

300627
17
20j



UNIVERSIDAD LA SALLE

**ESCUELA DE QUIMICA
INCORPORADA A LA U. N. A. M.**

**"EVALUACION DEL EFECTO DE LA LETIMIDA
SOBRE LA FERTILIDAD DE RATONES MACHO"**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :

ELVIRA VICENTA LINAZASORO DE LA JARA

DIRECTORA DE TESIS:

Q. Irene Montalvo Velarde

México, D. F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

RESUMEN

INTRODUCCION

OBJETIVOS

FUNDAMENTO TEORICO

CAPITULO I: DESARROLLO DE MEDICAMENTOS

1.1 Obtención de Nuevos Fármacos	1
1.1.1 Obtención de un Nuevo Fármaco Potencial	2
1.1.2 Evaluación Farmacológica	4
1.1.3 Evaluación Toxicológica	6
1.1.4 Evaluación Clínica del Nuevo Compuesto	6

CAPITULO II: EVALUACION TOXICOLOGICA DE NUEVOS FARMACOS

2.1 Generalidades	7
2.2 Diseño de Pruebas Experimentales	8
2.3 Pruebas Toxicológicas que se Llevan a cabo	10
2.3.1 Toxicidad Aguda	11
2.3.1 Toxicidad Subaguda	14
2.3.3 Toxicidad Crónica	17
2.3.4 Estudios Especiales	18

CAPITULO III: TOXICOLOGIA DE LA REPRODUCCION

3.1 Generalidades	22
3.2 Pruebas que se Practican para Evaluar la Función Reproductiva en Machos	25
3.2.1 Parámetros Funcionales	25
3.2.2 Parámetros Morfológicos	26
3.2.3 Parámetros Bioquímicos	27
3.3 Pruebas que se Practican para Evaluar la Función Reproductiva en Hembras	29
3.3.1 Parámetros Funcionales	29
3.3.2 Parámetros Morfológicos	30
3.3.3 Parámetros Bioquímicos	30
Dominantes Letales	31

CAPITULO IV: SALICILATOS

4.1 Introducción	35
4.2 Actividad Terapéutica y Farmacológica de los Salicilatos	36
4.2.1 Analgesia	36
4.2.2 Antipirexis	38
4.2.3 Antiinflamación	39
4.3 Farmacología Básica de los Salicilatos	39
4.3.1 Absorción	39
4.3.2 Distribución	40
4.3.3 Biotransformación	41
4.3.4 Excreción	43
4.4 Toxicología	43

CAPITULO V: LETIMIDA

5.1 Generalidades de las Salicilamidas	45
5.2 Farmacología Básica de la Letimida	47
5.2.1 La Letimida como Salicilamida	47
5.2.2 Biodisponibilidad y Biotransformación	48
5.2.3 Excreción	49
5.3 Toxicología	49
5.3.1 Toxicidad Aguda	49
5.3.2 Toxicidad Subaguda	50
5.3.3 Genotoxicidad	50
5.3.4 Toxicidad en Reproducción	51

CAPITULO VI: APARATO REPRODUCTOR DEL RATON MACHO

6.1 Generalidades	52
6.2 Anatomía y Fisiología del Aparato Reproductor del Ratón Macho	55
6.2.1 Testículos	55
6.2.2 Sistema Tubular	58
6.2.3 Glándulas Accesorias	59
6.2.4 Uretra	64
6.2.5 Pene	64
6.3 Espermatogénesis	65
6.5 Inducción de Anomalías en Espermatozoides. Agentes Alquilantes	72

CAPITULO VII: DISEÑO EXPERIMENTAL

7.1 Materiales	76
7.1.1 Material Biológico	76
7.1.2 Material de Trabajo	76
7.2 Método	80
7.2.1 Recepción, Distribución y Acondicionamiento de Animales	81
7.2.2 Administración	81
7.2.3 Acoplamientos y Sacrificio de Hembras	82
7.2.4 Sacrificio de Machos	84
7.2.5 Estudio de Reversibilidad	88
7.2.6 Análisis Estadístico de Datos	89

CAPITULO VIII: RESULTADOS Y DISCUSION

8.1 Movilidad Espermática	90
8.2 Cuenta Espermática	93
8.3 Peso de Organos	94
8.4 Dominantes Letales	105

CONCLUSION Y RECOMENDACIONES

BIBLIOGRAFIA

INDICE DE CUADROS Y TABLAS

<u>Número</u>	<u>Título</u>	<u>Página</u>
1	Animales para experimentación	9
2	Objetivos generales de la DLso	12
3	Objetivos específicos de la DLso	13
4	Objetivos de los estudios de toxicidad con dosificación reiterada	14
5	Condiciones experimentales para los estudios de toxicidad con dosificación reiterada	15
6	Observaciones y pruebas a practicar en animales en los estudios de toxicidad con dosificación reiterada	16
7	Organos a examinarse para estudios patológicos	17
8	Etapas del ciclo reproductivo	22
9	Estudios practicados en toxicología de la reproducción	24
10	Características generales de las salicilamidas	46
11	DLso de letimida para animales de experimentación	50
12	Organos constituyentes de aparato reproductor del ratón macho	52
13	Glándulas sexuales accesorias	63
14	Movilidad espermática	90
15	Cuenta espermática	93
16	Peso relativo de testiculos	94
17	Peso relativo de epididimo	100
18	Peso relativo de vesicula seminal	103
19	Dominantes Letales	106

INDICE DE FIGURAS

<u>Número</u>	<u>Título</u>	<u>Página</u>
1a	Salicilatos más empleados en la terapéutica	41
1b	Metabolismo de salicilatos	42
2	Estructura de salicilamidas	45
3	Estructura de la letimida	47
4	Organos externos del aparato reproductor del ratón macho	53
5	Organos internos del aparato reproductor del ratón macho	54
6	Testículo de ratón	57
7	Espermatogénesis en ratón	65
8	Modelo de reloj de espermatogénesis del ratón	66
9	Espermatozoide de ratón	70
10	Estructura del busulfan	74
11	Diagrama de flujo del diseño experimental	79
12	Movilidad espermática, % vivos	92
13	Movilidad espermática, % muertos	92
14	Cuenta espermática	93
15	Peso relativo testículo derecho (barras)	95
16	Peso relativo testículo derecho primer sacrificio (X-Y)	96
17	Peso relativo testículo derecho segundo sacrificio (X-Y)	96
18	Peso relativo testículo izquierdo primer sacrificio (barras)	97
19	Peso relativo testículo izquierdo primer sacrificio (X-Y)	97

20	Peso relativo testiculo izquierdo segundo sacrificio (X-Y)	98
21	Peso relativo epididimo (barras)	101
22	Peso relativo epididimo primer sacrificio (X-Y)	101
23	Peso relativo epididimo segundo sacrificio (X-Y)	102
24	Peso relativo vesicula seminal (barras)	103
25	Peso relativo vesicula seminal primer sacrificio (X-Y)	104
26	Peso relativo vesicula seminal segundo sacrificio (X-Y)	105
27	Dominantes letales. Cuerpos lúteos	107
28	Dominantes letales. Implantaciones totales	107
29	Dominantes letales. Implantaciones vivas	108
30	Dominantes letales. Implantaciones muertas	108

RESUMEN

75 ratones de la cepa NRM1 se dividieron aleatoriamente en 4 lotes. A cada lote se administró, respectivamente, dosis de letimida de 150 mg/kg/día, y 50 mg/kg/día, busulfán 2 mg/kg/día (testigo positivo) y vehiculo (testigo negativo), durante un periodo de 8 semanas. Finalizado tal tiempo, la mitad de los animales fue sacrificada (37 animales) y sometida a estudios de motilidad y cuenta espermáticas así como a peso de testículos, epididimo y vesícula seminal. Con los animales no sacrificados se inició un estudio de reversibilidad durante otras 8 semanas, suspendiendo la administración de las sustancias en estudio. Al término de esta etapa, los ratones se sacrificaron y se evaluaron los mismos parámetros que en los animales del grupo anterior. A lo largo de todo el estudio de fertilidad (incluyendo el periodo de reversibilidad), los ratones se acoplaron durante una semana con hembras vírgenes para determinar grado de fertilidad e incidencia de dominantes letales. Los datos se analizaron estadísticamente mediante prueba de análisis de variancia unifactorial y t de Student, empleando un nivel de significación de $p < 0.05$. Los resultados obtenidos muestran que no hay un efecto tóxico aparente de la letimida sobre los parámetros de fertilidad en el ratón macho.

INTRODUCCION

La letimida es una salicilamida básica desarrollada en México que está considerada como candidato para ser introducida y empleada en el mercado del país como un analgésico. Por tal razón, debe someterse a una serie de estudios toxicológicos preclínicos con la finalidad de conocer su seguridad.

Dentro de la vasta serie de estudios preclínicos que se practican a un fármaco en desarrollo, se encuentran los de fertilidad, en los cuales se busca saber si la sustancia no provoca daño a los órganos responsables de los ciclos reproductivos tanto masculinos como femeninos, y por tanto, si la fertilidad prevalece sin alteraciones.

El presente trabajo tuvo como objetivo principal investigar si la letimida producía efectos deletéreos sobre la fertilidad de ratones macho de una cepa experimental determinada.

A fin de lograr tal objetivo, se administró la sustancia a evaluar durante un periodo de 8 semanas a un grupo de 48 ratones macho de cepa NRM1. Se administraron por vía oral dosis de 50 mg/kg/día y 150mg/kg/día. Terminada la administración, se sacrificaron la mitad de los animales sometidos a tratamiento para caracterizar una serie de parámetros tales como movilidad y cuenta espermática, así como determinar los pesos de órganos involucrados directamente con la función reproductora del animal, como lo son los

testiculos, el epididimo y la vesicula seminal; los animales no sacrificados pasaron por un periodo de suspensión de 8 semanas en la administración de la letimida a fin de evidenciar reversibilidad de un daño eventual ocasionado por el fármaco, y al fin de tal etapa, se llevaron a cabo exámenes idénticos a los practicados sobre el primer grupo de ratones. La duración total del experimento fue de 16 semanas.

Paralelo a las fases descritas, se llevaron a cabo una serie de acoplamientos de los ratones con hembras virgenes, durante las semanas 3, 7, 10 y 13 de tratamiento, con la finalidad de establecer dominantes letales provocados por la letimida, y su ulterior reversibilidad.

Para poder tener parámetros de comparación, fue necesario utilizar lotes de ratones que constituyeron grupos testigo, tanto positivos (a los que sólo se les administró el vehiculo empleado para disolver el fármaco), como negativos (animales administrados con busulfán, una sustancia de la cual se conoce su marcado efecto sobre la fertilidad).

Los resultados obtenidos se sometieron a los análisis estadísticos correspondientes (prueba de análisis de variancia unifactorial y t de Student).

