que los PAHs tenían efectos antiandrogénicos en células cancerosas de próstata humana. Además, Li *et al.*, (2006) demostraron que los subproductos de la combustión de gasolina tenían actividad antiandrogénica sobre el sistema reproductor masculino. Evaluaron la actividad del 3-metil-4- nitrofenol en sistemas in vivo e in vitro. Estos resultados evidencian que los PAHs podrían actuar como disruptores endocrinos, hecho que aún no se comprobó en el laboratorio.

Las observaciones obtenidas respecto a la longitud y el peso de los testículos y epidídimos son consistentes con estudios previos. Jeng y Yu (2008) expuso ratas Fisher de 8 semanas de vida a una mezcla PAHs recolectada y purificada del aire atmosférico. La exposición consistió en dosis diarias de 15, 30 y 60  $\mu\text{g/l}$  de PAHs a través de una sonda gástrica. El tratamiento duró 5 días, una semana o 10 semanas. No encontraron diferencias en el peso de los testículos y epidídimo entre los grupos. Por lo tanto, las dosis utilizadas no alteran morfológicamente los órganos sexuales, consistente con la histología observada en este trabajo.

Jeng y Yu (2008) también determinaron la densidad y motilidad espermática progresiva, partiendo de espermatozoides extraídos de la cola del epidídimo. Las determinaciones de densidad espermática las realizaron utilizando un hemocitómetro calibrado y los resultados evidenciaron que existe una tendencia a una menor densidad espermática conforme las dosis van aumentando, pero no resultaron estadísticamente significativas. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por estos autores, ya que tampoco observamos una disminución significativa. Sin embargo, observamos que la ANF tiende a aumentar el número de espermatozoides, incluso en presencia del 3MC, aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos. Esta tendencia parece ser consistente con los resultados obtenidos previamente en hembras donde se demostró que i) estas mismas dosis de 3MC disminuyeron el número de oocitos inmaduros y maduros, la tasa ovulatoria y la formación de cuerpos lúteos (Rhon-Calderón *et al.*, 2016); ii) elevadas dosis de ANF (80 mg/kg) bloquea el efecto del 3MC (Rhon-Calderón *et al.*, 2016); y iii) ANF (80 mg/kg)

aumenta el número de oocitos inmaduros y maduros e induce el desarrollo folicular en ratas (Barreiro *et al.*, 2011). Basándonos en estos resultados, se realizarán más estudios aumentando el número de ratas y refinando la técnica para reducir el error asociado a estas mediciones. Aun así, se notó claramente que el sistema reproductivo de las hembras es mucho más sensible a este tipo de compuestos, en las dosis utilizadas, que el de los machos, según estos resultados.

Respecto a la evaluación de la motilidad, la técnica aplicada por Jeng y Yu (2008) utilizaban otro medio denominado Armströng y el recuento espermático lo realizaban con un contador celular automático. Observaron que la motilidad progresiva de los espermatozoides disminuía a medida que la dosis aumentaba, haciéndose significativa respecto del grupo control en presencia de concentraciones de 30 y 60  $\mu\text{g/L}$ . También encontraron que la motilidad seguía disminuyendo previo al tratamiento. En nuestro trabajo, no evaluamos motilidad progresiva, solo evaluamos porcentaje de espermatozoides motiles. Cabe destacar que, si bien el trabajo realizado es similar, los modelos son completamente diferentes. Nuestros estudios fueron realizados con una cepa diferente, utilizamos una vía de administración intraperitoneal, y los tiempos y momentos de exposición fueron también diferentes. Además, en este estudio evaluamos un solo PAH, el 3MC, a diferencia de Jeng y Yu (2008) quienes utilizaron una mezcla compleja de PAHs. Aun así, los resultados nos sugieren que los PAHs estarían alterando la integridad de los espermatozoides. La puesta a punto de la técnica para evaluar la motilidad espermática tuvo sus dificultades, principalmente por cuestiones de recursos y materiales. Es de suma importancia mantener a los espermatozoides a  $37^{\circ}\text{C}$  desde el momento en que se extraen del epidídimo hasta que se evalúa su motilidad. Este procedimiento resultó difícil de llevar a cabo por la falta de una platina térmica en el microscopio. Además, el medio utilizado también pudo haber condicionado la motilidad de los mismos ya que no contenía glucosa, posiblemente haya medios más adecuados para realizar estas técnicas. En este tipo de ensayos el medio es crucial ya que se está trabajando con células sumamente sensibles. De todas maneras, los resultados, si bien no son los que reflejan más exactamente la motilidad que tienen estas células, pueden ser comparables debido a que la técnica fue aplicada a todos los grupos por igual durante todo el trabajo.