Con respecto al marco teórico que precede a la parte experimental de la tesis, se pretende no solo dar fundamentos que sustenten las causas y los métodos involucrados en la realización de la misma, sino presentar un panorama general de toda la serie de pruebas toxicológicas preclínicas que se deben llevar a cabo para evaluar la seguridad de una sustancia química, independientemente del uso que posteriormente tenga, ya sea como fármaco o aditivo de alimentos, entre otros. Al mismo tiempo, el marco teórico permite ubicar las pruebas de toxicología de la reproducción dentro del contexto de los exámenes preclínicos. La secuencia de los capítulos está diseñada partiendo de los conceptos generales del desarrollo de fármacos hasta llegar a la especificidad de las funciones del aparato reproductor del ratón macho, pasando por los conceptos básicos de pruebas preclínicas y haciendo especial énfasis en las pruebas de fertilidad y reproducción.

Junto con lo anterior, se presentan los capítulos correspondientes a la farmacología de salicilatos y de salicilamidas, ya que la letimida se considera un derivado de salicilato. Asimismo, se presenta una sección que describe generalidades acerca de agentes alquilantes, principalmente del busulfán, ya que fue la sustancia empleada en el trabajo experimental como testigo positivo.

OBJETIVOS

- 1.- Evaluar el posible efecto tóxico de la letimida sobre la fertilidad de ratones macho mediante la valoración de parámetros esenciales de la función reproductora.
- 2.- Presentar un panorama general de los estudios toxicológicos preclínicos que se llevan a cabo para establecer la seguridad de un fármaco.
- 3.- Difundir los conceptos básicos de toxicología preclínica para inducir interés en la formación de recursos humanos en esta disciplina.

I D E S A R R O L L O D E M E D I C A M E N T O S

1.1 OBTENCION DE NUEVOS FARMACOS

El desarrollo científico y tecnológico de las últimas décadas (principalmente desde el fin de la Segunda Guerra Mundial), ha permitido gran avance en numerosas áreas de la salud, siendo notable en la farmacéutica en lo que a desarrollo de nuevos medicamentos se refiere.

Sin embargo, el lanzamiento de un nuevo producto farmacéutico al mercado no es un procedimiento sencillo, ya que atraviesa por varias etapas, y a su vez, cada una requiere de un tiempo determinado a fin de asegurar un producto de calidad.

Las etapas de desarrollo de un nuevo fármaco son las siguientes^(24.52):

1. Obtención del nuevo fármaco.
2. Evaluación farmacológica.
3. Evaluación toxicológica.

1.1.1 Obtención de un nuevo fármaco potencial

Los nuevos fármacos pueden ser obtenidos por una de las siguientes vías:

a) Accidental:

Cuando se manifiesta un efecto no anticipado en la sustancia. De hecho, fue el primer camino empleado desde la prehistoria para obtener y aplicar remedios medicinales.

b) A partir de fuentes vegetales:

Este aspecto está estrictamente relacionado con el anterior, ya que del conocimiento popular de las propiedades curativas de algunas plantas, se hizo común que éstas fueran las primeras fuentes de obtención de nuevos fármacos. Aún en nuestros días, algunos de ellos se siguen obteniendo de productos naturales.

c) Extracción a partir de fuentes animales:

Generalmente, se obtienen por esta vía reguladores naturales, tales como hormonas y antisueros. Estas sustancias provienen de subproductos derivados de un determinado animal.

d) Descubrimiento de efectos adicionales:

Suele ocurrir que de forma accidental, o bien, por obra de la casualidad, cuando se aplica una sustancia para aliviar una dolencia determinada o semejante, pueden llegar a surgir efectos adicionales al principal; ejemplo de esto son las anfetaminas, las cuales no sólo actúan como estimulante del sistema nervioso central (SNC), sino como depresores del apetito, de ahí que se utilicen en el tratamiento contra la obesidad⁽²⁴⁾.

e) Identificación empírica en relación a un efecto deseado:

En este caso, una sustancia, cuando se cree que es capaz de producir algún efecto farmacológico pero no se tiene información previa, se prueba directamente con microorganismos o animales inferiores para determinar esos posibles efectos.

f) Modificación química deliberada:

En numerosas ocasiones ocurre que, conociendo la estructura química de un fármaco, se llevan a cabo alteraciones intencionales sobre la misma, a fin de generar un compuesto nuevo que puede presentar las mismas propiedades fisicoquímicas y farmacológicas (isosterismo), o bien, alterarlas (series homólogas)⁽⁶⁹⁾.

Para que un fármaco pueda constituirse en medicamento, debe cubrir ciertas características, tales como selectividad de acción, no presentar efectos colaterales y no ser tóxico. Aunque no existe el fármaco ideal, debe hacerse una discriminación de los compuestos obtenidos por las diversas vías descritas anteriormente, a fin de identificar los que presenten las características deseadas. Para lograr tal objetivo, es necesario emplear ciertos métodos selectivos y posteriormente someter los candidatos elegidos a biovaloración⁽²⁴⁾.

1.1.2 Evaluación farmacológica

En la evaluación farmacológica se emplean tanto las pruebas de selección y biovaloración como estudios cinéticos y metabólicos. Esto con la finalidad de establecer el comportamiento específico del fármaco evaluado⁽²⁴⁾.

a) Selección:

Se emplean un grupo específico de procedimientos los cuales determinan la dosis máxima tolerada y se observa si los efectos terapéuticos del fármaco en cuestión se obtienen a dosis atóxicas. Se emplean animales o métodos *in vitro*⁽²⁴⁾.

b) Biovaloración

Mediante la biovaloración se determinan las relaciones cuantitativas sobre la dosis o concentración del fármaco y la magnitud de la respuesta biológica que produce⁽²⁴⁾. Tales relaciones quedan asentadas en términos tales como Dosis efectiva, Dosis de no efecto, Índice terapéutico, entre otros.

c) Estudios cinéticos y metabólicos

Cuando un fármaco es un fuerte candidato a convertirse en medicamento, es necesario estudiar detalladamente los procesos de absorción, distribución, metabolismo (o biotransformación) y excreción relacionados al compuesto. De esta manera se puede conocer la biodisponibilidad del agente químico, así como la actividad y caracterización de sus metabolitos y el tiempo de vida media⁽⁵²⁾.

1.1.3 Evaluación toxicológica de nuevos candidatos

La finalidad que persiguen los estudios preclínicos toxicológicos es la de demostrar que un fármaco puede emplearse en personas sin causar daño y probar que puede ser eficaz en humanos para el tratamiento de trastornos o enfermedades⁽⁴⁴⁾.

Las pruebas preclínicas emplean animales para experimentación, tales como perros, roedores o monos, y comprenden estudios de diversa índole. En secciones posteriores se ampliará la información acerca de este punto.

1.1.4 Evaluación clínica del nuevo compuesto

Una vez que un fármaco ha pasado las pruebas preclínicas, pasa a ser probado en seres humanos directamente, con el objetivo de determinar si el producto es eficaz para las indicaciones terapéuticas proyectadas. Además, se definirán los trastornos que aparezcan al ser administrado el fármaco finalmente.

Es importante mencionar que un fármaco que va a ser probado en seres humanos, debe haber obtenido la aprobación de los organismos reguladores responsables para su empleo, tales como la FDA en los Estados Unidos o la Secretaría de Salud en nuestro país; de esta manera, no sólo se lleva un control de los agentes químicos en desarrollo, sino que se asegura que los individuos que participan en los ensayos clínicos no sufrirán un daño tóxico letal o irreversible⁽⁴⁴⁾.

2 EVALUACION TOXICOLOGICA DE NUEVOS FARMACOS

2.1 GENERALIDADES

La primera noción de toxicidad de una sustancia la dio Paracelso al establecer que "No hay compuesto que no sea venenoso" y que "El grado de toxicidad depende de la dosis empleada".

A partir de 1960, el desarrollo de la toxicología como ciencia ha tenido gran importancia, ya que cada día el ser humano está expuesto a un número creciente de compuestos químicos⁽⁶⁶⁾.

El concepto de "toxicidad de fármacos" tiene dos aspectos diferentes entre sí⁽²⁴⁾:

- 1.- Respuesta adversa que puede aparecer en seguida de ingerir una sobredosis de sustancia, traduciéndose en un efecto exagerado de la acción terapéutica.
- 2.- Aparición de efectos secundarios, los cuales no están relacionados directamente a la acción terapéutica del fármaco, y cuya ocurrencia puede limitar el uso de los agentes que los producen.

En cuestión de medicamentos, no se puede asegurar que un fármaco sea totalmente seguro, y frecuentemente sucede que los que presentan un buen efecto terapéutico son los más tóxicos.

El estudio de la toxicidad de un nuevo fármaco debe tener como objetivo principal detectar riesgos potenciales de la sustancia sobre el ser humano, y debe considerar, para una evaluación consistente y confiable, el periodo de administración así como la potencia y toxicidad de fármacos estructuralmente análogos ya estudiados^(14.66). El conocimiento de estos riesgos permite establecer las medidas preventivas adecuadas, lo cual repercutirá en una selección de fármacos más rígida y segura.

2.2 DISEÑO DE PRUEBAS EXPERIMENTALES

La toxicología experimental permite diseñar pruebas que facultan la determinación del potencial que un fármaco tiene para ocasionar daño, y de esta manera emitir conclusiones acerca de los niveles mínimos y máximos de exposición a la sustancia para prevenir reacciones contrarias a las que se pretenden⁽⁶⁶⁾.

Para diseñar una buena prueba toxicológica, deben considerarse los siguientes parámetros:

1. Animales: En el cuadro 1 se muestran las especies animales más utilizadas⁽⁴⁷⁾.

CUADRO 1. ANIMALES PARA EXPERIMENTACION.

Especie	% Empleado en Pruebas
Perro	27
Roedores	22
Mono	21
Otros	14
Gato	8
Conejo	4
Rana	4

Las características ideales de un animal para experimentación son⁽⁴⁷⁾:

- * Menor a 1 kg de peso.
- * Fácil de ser sangrado.
- * Poder alimentarlo y mantenerlo en el laboratorio sin problemas extremos.
- * Fácil de ser administrado por varias rutas.
- * Periodo de vida corto.
- * Fisiología semejante a la del ser humano.

Es también importante considerar, para la elección de un animal de experimentación una serie de factores que pueden influir en la respuesta tóxica. Estos factores comprenden la diferencia de especies, razas, sexo y edad, condiciones ambientales de experimentación, ritmos circadianos y de temporada, dieta y las diferentes vías de administración, principalmente⁽⁷⁸⁾.

2. Provisión ante problemas: No sólo la adecuada elección de un animal como modelo experimental es importante para hacer una evaluación segura. Es necesario considerar y prever los probables obstáculos que se presentarían y que desencadenarían juicios erróneos; entre los problemas más comunes que se deben controlar están los relacionados con la pureza del fármaco, efectos sobre el peso de los animales, farmacocinética, el grado de predicción y los requerimientos de las autoridades reguladoras⁽⁷⁸⁾.

Debe tenerse en cuenta que, a pesar de someter el fármaco a toda una serie de exámenes toxicológicos y haber obtenido resultados negativos, no significa que en un momento dado no surja algún efecto imprevisto. Muchos de los efectos tóxicos e indeseables no son detectados sino hasta que el fármaco permanece tiempo considerable en el mercado.

2.2 PRUEBAS TOXICOLOGICAS QUE SE LLEVAN A CABO

Previo inicio de las pruebas toxicológicas, es necesario tener en mente tres premisas importantes⁽⁸⁵⁾:

- 1.- Cualquier fármaco en dosis suficientemente alta, será tóxico.
- 2.- Los datos de toxicidad obtenidos a partir de los órganos blanco de los animales de experimentación pueden ser similares a los del hombre.
- 3.- No hay pruebas que garanticen la totalidad de seguridad de un fármaco.

Las pruebas toxicológicas que se llevan a cabo para evaluar un fármaco son las que a continuación se plantean:

2.3.1 TOXICIDAD AGUDA (27.44.85.88.70)

La toxicidad aguda es aquella que se produce inmediatamente o en corto tiempo después de la absorción de una sola dosis suficientemente alta o de varias repetidas.

Involucra una expresión cuantitativa, que es la DL₅₀ (dosis letal cincuenta) que se define como la dosis calculada estadísticamente, que produce la muerte a la mitad de los animales de un lote de experimentación.

Para determinar la DL₅₀, es necesario administrar el fármaco de prueba al menos por dos vías diferentes, y una de ellas deberá ser parenteral para asegurar la absorción del fármaco.

Generalmente se utilizan cuatro especies distintas de animales de experimentación, siendo una de ellas un no roedor.

Los objetivos principales de la DL₅₀ se presentan en el cuadro 2, mientras que en el 3 se observan los objetivos que persigue el estudio de toxicidad aguda al ser practicado en roedores y en no roedores⁽⁶⁵⁾.

CUADRO 2. OBJETIVOS GENERALES DE LA DL₅₀.

Comparar la toxicidad de sustancias estructuralmente semejantes .

Controlar lotes de sustancias para verificar su elaboración.

Detectar diferencias en lotes para analizar si la formulación altera su potencia.

CUADRO 3. OBJETIVOS ESPECIFICOS DE LA DL₅₀.

OBJETIVO ESPECIFICO	ROEDORES	NO ROEDORES
Establecer DL ₅₀	X	
Establecer DL ₁₀₀ minima	X	X
Establecer dosis máxima sin efecto	X	X
Observar reacciones evidentes	X	
Determinar tiempo de recuperación	X	X
Determinar tiempo de muerte	X	X
Seleccionar dosis para estudios de dosis repetida	X	X
Predecir reacciones tóxicas por sobredosis en el hombre	X	X
Determinar DL ₅₀ en animales geriátricos o jóvenes	X	
Establecer cambios en organismos con deficiencia renal o hepática	X	
Determinar potenciación de toxicidad por interacción con otros fármacos	X	
Predicción del grado de absorción del fármaco		X

2.3.2 TOXICIDAD SUBAGUDA^(1,2,3)

En el cuadro 4 se resumen las condiciones experimentales necesarias, mientras que en el 5 se muestran los objetivos que la toxicidad subaguda (o toxicidad con dosificación reiterada) persigue.

En los cuadros 6 y 7 se pueden observar, respectivamente, las pruebas que se verifican en los animales tratados, así como los órganos que se colectan para estudios de patología.

CUADRO 4. OBJETIVOS DE LOS ESTUDIOS DE TOXICIDAD
CON DOSIFICACION REITERADA.

Conocer la naturaleza de los efectos tóxicos (disfunción y probable reversibilidad).

Investigar diferencias de sensibilidad entre especies y sexos.

Establecer dosis respuesta y dosis máxima no efectiva para cada especie.

Evaluar la tolerancia.

CUADRO 5. CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA LOS ESTUDIOS DE
TOXICIDAD CON DOSIFICACION REITERADA.

Empleo de dos especies animales, una de ellas roedor.

Utilizar animales macho y hembra.

Tres niveles de dosis:

Alta: Que provoque cambios en el órgano blanco y con marcados efectos colaterales.

Media: Que produzca sólo efectos colaterales.

Baja: Asintomática o con efectos colaterales mínimos.

Administración por vía propuesta para humanos.

Administración por periodos mayores a dos semanas.

CUADRO 6. OBSERVACIONES Y PRUEBAS A PRACTICAR EN ANIMALES EN LOS ESTUDIOS DE TOXICIDAD CON ADMINISTRACION REITERADA.

Observaciones Generales	Apariencia Actividad Consumo de alimento Consumo de agua Examen físico general	Peso Excretas
Hematología	Hemoglobina Glóbulos rojos Cuerpos de Heinz Glóbulos blancos	Reticulocitos Hematocrito Plaquetas
Química sanguínea	Nitrógeno úrico Creatinina Glucosa Proteínas Electroforesis Fosfatasa alcalina Transaminasa glutámico pirúvica Transaminasa glutámico oxalacética Lactato deshidrogenasa Tiempo de coagulación Tiempo de protrombina	
Electrolitos séricos	Na, K, Ca, Cl, Mg	
Orina	Pruebas físicas, químicas y microscópicas de sedimento	
Pruebas especiales	Función tiroidea Tolerancia a glucosa Acido láctico Colesterol 17-cetoesteroides urinarios Triglicéridos Concentración de fármaco en orina y plasma	
Patología	Examen macro y microscópico de órganos post-mortem	

CUADRO 7. ORGANOS A EXAMINARSE PARA EXAMENES PATOLOGICOS

Riñón	Piel	Aorta
Suprarenales	Glándula mamaria	Glándula salival
Higado	Vejiga	Tiroides
Vesícula biliar	Ovarios	Paratiroides
Páncreas	Utero	Tráquea
Estómago	Testículo	Esófago
Duodeno	Vesícula seminal	Ojo
Ileon	Epididimo	Nervio óptico
Yeyuno	Próstata	Cerebro
Colon	Médula ósea	Pituitaria
Nodos linfáticos	Timo	Lesiones gruesas
-Mesentérico	Corazón	Sitios de aplicación
-Cervical	Pulmón	
-Axilar		

2.3.3 TOXICIDAD CRONICA (44.65)

Para un estudio de toxicidad crónica es necesario se administre el agente químico durante un plazo largo, es decir, por más de 90 días. La única diferencia con los estudios subagudos es la dosis.

Existen dos tipos de toxicidad crónica:

a) Toxicidad crónica "per se"

La prueba se lleva a cabo durante un periodo largo de la vida del animal.

b) Toxicidad crónica permanente o
carcinogenicidad

La prueba se realiza durante toda la vida del animal.

Las características experimentales y objetivos generales de la toxicidad subaguda son muy semejantes a la de la toxicidad crónica. La única diferencia existente es la dosis, que en la toxicidad crónica es menor.

2.3.4 ESTUDIOS ESPECIALES

Los estudios especiales se verifican cuando se requiera, a partir de los datos arrojados por las pruebas antes descritas o bien dependiendo del uso que se haya previsto al medicamento en prueba. Entre los estudios especiales se encuentran:

a) Toxicología de la reproducción^(14.66.66.70)

Las pruebas de reproducción están divididas en tres etapas:

* Etapa 1: Reproducción

Está diseñado para determinar los efectos de un compuesto sobre la fertilidad y el rendimiento reproductivo en general. En la siguiente sección se presentará un análisis más detallado acerca de este rubro.

* Etapa 2: Teratogénesis (*teratos* = monstruo)

Estudia los efectos de una sustancia sobre el embrión y el feto, tras administrarla a la madre. Las anomalías de la progenie pueden producirse si la sustancia se administra en el periodo en que el desarrollo embrionario y fetal se lleva a cabo más rápidamente. El análisis de los productos puede hacerse ya sea sacrificando a las madres previo el día del nacimiento de sus crías o bien post-partum.

* Etapa 3: Estudio perinatal y postnatal

Ayuda a elucidar la toxicidad que un compuesto puede ejercer sobre las crías durante las etapas de lactancia y desarrollo.

b) Mutagenicidad

Los estudios mutagénicos se enfocan a los efectos de un agente químico a nivel genético.

No existe un sistema que caracterice a todos los mutagénicos, de ahí que sea necesario hacer una gran variedad de pruebas.

c) Carcinogenicidad(14,85,70)

Los trabajos de carcinogenicidad se ocupan de evaluar si la sustancia genera tumores malignos tras la exposición a pequeñas dosis por periodos largos de tiempo.

Weisburger y Williams(85) marcan dos tipos de sustancias oncogénicas: los carcinógenos de acción directa y los epigenéticos.

Los estudios de carcinogenicidad se recomienda realizarlos en las siguientes circunstancias:

- a) Si el compuesto o sus metabolitos están estructuralmente relacionados con un carcinógeno conocido y si el fármaco se administrará por periodos prolongados.

- b) Si durante el desarrollo de las pruebas previas se observa un número elevado de tumores o éstos no son iguales a los desarrollados por los animales testigo.
- c) Si el fármaco presentó resultados positivos en los estudios de mutagénesis y teratogénesis.
- d) Si durante la prueba hay un alto índice de mortalidad.

d) Adicciones⁽¹⁴⁾

Se realizan pruebas de dependencia a la droga cuando ésta va a influir en el sistema nervioso.

Este es un rubro en ocasiones difícil de evaluar, ya que las reacciones de un animal son, en numerosas ocasiones, diferentes a las del ser humano.

No obstante, hay ciertos parámetros que pueden dar información, tales como la euforia, la alucinación o desórdenes de percepción.

3 TOXICOLOGIA DE LA REPRODUCCION

3.1 GENERALIDADES

La toxicología de la reproducción es una vertiente de los estudios de aseguramiento de la inocuidad de agentes químicos, y permite evaluar los efectos que éstos pueden ocasionar sobre las diferentes etapas del ciclo reproductivo, las cuales se presentan en el cuadro 8⁽⁵⁰⁾.

CUADRO 8. ETAPAS DEL CICLO REPRODUCTIVO

- * Gametogénesis
- * Copulación
- * Fertilización
- * Periodo de preimplantación
- * Implantación
- * Periodo embrionario
- * Periodo fetal
- * Parto
- * Lactancia
- * Desarrollo post-natal y pubertad.

Estudios de este tipo presentan gran importancia, ya que, por un lado, la supervivencia de cualquier especie animal, incluyendo al hombre, se fundamenta en la procreación, y para tal, se requiere de un aparato reproductor íntegro. Por otro lado, en nuestros días se manejan una gran cantidad de agentes químicos capaces de desarrollar diferentes grados de toxicidad sistémica. Solventes, materias primas, metales y fármacos, entre otros, son capaces de producir daño al aparato reproductor^(17.18).

Desde hace ya algunos años, la toxicidad del aparato reproductor se ha convertido en un asunto de salud pública, ya que hay una alta incidencia de infertilidad^(18.30). El primer reporte de toxicidad a nivel de aparato reproductor se da al final del siglo XIX, con un grupo de trabajadores intoxicados con plomo⁽⁴⁾. Hasta nuestros días, existe un vasto cúmulo de información acerca de los daños ocasionados por sustancias químicas, que comprenden, entre otros, disminución de la libido, azoospermia, oligospermia, infertilidad, malformaciones de los productos, abortos espontáneos, defectos en el desarrollo y diversos grados de retraso mental^(18.30).

La evaluación del grado de toxicidad en el aparato reproductor es difícil de estimar en el ser humano, ya que los procesos que en él se desarrollan son complejos, independientemente del largo tiempo que transcurre para que el hombre alcance una madurez sexual completa^(17.18).