A diferencia con la histología del tejido, observamos alteraciones morfológicas en los espermatozoides en los animales tratados con 3MC 0.1 mg/kg respecto al grupo control. Esto nos indica, que, no sólo parecería que el 3MC afecta el número de espermatozoides, sino también la calidad de los mismos. De todos modos, con el fin de tener más certeza, en el laboratorio se continúa con estos estudios.

Todos estos resultados preliminares sugieren varias posibilidades: i) que se necesiten mayores dosis para que los animales evidencien una toxicidad reproductiva relevante; o que ii) se necesite más tiempo de exposición para evidenciar una toxicidad reproductiva más relevante. Este último hecho podría estar asociado a que, para este tipo de experimentos, en los que se evalúan efectos de toxicidad sobre la producción espermática, se sugiere realizar exposición de los animales superior a los 60 días, ya que es el tiempo que requiere un ciclo espermático completo, desde la iniciación de una espermatogonia B hasta la aparición de un espermatozoide maduro en la luz del túbulo seminífero. Quizás ésa sea la causa por la cual las diferencias en nuestros resultados no sean tan evidentes, ya que priorizamos exponer a los animales durante su pubertad, periodo que dura sólo 20 días, pero en el cual los mismos son mucho más susceptibles.

## Conclusiones:

- El 3MC retrasa la madurez sexual en las ratas macho.
- El tratamiento con 3MC 0.1 mg/kg alteró la morfología espermática
- No se observaron alteraciones a nivel histológico en los animales tratados con 3MC.
- La ANF es capaz de revertir la acción tóxica del 3MC sobre el sistema reproductor de la rata macho, aparentemente a través de un mecanismo dependiente de AhR

## Bibliografía:

- Ashida H, Nishiumi S, Fukuda I. An update on the dietary ligands of the AhR. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2008 Nov;4(11):1429-47.
- Androutsopoulos VP, Tsatsakis AM, Spandidos DA. Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC Cancer*. 2009 Jun 16;9:187.
- Barnett KR, Tomic D, Gupta RK, Babus JK, Roby KF, Terranova PF, Flaws JA. The aryl hydrocarbon receptor is required for normal gonadotropin responsiveness in the mouse ovary. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007 Aug 15;223(1):66-72.
- Barreiro KA, Di Yorio MP, Artillo-Guida RD, Paz DA, Faletti AG. Daily treatment with  $\alpha$ -naphthoflavone enhances follicular growth and ovulation rate in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011 Apr 1;252(1):11-7.
- Benedict JC, Lin TM, Loeffler IK, Peterson RE, Flaws JA. Physiological role of the aryl hydrocarbon receptor in mouse ovary development. *Toxicol Sci*. 2000 Aug;56(2):382-8.
- Benedict JC, Miller KP, Lin TM, Greenfeld C, Babus JK, Peterson RE, Flaws JA. Aryl hydrocarbon receptor regulates growth, but not atresia, of mouse preantral and antral follicles. *Biol Reprod*. 2003 May;68(5):1511-7.
- Borman SM, Christian PJ, Sipes IG, Hoyer PB. Ovotoxicity in female Fischer rats and B6 mice induced by low-dose exposure to three polycyclic aromatic hydrocarbons: comparison through calculation of an ovotoxic index. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2000 Sep 15;167(3):191-8.
- Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Radical chemistry of flavonoid antioxidants. *Adv Exp Med Biol*. 1990;264:165-70.
- Boutros PC, Moffat ID, Franc MA, Tijet N, Tuomisto J, Pohjanvirta R, Okey AB. Dioxin-responsive AHRE-II gene battery: identification by phylogenetic footprinting. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Aug 27;321(3):707-15.