Sin embargo, se emplean modelos experimentales aplicados a animales para poder comprender los mecanismos tóxicos que los agentes químicos producen.

Estos procedimientos se encuentran regulados por diferentes instancias, tales como la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos, y se encuentran divididos en tres segmentos, los cuales se describen en la tabla 9(4.6.13).

TABLA 9. ESTUDIOS PRACTICADOS EN TOXICOLOGIA DE LA REPRODUCCION

Segmento	Objetivo
I: Reproducción y fertilidad	Proveer información de la capacidad de fertilización y de reproducción. Se centra en la función gonadal, ciclo estral, conducta de apareamiento, velocidad de concepción y primeras etapas de gestación.
II Teratogénesis	Determinar si el agente químico probado posee potencial embriotóxico o teratogénico.
III Periodo pre y postnatal	Establecer los efectos del agente químico sobre las últimas etapas de gestación parto y lactancia.

Los animales de experimentación que se emplean en los estudios de toxicología de la reproducción son roedores, principalmente.

3.2 PRUEBAS QUE SE PRACTICAN PARA EVALUAR LA FUNCION REPRODUCTIVA EN MACHOS.

Para evaluar la función reproductiva de animales macho, se llevan a cabo exámenes funcionales, morfológicos y bioquímicos (17.18).

3.2.1 Parámetros funcionales

1) Eficiencia de reproducción

Fundamentalmente analiza la conducta sexual del macho. Es decir, número de montas, intromisiones y eyaculaciones.

2) Perfil de fertilidad

Este tipo de perfiles es útil para evaluar tanto la función reproductora como los dominantes letales. El macho se acopla durante un periodo de 7 días con una hembra a fin de que ésta pueda atravesar por un ciclo estral.

Cuando se ha finalizado el periodo de acoplamiento, se sacrifica la hembra aproximadamente al decimotercero día de gestación, analizando tanto útero como fetos.

Haciendo acoplamientos seriados, es posible evaluar la función biológica de los espermatozoides, al mismo tiempo que se obtiene un perfil gráfico, el cual presenta una relación inversamente proporcional en cuanto al tiempo de la fase de espermatogénesis dañada por un agente químico.

3.2.2 Parámetros morfológicos

1) Patología gruesa

Un agente químico puede alterar el peso o el volumen de los órganos que componen el aparato reproductor masculino, incluyendo glándulas como la pituitaria y las suprarrenales. El examen patológico grueso resalta tales alteraciones.

2) Histopatología

El examen microscópico de testículos, próstata, vesícula seminal, epididimo y glándulas coagulantes permite analizar detalladamente la ultraestructura de estos órganos y estimar el daño producido por una sustancia química.

Para poder llevar a cabo un examen adecuado, se verifican técnicas especiales de fijación de órgano y corte y teñido de los mismos⁽³⁵⁾.

3) Análisis de semen

El análisis de semen consiste en hacer una evaluación visual de la motilidad de espermatozoides, así como una cuenta de los mismos expresada en millones por mililitro. Asimismo, se realiza un estudio de la morfología del espermatozoide para localizar anomalías en su estructura^(73 - 75).

Otro método para evaluar el semen (en especial el del humano) es producir una fertilización *in vitro* con óvulos de animales de experimentación (como hamsters); en este caso, únicamente se observa la capacidad de penetración del espermatozoide al óvulo y el grado de descondensación de la cabeza de la célula masculina⁽⁵⁰⁾.

3.2.3 Parámetros bioquímicos

1) Aspectos moleculares

La toxicología de la reproducción utiliza las rutas bioquímicas realizadas por el esperma (tales como respiración, síntesis de ácidos nucleicos o

actividad enzimática) para poder evaluar la toxicidad de un agente químico.

2) Función de células accesorias

Tanto las células de Sertoli como las de Leydig contribuyen a nutrir y transportar enzimas al semen. Al evaluar la función de estas células, se puede conocer si se ha presentado toxicidad.

3) Estado hormonal

Al ser el testículo un órgano con funciones hormonales y espermatogénicas, una alteración de las vías de síntesis de hormonas puede repercutir en el proceso normal de espermatogénesis.

4) Separación de células espermatogénicas

Para completar un estudio detallado de fertilidad, es importante identificar el tipo de células involucradas en la espermatogénesis con la finalidad de establecer las características de cada tipo y sus posibles modificaciones, así como la de determinar la afinidad de las células hacia diferentes agentes químicos o metales⁽³⁴⁾.

3.3 PRUEBAS QUE SE PRACTICAN PARA EVALUAR LA FUNCION REPRODUCTIVA EN HEMBRAS

Los exámenes que se llevan a cabo para las hembras son menos extensos que los practicados en machos, sin embargo, se consideran parámetros semejantes^(17,18).

3.3.1 Parámetros funcionales

1) Eficiencia reproductiva

En este examen se evalúa la capacidad de la hembra para concebir y desarrollar preñez, así como la capacidad tanto de la madre como de las crías de sobrevivir.

La eficiencia reproductiva se emplea para estudiar toxicidad crónica, generalmente. Al igual que con los machos, pueden hacerse apareamientos seriados para de esta forma determinar el grado en que una sustancia química puede alterar la fertilidad de la hembra.

2) Fertilización

En las pruebas de fertilización se consideran las etapas que en ella se llevan a cabo, es decir, la penetración del huevo por el espermatozoide, la activación del huevo y la unión de los núcleos de las células. El examen puede hacerse tanto *in vivo* como *in vitro*.

3.3.2 Parámetros morfológicos

a) Patología gruesa

De forma semejante a como se explicó para los machos, las hembras también deben ser examinadas en cuanto al estado general del aparato reproductor se refiere, tanto en apariencia visual como en peso.

b) Histopatología

Por diversas técnicas de microscopia se examinan vagina, cervix, útero, trompas de Falopio, ovarios, y glándulas pituitaria y suprarrenales, a fin de detectar anomalías en su estructura.

3.3.3 Parámetros bioquímicos

1) Aspectos moleculares

El estudio de los receptores de hormonas tanto en núcleo o citoplasma celulares es de importancia en los estudios de toxicología de la reproducción, ya que hay agentes químicos que pueden competir por estos receptores modificando el efecto normal de las hormonas.

También se lleva a cabo un análisis bioquímico de los fluidos vaginales y uterinos. En animales grandes, como el perro o el mono, se pueden realizar exámenes de fluidos foliculares del ovario para

determinar en sus componentes si ha habido alteración del órgano por causa de un agente químico.

2) Función de células accesorias

En este punto se evalúa la función de las células de la teca y de la corteza del ovario, las cuales presentan relativa actividad hormonal.

3) Estado hormonal

Durante el ciclo estral de una hembra, se producen hormonas en distinta cantidad, según la etapa en la que el ciclo se encuentre. La estimación de los diferentes niveles hormonales involucrados en la manutención del ciclo ovárico normal sirve para determinar la actividad gonadotrópica.

3.4 DOMINANTES LETALES

La prueba de dominantes letales puede ser utilizada para evaluar tanto la fertilidad de machos como la de hembras, dependiendo del sexo del animal expuesto a un agente químico.

Leber define a las mutaciones dominantes letales como "una influencia controladora la cual conlleva a la muerte debido a una variación heredada en una especie biológica", y el propósito del estudio es la detección de agentes capaces de producir aberraciones

cromosómicas en las células germinativas y por tanto, tener capacidad de afectar la vida de la progenie⁽³⁶⁾. Esta afectación puede manifestarse desde la exposición de las células germinativas masculinas o femeninas incapacitándolas para la fertilización, hasta la muerte de los gametos o embriones. El principio en que esta prueba está basada es a nivel genético, ya que hay rompimiento de cromosomas, lo cual comúnmente produce modificaciones en la segmentación primaria de éstos; hay, como consecuencia, monosomía y trisomía desencadenando la muerte temprana o tardía (respectivamente) de los productos⁽²⁶⁾.

Los dominantes letales siempre se van a estudiar en hembras, y según Bateman, las variantes de los dominantes letales son las que a continuación se describen⁽⁶⁾:

1.- Pérdida de implantación

El huevo fertilizado se pierde, sin culminar su implantación definitiva.

Este tipo de dominante letal sólo se puede determinar mediante el examen microscópico de los huevos preimplantados, a fin de distinguir los no fertilizados de los que presentan el dominante.

2.- Deciduomas

Este término define a un tumor benigno que tiene origen decidua. Es decir, que el huevo fertilizado induce un desarrollo de decidua, pero no hay capacidad de producir

un posterior crecimiento. La decidua se desarrolla hasta un límite y posteriormente se necrosa, formando una especie de coágulo. Al deciduoma se le da el nombre de "reabsorción embrionaria", término que no es correcto, ya que en ningún momento se desarrolló un embrión. El deciduoma se compone de fibrina que encapsula eritrocitos y leucocitos. A simple vista, se aprecia junto al deciduoma un coágulo de sangre.

3.- Trofoblasto sin feto

Tal dominante letal presenta como característica un huevo normalmente dividido, pero no es capaz de llevar a cabo diferenciación celular.

Se aprecia como una esfera de apariencia esponjosa, producida por células del trofoblasto.

El trofoblasto puede llegar a desintegrarse y fundirse con el deciduoma formando el conjunto denominado "muerte temprana post-implantación".

4.- Muerte fetal

En este caso, el feto presenta un tamaño muy pequeño, a pesar de apreciarse a simple vista como un producto formado totalmente. Es característico que el feto presente un color pálido o blanquecino debido a una deficiencia eritropoyética.

También es común encontrar fetos macerados, es decir, en via de desintegrarse, tanto en el interior del saco vitelino como en el exterior de éste, previa ruptura del mismo.

4 SALICILATOS

4.1 INTRODUCCION

Los salicilatos son un grupo de drogas que tienen en común el radical 2-hidroxibenzoato⁽⁸⁴⁾. Se encuentran comprendidos en un gran grupo farmacológico denominado agentes analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios^(15.22.30.44.51), y tienen como ventaja el ser del tipo no narcótico, de tal forma que ejercen su acción farmacológica sin necesidad de disminuir la sensibilidad o el estado de conciencia, contrariamente a lo que producen los analgésicos narcóticos (como la morfina), además de que no causan dependencia ni tolerancia^(30.51).

De una serie de sustancias que se han utilizado durante años, los salicilatos ocupan los primeros lugares, ya que se han empleado desde los tiempos de Hipócrates debido a que la quinina, la quinidina y la corteza de quino los contienen⁽¹⁵⁾. La corteza de sauce blanco (*Salix alba vulgaris*) es rico en salicina, la cual por hidrólisis se descompone en glucosa y alcohol salicilico. Este último es capaz de transformarse en ácido tanto por mecanismos *in vivo* como *in vitro*^(15.22). Otras fuentes naturales que contienen precursores de salicilatos son la *Spiralia ulmaria* (pariente de la rosa), y otras variedades del género *Spiraea*^(15.22.44.84). Actualmente, los salicilatos son sintetizados, más que extraídos de sus fuentes naturales.

En la terapéutica, los salicilatos más utilizados (Ver figura 1a) son el salicilato de sodio, las amidas y los ésteres metílicos del ácido salicílico y el ácido acetil salicílico, comúnmente llamado "aspirina" (11,84,77).

4.2 ACTIVIDAD TERAPEUTICA Y FARMACOLOGICA DE LOS SALICILATOS

Los salicilatos tienen tres efectos terapéuticos importantes: analgésico, antipirético y antiinflamatorio.

4.2.1 Analgesia

La analgesia se define como la pérdida de sensibilidad al dolor. El dolor es considerado un mecanismo protector del cuerpo; suele producirse generalmente por un daño tisular, y obliga al individuo a reaccionar en forma refleja para suprimir el estímulo doloroso (29).

El dolor se percibe por receptores, terminales nerviosas libres dispersas por todo el organismo; los receptores son susceptibles a ser estimulados por tensión o daño mecánico (receptor mecansensible), calor o frío (receptor termosensible) o bien, por sustancias químicas (receptor quimiosensible), tales como bradicinina, serotonina, histamina, iones potasio, ácidos, prostaglandinas, acetilcolina y enzimas proteolíticas.

Es característico de estos receptores no adaptarse al estímulo recibido, si bien suelen, pasado el tiempo, magnificar la sensación de dolor como mecanismo de alerta.

El estímulo doloroso, dependiendo del tipo que sea (agudo o crónico), se transmite por diferentes vías nerviosas hasta llegar al tallo cerebral y al tálamo, donde se desencadena la respuesta correspondiente. El cerebro tiene capacidad de controlar el grado de recepción de la señal del dolor mediante un sistema analgésico que libera sustancias de tipo opiáceo, tales como β -endorfina, metencefalina, levencefalina y dinorfina, entre otras⁽²⁹⁾.

El efecto de los salicilatos en la analgesia es probablemente debido a que inhiben la síntesis de prostaglandinas; este mecanismo fue propuesto por Vane en 1971^(22,30,51).

Las prostaglandinas son sustancias endógenas sintetizadas y almacenadas en todo el cuerpo, y fácilmente liberadas ante estímulos diversos.

Las prostaglandinas, dependiendo de su tipo, pueden ser vasodilatadoras o vasoconstrictoras, y son capaces de

sensibilizar receptores del dolor al estimular por vía mecánica o química^(29.30).

El alivio del dolor es de tipo periférico, y puede involucrar efectos sobre el SNC⁽²²⁾.

Los salicilatos son eficaces analgésicos contra dolores de intensidad baja o moderada, tales como cefaleas, mialgias, artralgias, entre otros. Son poco efectivos en dolor de tipo visceral^(15.22.44).

4.2.2 Antipiréssis

La fiebre puede ser producida por anomalías en el encéfalo, daño tisular, inflamación, rechazo de injertos, procesos malignos o por sustancias que afectan directamente los centros reguladores de la temperatura, los cuales se localizan en el hipotálamo^(15.22.44).

El efecto antipirético de los salicilatos depende de la normalización de las neuronas termosensibles y es de tipo no específico^(15.51). La caída de temperatura se debe también a la dilatación de vasos sanguíneos superficiales, permitiendo una disipación de calor acelerada⁽⁴⁴⁾.

4.2.3 Antiinflamación

Una inflamación es una manifestación de lesión tisular. Al dañarse un tejido, libera sustancias que producen ciertos cambios. Las características de una inflamación son: vasodilatación local, aumento de la permeabilidad de capilares, coagulación por fibrinógeno y otras proteínas y tumefacción celular. Entre las sustancias que producen inflamación se encuentran histamina, bradicinina, serotoninas, prostaglandinas, productos de reacción del sistema de coagulación de la sangre y linfocinas⁽²⁰⁾.

Los salicilatos son ampliamente usados en el tratamiento de procesos reumáticos e inflamatorios, tales como la artritis reumatoide o la fiebre reumática, entre otros^(15,22,44,51).

Debido a las propiedades farmacológicas principales de los salicilatos, se emplean para tratar padecimientos análogos a los que estas sustancias remedian.

4.3 FARMACOLOGIA BASICA DE LOS SALICILATOS

4.3.1 Absorción

La vía de absorción más frecuente para salicilatos es la oral⁽²²⁾. Actualmente, hay una gran variedad de formas

farmacéuticas para salicilatos, especialmente para la aspirina(87.88).

Ya sea que el salicilato se administre por vía oral en solución o en tabletas, la absorción del medicamento se lleva a cabo a través de las membranas del tracto gastrointestinal, principalmente en el estómago y la parte superior del intestino delgado(22.44.51.84), debido a que el pH estomacal favorece la forma no ionizada del salicilato. la absorción de salicilatos se da por difusión pasiva, y es un proceso rápido(15.22).

Otras vías de administración, tales como la rectal, disminuyen la velocidad de absorción. La vía dermal favorece una rápida absorción del salicilato.

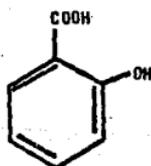
4.3.2 Distribución

Una vez absorbido, el salicilato pasa al plasma, distribuyéndose prácticamente por todo el organismo. Tanto en plasma como en tejido es transformado. La aspirina, por ejemplo, es hidrolizada por esterasas, formando acetato y salicilato(44.51).

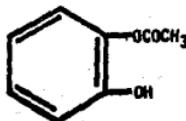
Los salicilatos se unen fuertemente a proteínas plasmáticas, en especial a la albúmina(15.84). La unión involucra al grupo carboxilo del salicilato(15).

4.3.3 Biotransformación

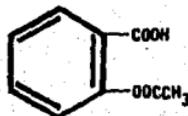
Los salicilatos son biotransformados en muchos tejidos, pero principalmente por el retículo endoplásmico y mitocondrias hepáticas; los metabolitos principales de los salicilatos son el ácido salicílico (conjugado con glicina), éter o glucurónido fenólico y el éster o acil glucurónido. Otros metabolitos son el ácido gentísico, el ácido 2,3-dihidroxibenzoico, y el ácido 2,3,5-trihidroxibenzoico (22,44,64). La figura 1b muestra un esquema propuesto por Smith(64) para sintetizar la biotransformación de los salicilatos.



ACIDO SALICILICO



METIL SALICILATO



ACIDO ACETIL SALICILICO

FIGURA 1a. SALICILATOS MAS EMPLEADOS EN LA TERAPEUTICA

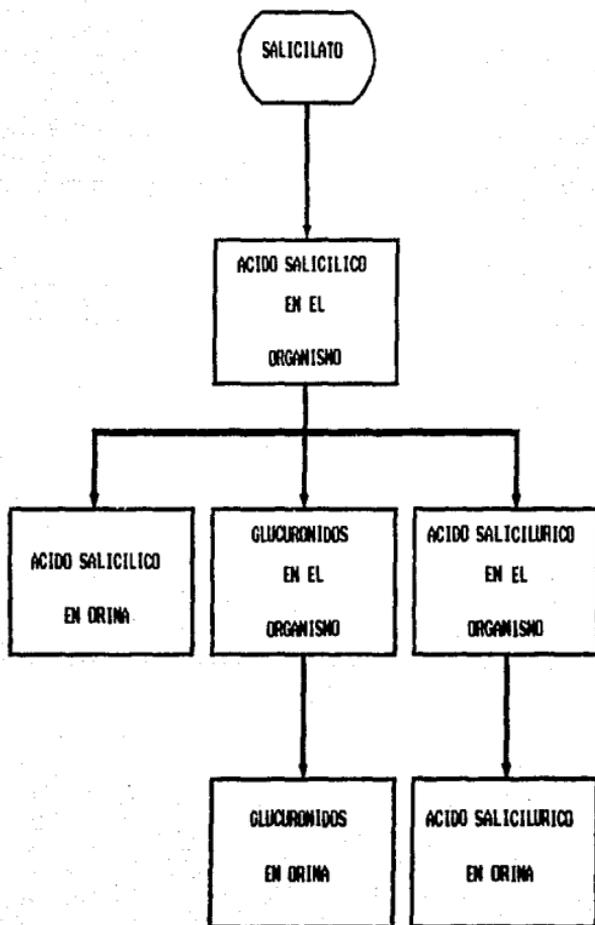


Figura 1b. METABOLISMO DE SALICILATOS

4.3.4 Excreción

Los salicilatos son excretados por vía urinaria, y se eliminan a modo de metabolitos. Poco salicilato se excreta sin ser biotransformado. El pH de la orina determina la cantidad de metabolito libre. Con orina alcalina, por ejemplo, se puede excretar hasta el 85% del salicilato en forma libre^(15,22,44,64).

4.4 TOXICOLOGIA

Las manifestaciones tóxicas originadas por la administración de salicilatos pueden dividirse en dos grupos:

a) Las originadas por consumo prolongado o crónico

En este caso, la intoxicación toma el nombre de salicilismo^(12,22,44,51,64,69), y presenta diversos síntomas tales como cefaleas, mareo, zumbido en los oídos, dificultad auditiva, visión borrosa, confusión mental, cansancio, somnolencia, sudoración, sed, hiperventilación, náusea, vómito diarrea y en ocasiones, alteraciones al SNC, fiebre, deshidratación y desequilibrio ácido-base^(12,22). Otro efecto secundario de importancia está relacionado con la producción de disturbios en la coagulación, al inhibirse la síntesis del Tromboxano A₂, que interviene en los procesos de agregación plaquetaria⁽¹⁸⁾.

También puede desarrollarse una hipersensibilidad a los salicilatos, aunque es una afección poco común^(22.84).

b) Intoxicación aguda

La intoxicación aguda se presenta cuando se ingieren elevadas cantidades de salicilatos (entre 10 y 30 gramos por día).

Los síntomas más frecuentes en la intoxicación aguda por salicilatos comprenden una hiperventilación excesiva que conlleva a una alcalosis respiratoria y posteriormente a una acidosis respiratoria y metabólica^(12.44). Los síntomas descritos en el salicilismo se presentan en su mayoría, acentuándose los disturbios en el SNC y la hipertermia.

El tratamiento para combatir tanto el salicilismo como la intoxicación aguda aparece en una serie numerosa de trabajos, y comprenden operaciones para abatir la sintomatología y la acidosis metabólica^(22.44.64.69).

5 LETIMIDA

5.1 GENERALIDADES DE LAS SALICILAMIDAS

Las salicilamidas son un grupo de sustancias derivadas del ácido acetil salicílico. La figura 2 muestra la estructura general de una salicilamida⁽¹⁵⁾.

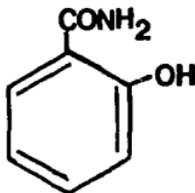


FIGURA 2. ESTRUCTURA DE LAS SALICILAMIDAS.

Las salicilamidas presentan una acción terapéutica igual a la de su precursor. Sin embargo, tienen actividad menor que los demás salicilatos^(15, 44, 51).

Otras características generales de las salicilamidas se resumen en el cuadro 10^(15, 51).

CUADRO 10. CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS SALICILAMIDAS.

- * En el hombre se metabolizan sin ser hidrolizadas a ácido salicílico.
- * Ejercen un efecto depresor más rápido sobre el SNC que los demás salicilatos.
- * Son menos irritantes que el ácido acetyl salicílico.
- * Presentan baja toxicidad aguda.
- * No alcanzan niveles elevados en plasma debido a que son rápidamente absorbidas y excretadas.
- * Se eliminan por filtración renal más fácilmente que los salicilatos.
- * Son eliminadas en gran parte como conjugados con glucurónido y como salicilamidas libres.
- * Presentan unión débil a proteínas.
- * Generalmente son administradas combinadas con otras sustancias, tales como el acetaminofén.