- Brauze D, Crow JS, Malejka-Giganti D. Modulation by beta-naphthoflavone of ovarian hormone dependent responses in rat uterus and liver in vivo. *Can J Physiol Pharmacol.* 1997 Aug;75(8):1022-9.
- Breinholt V, Larsen JC. Detection of weak estrogenic flavonoids using a recombinant yeast strain and a modified MCF7 cell proliferation assay. *Chem Res Toxicol.* 1998 Jun;11(6):622-9.
- Briz MD, Bonet S, Pinart B, Egozcue J, Camps R. Comparative study of boar sperm coming from the caput, corpus, and cauda regions of the epididymis. *J Androl.* 1995 Mar-Apr;16(2):175-88.
- Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ.* 1992 Sep 12;305(6854):609-13.
- Carlson DB, Perdew GH. A dynamic role for the Ah receptor in cell signaling? Insights from a diverse group of Ah receptor interacting proteins. *J Biochem Mol Toxicol.* 2002;16(6):317-25.
- Carver LA, Bradfield CA. Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo. *J Biol Chem.* 1997 Apr 25;272(17):11452-6.
- Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev.* 1972 Jan;52(1):198-236.
- Cooper TG, Björndahl L, Vreeburg J, Nieschlag E. Semen analysis and external quality control schemes for semen analysis need global standardization. *Int J Androl.* 2002 Oct;25(5):306-11.
- Cummins JM, Woodall PF. On mammalian sperm dimensions. *J Reprod Fertil.* 1985 Sep;75(1):153-75.
- Denison MS, Fisher JM, Whitlock JP Jr. Inducible, receptor-dependent protein-DNA interactions at a dioxin-respon transcriptional enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Apr;85(8):2528-32.
- Denison MS, Nagy SR. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2003;43:309-34.
- Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP. Preferential formati of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science.* 1996 Oct 18;274(5286):430-2.

- Dresdner RD, Katz DF. Relationships of mammalian sperm motility and morphology to hydrodynamic aspects of cell function. *Biol Reprod.* 1981 Dec;25(5):920-30.
- Esser C, Rannug A, Stockinger B. The aryl hydrocarbon receptor in immunity. *Trends Immunol.* 2009 Sep;30(9):447-54
- Ferrándiz ML, Alcaraz MJ. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents Actions.* 1991 Mar;32(3-4):283-8.
- Fieser LF, Berliner E, et al. Naphthoquinone antimalarials; synthesis; aryl derivatives. *J Am Chem Soc.* 1948 Oct;70(10):3203-5.
- Fujii-Kuriyama Y, Mimura J. Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Dec 9;338(1):311-7.
- Gago C, Pérez-Sánchez F, Yeung CH, Tablado L, Cooper TG, Soler C. Morphological characterization of ejaculated cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) sperm. *Am J Primatol.* 1999;47(2):105-15.
- Granberg L, Brunström B, Brandt I. Formation of benzo[a]pyrene and of cytochrome P4501A-induced chicken embryos. *Environ Toxicol Chem.* 2003 Oct;22(10):2393-9.
- Hahn ME. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact.* 2002 Sep 20;141(1-2):131-60.
- Hernandez-Ochoa I, Barnett-Ringgold KR, Dehlinger SL, Gupta RK, Leslie TC, Roby KF, Flaws JA. The ability of the aryl hydrocarbon receptor to regulate ovarian follicle growth and estradiol biosynthesis in mice depends on stage of sexual maturity. *Biol Reprod.* 2010 Nov;83(5):698-706.
- Jeng HA, Yu L. Alteration of sperm quality and hormone levels by polycyclic aromatic hydrocarbons on airborne particulate particles. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 2008 Jun;43(7):675-81.
- Jouannet P, Wang C, Eustache F, Kold-Jensen T, Auger J. Semen quality and male reproductive health: the controversy about human sperm concentration decline. *APMIS.* 2001 May;109(5):333-44.

- Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Miki H, Ogonuki N, Takehashi M. Clonal origin of germ cell colonies after spermatogonial transplantation in mice. *Biol Reprod.* 2006, 75: 68-74.
- Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac MJ, Maczka C, Miller R, Moore J, Rolland R, Scott G, Sheehan DM, Sinks T, Tilson HA. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect.* 1996 Aug;104 Suppl 4:715-40.
- Kierszenbaun AL. *Histología y Biología celular: Introducción a la anatomía patológica.* 2<sup>a</sup> ed. Elsevier Saunders, 2008. 718 p.
- Kizu R, Okamura K, Toriba A, Kakishima H, Mizokami A, Burnstein KL, Hayakawa K. A role of aryl hydrocarbon receptor in the antiandrogenic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons in LNCaP human prostate carcinoma cells. *ArchToxicol.* 2003 Jun;77(6):335-43.
- Leblond CP, Clermont Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann N Y Acad Sci.* 1952 Nov 20;55(4):548-73.
- Li X, Li C, Suzuki AK, Watanabe G, Taneda S, Taya K. Endocrine disruptive effect of 3-methyl-4-nitrophenol isolated from diesel exhaust particles in Hershberger assay using castrated immature rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2009 Sep;73(9):2018-21.
- Li Z, Romanoff LC, Trinidad DA, Pittman EN, Hilton D, Hubbard K, Carmichael H, Parker J, Calafat AM, Sjödin A. Quantification of 21 metabolites of methyl-naphthalenes and polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine. *Anal Bioanal Chem.* 2014 May;406(13):3119-29.
- Lizarazo A, Rodriguez A. Morphometric comparison of human died spermatozoa and pets, dyed with the color of christmas tree. May. 2009.
- Mattison DR, Thorgeirsson SS. Ovarian aryl hydrocarbon hydroxylase activity and primordial oocyte toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in mice. *Cancer Res.* 1979 Sep;39(9):3471-5.
- Mattison DR, Thorgeirsson SS. Smoking and industrial pollution, and their effects on menopause and ovarian cancer. *Lancet.* 1978 Jan 28;1(8057):187-8.
- McLaren A. Gonad development: assembling the mammalian testis. *Curr Biol.* 1998, 8: R175- 177.