5.2 FARMACOLOGIA BASICA DE LA LETIMIDA

5.2.1 La letimida como salicilamida

La letimida, o clorhidrato de 3-[2-dietilaminoetil]-2H-1,3-benzoxacina-2,4[3H]-diona, es una salicilamida básica. La figura 3 presenta la estructura de esta sustancia.

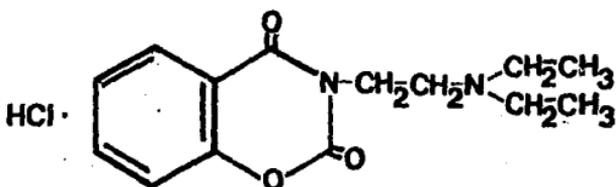


FIGURA 3. ESTRUCTURA DE LA LETIMIDA

Se pretende que el uso terapéutico principal de la letimida sea como analgésico, ya que no presenta actividad antipirética ni antiinflamatoria franca. Sin embargo, tiene una potencia analgésica mayor a la del ácido acetilsalicílico⁽⁷¹⁾.

La analgesia producida por la letimida ha sido probada mediante diversas técnicas en animales⁽⁷¹⁾, así como en seres humanos bajo diferentes condiciones de dolor, tales como el post-quirúrgico^(8,42,43,45,61), canceroso⁽⁸²⁾ o somático⁽⁶¹⁾. En todos los casos, la letimida administrada en una o varias dosis se comparó con

fármacos ya conocidos y con placebos, dando resultados favorables hacia una analgesia rápida y prolongada.

El efecto de la letimida puede explicarse considerando que presenta una absorción rápida y prácticamente cuantitativa durante la primera hora transcurrida después de la administración por vía oral^(39.40.55); el mismo fenómeno se llegó a observar en perros⁽⁵⁵⁾. La distribución del fármaco también se llevó a cabo con rapidez, encontrándose concentraciones elevadas en hígado y riñón⁽⁵⁵⁾. Por otro lado, la letimida al presentar unión débil a albúmina, permite que haya una concentración relativamente alta de fármaco libre, facilitando su acción terapéutica⁽⁷¹⁾.

5.2.2 Biodisponibilidad y biotransformación

La letimida, una vez en el plasma, sufre una ruptura del anillo formando el derivado fenólico N-[2-dietilaminoetil] salicilamida (DEAES), ya que el pH de la sangre favorece tal reacción⁽⁵⁵⁾. Una vez formado el DEAES, éste sufre una transformación rápida, teniendo una vida media de aproximadamente 2.38 horas en el hombre y de 2. horas en el perro^(39.40).

5.2.3 Excreción

En el hombre, la letimida es excretada durante las 24 horas siguientes a su administración, principalmente por vía urinaria (93.7%), a modo de conjugado con glucurónido y sulfatos; poca letimida es eliminada en forma libre. En heces la excreción es mínima (1.7%)^(39,40,55).

En perro, la excreción de la salicilamida es semejante a la del hombre, no ocurriendo lo mismo en la rata, la cual presenta una excreción en heces relativamente alta, tal vez debido a una absorción no cuantitativa. Asimismo, en rata se ha encontrado eliminación de letimida a través de la respiración, a modo de CO₂⁽⁵⁵⁾.

5.3 TOXICOLOGIA

5.3.1 Toxicidad aguda

Estudios realizados en ratones, ratas, cuyos y perros muestran que la letimida es tóxica para el SNC, observándose temblores y convulsiones como síntomas generales. La tabla 11 muestra los valores de DL₅₀ calculados para los animales tratados⁽⁵⁴⁾.

TABLA II. DL₅₀ DE LETIMIDA PARA ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Animal (mg/kg)	Dosis
Ratón	610
Rata	660
Cuyo	120
Perro	316

5.3.2 Toxicidad Subaguda

Los estudios de toxicidad subaguda practicados en ratas arrojan resultados negativos de toxicidad al no presentarse patologia en tejidos de diversos órganos. Tampoco se indican alteraciones en datos hematológicos⁽⁶³⁾.

5.3.3 Genotoxicidad

Estudios realizados en ratones y en linfocitos humanos indican que la letimida no es genotóxica, al no incrementarse la frecuencia de aberraciones cromosómicas ni de intercambio de cromátidas hermanas. Tampoco se encontró presencia de micronúcleos.

Se llegó a apreciar una ligera citotoxicidad en lo que a proliferación celular se refiere, sin embargo, al hacerse tal observación en un experimento *in vitro*, no se consideró significativo^(19 - 21).

5.5.4 Toxicidad en reproducción

En estudios de fertilidad, reproducción y desarrollo embrionario verificados en ratas, no aparece la letimida como un agente tóxico.

Las pruebas fueron realizadas tanto en ratas macho como hembra⁽²⁰⁾.

6 APARATO REPRODUCTOR DEL RATON MACHO

6.1 GENERALIDADES

El ratón macho, al ser un mamífero, presenta como constituyentes de su aparato reproductor órganos sexuales primarios, glándulas sexuales accesorias y genitales externos. La tabla 12 resume las características de estos órganos⁽⁴⁷⁾.

TABLA 12 ORGANOS CONSTITUYENTES DEL APARATO REPRODUCTOR DEL RATON MACHO

Constituyente	Organo	Medidas del órgano ^(*)	Función
Organos sexuales primarios	Testículo	6 x 4	Producción de espermatozoides
Glándulas sexuales secundarias	Próstata	4 x 4	Producción de fluidos seminales
	Vesícula seminal	13 x 4	
	Glándula bulbouretral	3 x 2	
Sistema tubular	Epididimo	N.M. ^(**)	Transporte de fluidos seminales
	Ducto deferente	N.M.	
	Uretra	N.M.	
Genitales externos	Pene		
	Escroto		

NOTAS: * Medidas expresadas en mm.

** Organos no medido.

En las figuras 4 y 5 están ilustrados los esquemas generales de los organos internos y externos del ratón macho.

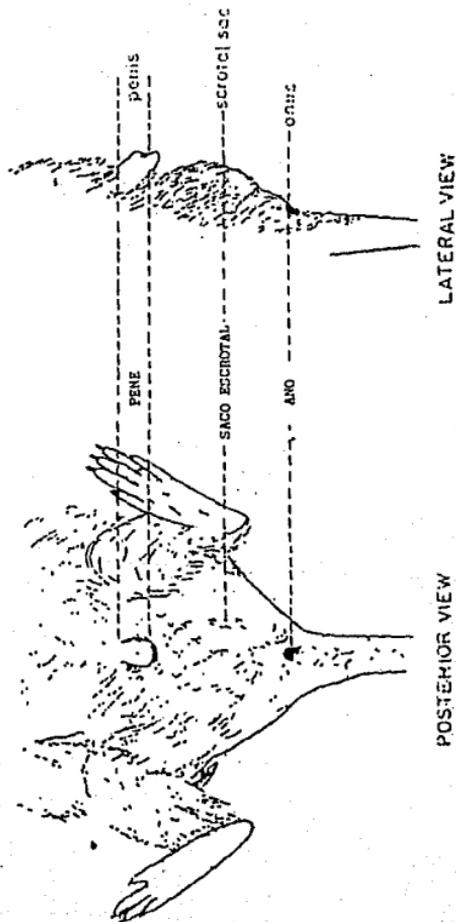


FIGURA 4. ORGANOS EXTERNOS DE APARATO REPRODUCTOR.

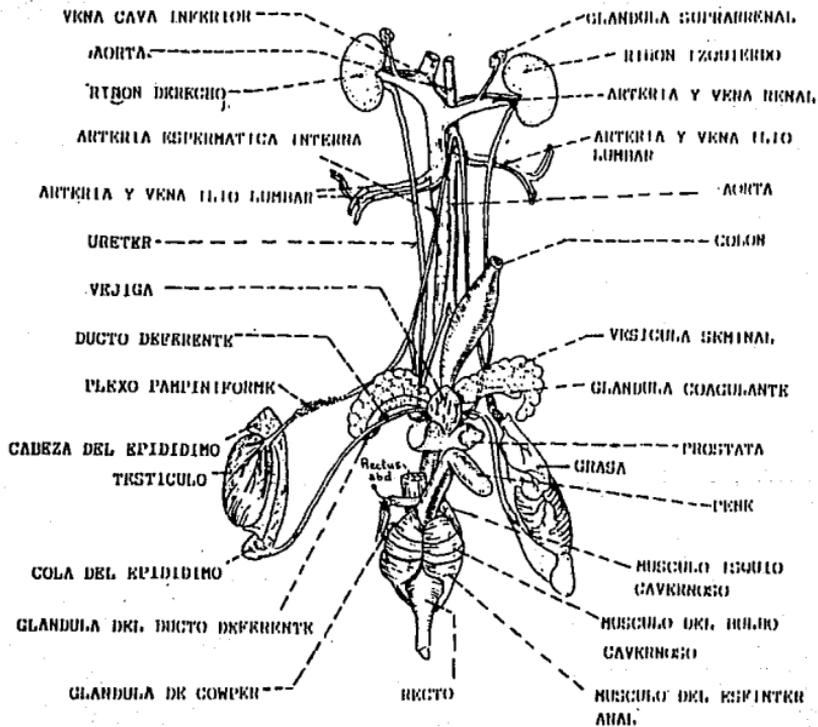


FIGURA 5. ORGANOS INTERNOS DEL APARATO REPRODUCTOR.

6.2 ANATOMIA Y FISILOGIA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL RATON MACHO

6.2.1 TESTICULOS

Los testiculos son una masa que puede tener forma ovalada o bien de pera, y son capaces de aumentar su tamaño en estados pubertarios. (47).

El ratón posee un par de testiculos los cuales se encuentran cubiertos por la túnica albuginea, formada por tejido conectivo fibroso. La túnica se proyecta hacia el interior del testiculo formando septos que dividen al órgano en lóbulos. Estos lóbulos contienen a los túbulos seminíferos donde se producen las células germinativas (espermatozoides) gracias a que poseen un epitelio seminífero (o espermatogénico) sustentado por una membrana basal rodeada por tejido conectivo fibroso; unidos a la membrana basal se encuentran las células de Sertoli, que cumplen la función de nutrir a las células germinativas, además de fungir importante actividad durante la espermatogénesis; de esta se tratará posteriormente.

Entre un túbulo y otro hay estroma intersticial, el cual se compone de linfa, sangre y células de Leydig, las cuales son responsables de la síntesis de testosterona.

La anatomía vascular del testículo está comprendida por la arteria espermática interna, la arteria testicular y por la red venosa asociada a ellas. La arteria testicular penetra el testículo en su parte superior y se ramifica formando arterias testiculares. Estas, a su vez, sufren múltiples ramificaciones hasta formar capilares que irrigan todo el testículo. Las venas correspondientes forman, al final, la vena testicular, la cual sale por la parte superior del órgano.

La figura 6 muestra un diagrama esquemático del testículo del ratón.