- Merchant M, Krishnan V, Safe S. Mechanism of action of alpha-naphthoflavone as an Ah receptor antagonist in MCF-7 human breast cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1993 Jun;120(2):179-85.
- Mumtaz MM, George JD, Gold KW, Cibulas W, DeRosa CT. ATSDR evaluation of health effects of chemicals. IV. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): understanding a complex problem. *Toxicol Ind Health.* 1996 Nov-Dec;12(6):742-971.
- Navas JM, Segner H. Antiestrogenicity of beta-naphthoflavone and PAHs in cultured rainbow trout hepatocytes: evidence for a role of the arylhydrocarbon receptor. *Aquat Toxicol.* 2000 Nov;51(1):79-92.
- Nebert DW, Puga A, Vasiliou V. Role of the Ah receptor and the dioxin-inducible [Ah] gene battery in toxicity, cancer, and signal transduction. *Ann N Y Acad Sci.* 1993 Jun 23;685:624-40.
- Overstreet JW, Bedford JM. Transport, capacitation and fertilizing ability of epididymal spermatozoa. *J Exp Zool.* 1974 Aug;189(2):203-14.
- Perdew GH. Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein. *J Biol Chem.* 1988 Sep 25;263(27):13802-5.
- Pinart E, Sancho S, Briz MD, Bonet S, García N. Characterization of the semen quality of postpuberal boars with spontaneous unilateral abdominal cryptorchidism on the right side. *Anim Reprod Sci.* 1999 Apr 30;55(3-4):269-78.
- Pleil JD, Stiegel MA, Sobus JR, Tabucchi S, Ghio AJ, Madden MC. Cumulative exposure assessment for trace-level polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) using human blood and plasma analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2010 Jul 1;878(21):1753-60.
- Poland A, Knutson JC. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1982;22:517-54.

- Pollenz RS, Buggy C. Ligand-dependent and -independent degradation of the human aryl hydrocarbon receptor (hAHR) in cell culture models. *Chem Biol Interact.* 2006 Dec 1;164(1-2):49-59.
- Puga A, Nebert DW, Carrier F. Dioxin induces expression of c-fos and c-jun proto-oncogenes and a large increase in transcription factor AP-1. *DNA Cell Biol.* 1992 May;11(4):269-81.
- Reyes H, Reisz-Porszasz S, Hankinson O. Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science.* 1992 May 22;256(5060):1193-5.
- Rhon-Calderón EA, Galarza RA, Lomniczi A, Faletti AG. The systemic and gonadal toxicity of 3-methylcholanthrene is prevented by daily administration of  $\alpha$ -naphthoflavone. *Toxicology.* 2016 Apr 15;353-354:58-69.
- Rodgman A, Smith CJ, Perfetti TA. The composition of cigarette smoke: a retrospective, with emphasis on polycyclic components. *Hum Exp Toxicol.* 2000 Oct;19(10):573-95.
- Ross MH, Pawlina W. *Histología: Texto y atlas color con Biología celular y Molecular.* 5a. ed. Médica Panamericana, 2007. 864 p.
- Shiromizu K, Mattison DR. Murine oocyte destruction following intraovarian treatment with 3-methylcholanthrene or 7,12-dimethylbenz(a)anthracene: protection by alpha-naphthoflavone. *Teratog Carcinog Mutagen.* 1985;5(6):463-72.
- Vinggaard AM, Hnida C, Larsen JC. Environmental polycyclic aromatic hydrocarbons affect androgen receptor activation in vitro. *Toxicology.* 2000 Apr 14;145(2-3):173-83.
- Zhai S, Dai R, Friedman FK, Vestal RE. Comparative inhibition of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 by flavonoids. *Drug Metab Dispos.* 1998 Oct;26(10):989-92.