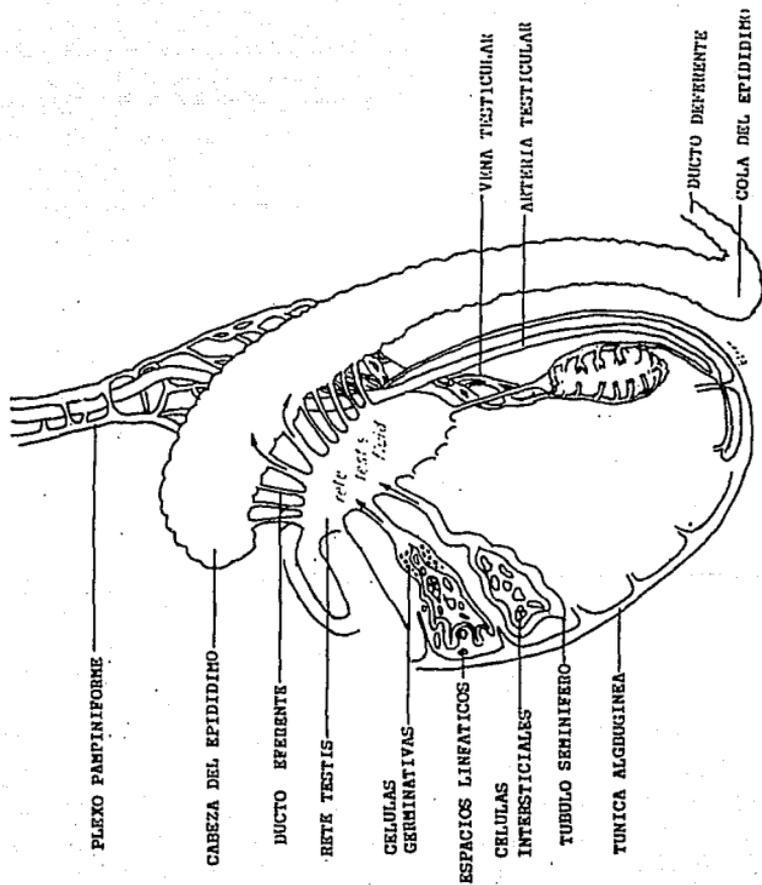


FIGURA 6 TESTICULO DE RATON

6.2.2 SISTEMA TUBULAR

El sistema tubular del aparato reproductor del ratón se compone del rete testis, ducto eferente, epididimo y ducto aferente. Todas estas estructuras son remanentes funcionales del sistema excretor embrionario, y se encuentran pareados^(5.47).

a) Rete testis

El rete testis es una estructura conformada por las porciones terminales de los tubos seminíferos, y en él, estos tubos vacían su contenido.

El rete testis presenta en su parte superior una cámara colectora, la cual se abre hacia los ductos eferentes.

b) Ductos eferentes

Los ductos eferentes se componen de dos partes: la primera es corta y convolucionada, y se encuentra rodeada de tejido graso. La segunda presenta mayor número de circunvoluciones y está rodeada de una cápsula de tejido conectivo⁽⁴⁷⁾.

c) Epididimo

El epididimo se compone de tres secciones importantes: cabeza, cuerpo y cola. La cabeza está compuesta por la parte terminal de los tubos eferentes, unidos entre sí por células epiteliales columnares, afianzadas a una

membrana de basamento. Asimismo, la cabeza del epidídimo se encuentra dividida en 7 u 8 lóbulos. En su parte final presenta un lumen estrecho, el cual se ensancha a través del cuerpo y la cola del órgano.

d) Ductos deferentes

Los ductos deferentes son una prolongación de la cola del epidídimo y se encuentra sustentado por células epiteliales. Presenta una capa mucosa y muscular, rodeando toda la estructura tejido conectivo. El ducto deferente desemboca en una ampulla y posteriormente a la uretra.

4.2.3 GLANDULAS ACCESORIAS

Las glándulas accesorias no intervienen directamente con la formación de espermatozoides, sino que aportan sustancias que permiten que la célula germinativa presente función y transporte adecuados.

a) Vesículas seminales

El ratón macho presenta un par de vesículas seminales. Estas son largas y lobuladas, curvas en sus puntas laterales y colocadas cerca del primer par de las glándulas prostáticas, sobre la vejiga^(5,47).

Las vesículas seminales tienen un lumen compuesto de protuberancias lobulares, así como de epitelio columnar secretor de material mucoso que contiene fructosa en abundancia, así como hormonas (prostaglandinas) y fibrinógeno. Al haber una eyaculación, cada vesícula vacía su contenido en el conducto eyaculador.

b) Glándulas coagulantes

Estas son el primero de tres pares de glándulas prostáticas, y secretan una sustancia que al mezclarse con otras secreciones, forma un coágulo.

Las glándulas coagulantes se componen de una membrana mucosa que se proyecta varias veces hacia el lumen. Presentan dos ductos alineados por células epiteliales cuboidales.

c) Glándulas ampulares

Se localizan alrededor de la base de los ductos deferentes y se abren hacia el vestíbulo de la ampulla. Presentan células cuboidales epiteliales.

d) Glándulas bulbouretrales (Cowper)

Son un par de glándulas grandes y muy cercanas al pene, en la sección externa de la pared del cuerpo; pueden ser tubulares o alveolares, y se encuentran rodeadas de músculo estriado, alineadas por epitelio columnar⁽⁴⁷⁾.

e) Glándulas prostáticas dorsales y ventrales

Se localizan por debajo de la vejiga. Tanto glándulas dorsales como ventrales tienen gran cantidad de ductos que penetran a la uretra, ya sea de forma lateral o ventral, respectivamente. Presentan secreción densa.

f) Glándulas prepuciales

Estas glándulas presentan secreción semejante a la de las glándulas sebáceas.

g) Próstata

La próstata secreta un líquido alcalino claro, de aspecto lechoso que contiene diversas sustancias.

La característica alcalina esencial del líquido prostático puede ser importante para una buena fertilización del huevo, pues el líquido del conducto deferente se relativamente ácido debido a la presencia de productos terminales del metabolismo de los espermatozoides, y, en consecuencia, inhibe la fertilidad de éstos.

El esperma no logra su mayor motilidad hasta que el pH de los líquidos se eleva. Por tanto, es probable que el líquido prostático neutralice la acidez de los demás fluidos después de la eyaculación y aumente la motilidad y fertilidad de los espermatozoides^(29,47).

En la tabla 13 se resumen todas las glándulas sexuales accesorias del ratón macho⁽⁴⁷⁾.

TABLA 13. GLANDULAS SEXUALES ACCESORIAS.

Glándula	Epitelio	Propiedades de la secreción
Ampular	Columnar simple o cuboidal	Líquido amarillento. Contiene ergotianeína, fructosa, ácido silícico y fósforo.
Seminal	Columnar simple o pseudoestratificado	Fluido blanco, amarillento o azulado de aspecto gelatinoso. Contiene fructosa, proteínas, ácido cítrico y ácido ascórbico.
Prostática	Columnar simple o pseudoestratificado	Líquido incoloro, conteniendo fibrinolisisina, fibrinogenasa, diastasa, anhidrasa carbónica amilasa, vesiculasa, fructosa ácido cítrico aminoácidos libres y cinc.
Bulbouretrales	Columnar simple	Fluido viscoso con sialoproteína.
Uretrales	Cuboidal simple	Fluido claro, acuoso. Contiene mucoproteínas.
Prepuciales	Escamoso estratificado	Contiene 7-dehidrocolesterol.

6.2.4 Uretra

La próstata y sus glándulas vacían sus contenidos en la uretra, la cual constituye la última etapa de unión entre el testículo y el exterior. Se encuentra provista de moco producido por las glándulas uretrales y bulbouretrales^(5.47).

6.2.5 Pene

Este órgano transfiere el semen del macho a la hembra. Se compone de tres cuerpos cavernosos eréctiles, uno delgado y dos más gruesos. El cuerpo más delgado es una extensión de la uretra; el lumen de ésta se expande formando un par de divertículos laterales. Este cuerpo cavernoso se rodea por un túnica albugínea, dentro de la cual encuentran fibras de músculo liso.

Los dos cuerpos gruesos también están rodeados por la túnica, que los separa entre sí en su sección proximal y casi los une en la distal.

El pene presenta un pequeño hueso que puede encontrarse en el septo fibroso entre los cuerpos cavernosos gruesos y se proyecta hacia el orificio del pene.

Las glándulas del pene se cubren con el prepucio, y la raíz del órgano se une al hueso púbico por el final de los cuerpos cavernosos.

6.3 ESPERMATOGÉNESIS

El término "espermatogénesis" tiene un significado sencillo, siendo éste el de "formación de esperma".

La espermatogénesis es un proceso que conlleva una serie de etapas que, una vez iniciadas, se llevan a cabo ininterrumpidamente durante la mayor parte de la vida del animal.

En el ratón macho, la espermatogénesis presenta el procedimiento que se resume en la figura 7⁽³⁴⁾.

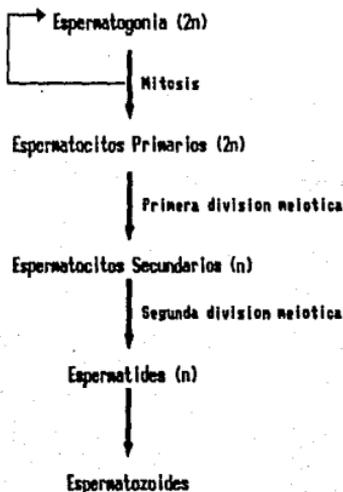


FIGURA 7. ESPERMATOGÉNESIS EN EL RATÓN

El proceso de espermatogénesis inicia desde la etapa embrionaria, ya que a partir del octavo día de gestación del ratón, las células germinativas masculinas aparecen, siendo éstas las únicas precursoras de los espermatozoides que se generarán en la pubertad del animal. Inicialmente, solo se producen cerca de 100 células, mas a los 12 días de gestación se han multiplicado a 5,000 gracias a un proceso mitótico que se suspende antes del nacimiento del ratón y se mantiene latente. Estas células son las llamadas espermatogonias⁽⁵⁶⁾.

Las espermatogonias se clasifican en tres tipos: espermatogonias tipo A, espermatogonias intermedias y espermatogonias tipo B. Las espermatogonias de tipo A son células grandes y presentan una cromatina muy fragmentada. Cada célula es capaz de dividirse en dos, y estas a su vez vuelven a sufrir división. De las cuatro células formadas, tres se dividen por tercera vez, mientras que la cuarta no; las células obtenidas de la tercera división celular son las espermatogonias intermedias; estas originan las espermatogonias de tipo B, que son de menor tamaño que las de tipo A, además de que presentan una cromatina más filamentososa que la de sus predecesoras⁽⁵⁶⁾.

Las espermatogonias de tipo B dan origen a los espermatoцитos primarios. Dentro de la espermatogénesis, la etapa de espermatoцитo primario es una de las más largas y más importantes, debido a que en ésta se da la síntesis premeiótica de DNA, atravesando por varias fases, tales como leptóteno, cigóteno, paquíteno, diplóteno y diaquinesis. Al término de la duplicación de DNA, los espermatoцитos primarios poseen un número tetraploide de cromosomas⁽⁵⁶⁾.

Una vez llevada a cabo la primera meiosis, los espermatocitos primarios dan origen a los espermatocitos secundarios, ya sea por una división cuantitativa mitótica (sin alterar las características adquiridas) o bien por una división reduccional meiótica (separando alelos). Independientemente la división que se siga, los espermatocitos secundarios resultantes presentan un número haploide de cromosomas.

Ya formados los espermatocitos secundarios, estos darán origen a las espermátidas. Cada espermatocito secundario es capaz de dividirse en cuatro espermátidas. Una espermátida posee una serie de organelos tales como mitocondrias, ribosomas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y numerosos cuerpos vesiculares y granulados que pueden dar origen al espermatozoide o bien durante la formación de éste pueden desaparecer⁽⁵⁸⁾.

En la transformación de la espermátida a espermatozoide se suceden una serie de eventos. El citoplasma de la espermátida empieza a ser extraído de la célula junto con algunos de sus organelos, que una vez fuera de la espermátida toman el nombre de cuerpos residuales. Tales cuerpos sufren alteraciones, que a continuación se enumeran:

- 1.- Liberación de gránulos por ruptura de cuerpos multigranulares.

- 2.- Secuestro de gránulos, ribosomas y reticulo por las vacuolas de doble membrana de la lamela del aparato de Golgi.
- 3.- Aparición de vacuolas citoplasmáticas.
- 4.- Fragmentación.
- 5.- Migración periférica de fragmentos hacia paredes tubulares y posterior fagocitosis por las células de Sertoli.

Mientras estos fenómenos se suceden, el material nuclear pierde su identidad y se aloja en el incipiente acrosoma formado por el aparato de Golgi; el RNA es eliminado junto con los cuerpos residuales. La membrana celular de la espermátida en transformación se elonga cubriendo la totalidad del espermatozoide, mientras que las mitocondrias y los centriolos se colocan debajo del acrosoma para conformar la cola.

Cuando el espermatozoide se ha formado, la membrana celular se separa liberándolo. Tanto membrana como citoplasma remanente sufren fagocitosis por las células de Sertoli.

Todas las células participantes en el proceso espermatogénico han sido estudiadas ampliamente e identificadas por Lam, Furrer y Bruce (1970) mediante técnicas cinéticas de velocidad de sedimentación⁽³⁴⁾.

El espermatozoide del ratón (Figura 9) varía en longitud, ancho y forma, dependiendo de la especie del animal, sin embargo, presenta características comunes, tales como una cabeza de aproximadamente 0.0080 mm de longitud, con un extremo en gancho, una sección media y una cola que en promedio tiene 0.1226 mm de longitud. El movimiento característico de la cola (movimiento flagelar) está promovido por mecanismos enzimáticos de las mitocondrias y auxiliado por el centriolo de la porción central.

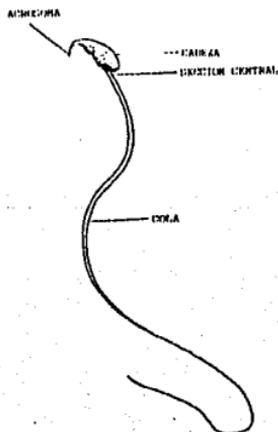


FIGURA 9. ESPERMATOZOIDE DE RATON

Dentro del proceso de espermatogénesis, las células de Sertoli cumplen un papel muy importante, ya que son las responsables de nutrir y sustentar a las espermatidas durante su transformación a espermatozoides. Según Roosen-Runge (1962), cada célula de Sertoli es capaz de nutrir alrededor de nueve espermatidas. Inclusive, una espermatida puede estar nutrida por dos células de Sertoli a través de un puente citoplasmático⁽⁵⁸⁾.

Durante la espermatogénesis, no todas las espermatogonias son capaces de finalizar el ciclo satisfactoriamente, ya que muchas células mueren antes de convertirse en espermatozoide debido a factores tanto internos como externos, incluyendo los ambientales (radiaciones o agentes químicos). Asimismo, una célula germinativa puede morir en cualquier etapa del ciclo.

Al ser la espermatogénesis un proceso continuo, se puede hablar de una "oleada espermática". Este término fue introducido por Von Ebner en 1871 para explicar satisfactoriamente la constante producción de células sexuales masculinas y la relación existente entre las etapas del ciclo espermatogénico. Esta "oleada espermática", al darse en el túbulo seminífero, presenta en el ratón una extensión de 18 mm, considerando todas las áreas testiculares ocupadas por una secuencia de etapas del ciclo⁽⁵⁸⁾.

Como ocurre en cualquier mamífero, la espermatogénesis en el ratón se inicia cuando el animal ha llegado a la pubertad, y el organismo es capaz de liberar hormonas. No obstante, la formación de espermatozoides no se inicia en forma abrupta; Albert y Roussell

(1983, 1984) demostraron que el cambio en la concentración, motilidad y morfología de los espermatozoides durante la pubertad del ratón eran diferentes a los del mismo animal al alcanzar la madurez sexual completa, y que inclusive, estos parámetros también varían con la cepa de ratón, principalmente en edades púberes^(1,2). Krzanowska (1981) llegó a establecer que durante la pubertad de los animales hay un gran número de espermatozoides deformes, pero tales anomalías disminuyen notoriamente cuando se alcanza madurez sexual⁽³³⁾.

Aunado a lo anterior, la espermatogénesis puede verse influida por la alimentación del animal. Investigaciones de Blank y Desjardins (1984) y de Komatsu *et al* (1982) demostraron que la restricción alimenticia prolongada puede afectar severamente el ciclo, induciendo oligospermia y azoospermia⁽⁴⁾.

6.4 INDUCCION DE ANOMALIAS EN ESPERMATOZOIDES. AGENTES ALQUILANTES.

No sólo factores internos como la cepa, la edad del animal o la alimentación pueden influir en la espermatogénesis y en la morfología y motilidad del espermatozoide. Existen también agentes externos tales como sustancias químicas o radiaciones que alteran estos parámetros. Wyrobek (1975, 1983), entre otros investigadores, ha demostrado la capacidad de gran cantidad de agentes químicos de inducir anomalías en espermatozoides. Se ha llegado a encontrar que la mayor parte de las sustancias clasificadas como carcinógenas,

mutágenas y teratógenas pueden inducir anomalías espermáticas^(73 - 75).

Dentro de este grupo de sustancias, se encuentran los agentes alquilantes o radiomiméticos, entre los cuales se incluye al busulfán. Estos poseen uno o más grupos activos capaces de reaccionar por alquilación y presentan un mecanismo de acción semejante al de las radiaciones ionizantes, de ahí que tengan un uso amplio en quimioterapia contra diversos tipos de cáncer (incluyendo la leucemia)^(1, 58).

En general, los agentes alquilantes se constituyen de uno o más grupos funcionales, y un grupo transportador. De esta manera, la fórmula general de un agente alquilante será $(A)_n-R$, donde A es el grupo funcional, n el número de ellos y R el grupo transportador. Dependiendo del valor de n, los agentes alquilantes se dividen en monofuncionales o polifuncionales.

Desde el punto de vista químico, los agentes alquilantes se dividen en cinco series: serie de los 2-halogenoalquil sulfuros, serie de las 2-halogenoalquilaminas, serie de las etilenaminas, serie de los epóxidos y serie de los sulfoniloalcanos (a este último grupo pertenece el busulfán)⁽⁵⁸⁾.

Los efectos biológicos de los agentes alquilantes son variados, tales como alteración de la morfología de los cromosomas (en especial los de las células en mitosis), inhibición de la división celular, efecto mutagénico y efecto carcinógeno, ocasionado

El busulfán es capaz de producir efectos adversos contra la fertilidad y el desarrollo normal de fetos. Pinto Machado (1968) demostró que la sustancia induce malformaciones y crecimiento anormal en ratones, y que inclusive se altera considerablemente la morfología tanto de ovarios como de testículos en productos cuyas madres fueron tratadas con busulfán^(1,72).

Albert (1985) establece el efecto que ejerce el busulfán sobre los espermatozoides epididimarios de ratones púberes, corroborando el efecto adverso de la sustancia sobre los parámetros de motilidad, cuenta y morfología espermática, redundando lo anterior en un número elevado de dominantes letales⁽¹⁾. Previamente, Viguié-Martínez (1984) demostró que el busulfán administrado a ratas hembra gestantes produce disminución de los niveles de testosterona en crías macho, así como una baja en el número de células de Leydig y Sertoli⁽⁷²⁾.

Lo anterior repercute en una deficiente retroalimentación hormonal del eje hipotálamo-pituitario, obligando a éste a producir un exceso de gonadotropina⁽⁷²⁾.

7 DISEÑO EXPERIMENTAL

7.1 MATERIALES

7.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se emplearon ratones macho cepa NRM1 de 9 semanas de edad y ratones hembra entre 7 y 9 semanas de edad.

7.1.2 MATERIAL DE TRABAJO

1) Acondicionamiento y estancia de los animales

- * Los animales se alojaron en jaulas individuales de acero inoxidable y se mantuvieron en un local con temperatura de 23 ± 1 °C, humedad relativa del 50% y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas cada uno, iniciando el periodo de luz a las 8:00 horas.
- * Los ratones tuvieron libre acceso a agua y alimento convencional para roedores.
- * Solución alcohólica de ácido picrico.
- * Hisopos de algodón.

2) Administración

- * Cánula curva para administración.
- * Jeringuillas desechables de plástico de 1 ml (especiales para insulina).
- * Agua destilada.
- * Letimida (proporcionada por el Dr. Enrique Hong del Departamento de Farmacología y Toxicología del CINVESTAV)
- * Busulfán

3) Sacrificio de ratones macho y hembra

- * Tabla de madera
- * Pinzas y tijeras de disección
- * Pinzas y tijeras de microcirugía
- * Vidrios de reloj de 7.5 cm de diámetro
- * Jeringa desechable de plástico de 10 ml
- * Aguja para insulina con punta recortada
- * Pipetas Pasteur (3 para cada ratón macho)
- * Portaobjetos
- * Cubreobjetos
- * Cajas de Petri
- * Pipetas serológicas de 1 ml
- * Cámara de cuenta de eritrocitos (Neubauer)
- * Solución salina 0.9%
- * Solución Ringer - Formol
- * Solución etanol - ácido acético 10:1

- * Solución de sulfuro de amonio al 20%
- * Estereomicroscopio
- * Microscopio con fuente de luz integrada
- * Filtro para contraste
- * Parrilla eléctrica de calentamiento regulable

7.2 METODO

Antes de exponer detalladamente cada fase del experimento, es pertinente hacer una serie de consideraciones a fin de que el desarrollo del método se comprenda en su totalidad.

En el diagrama de flujo de la figura 11 se muestra el experimento completo. Como se aprecia, éste se encuentra dividido en dos etapas principales:

- 1.- Tratamiento de los ratones macho, en donde se evalúa si el fármaco probado produce algún efecto sobre la fertilidad de los animales.
- 2.- Estudio de reversibilidad, en el cual se observa si la suspensión en la administración del medicamento permite que la fisiología y anatomía eventualmente alteradas se reestablezcan.

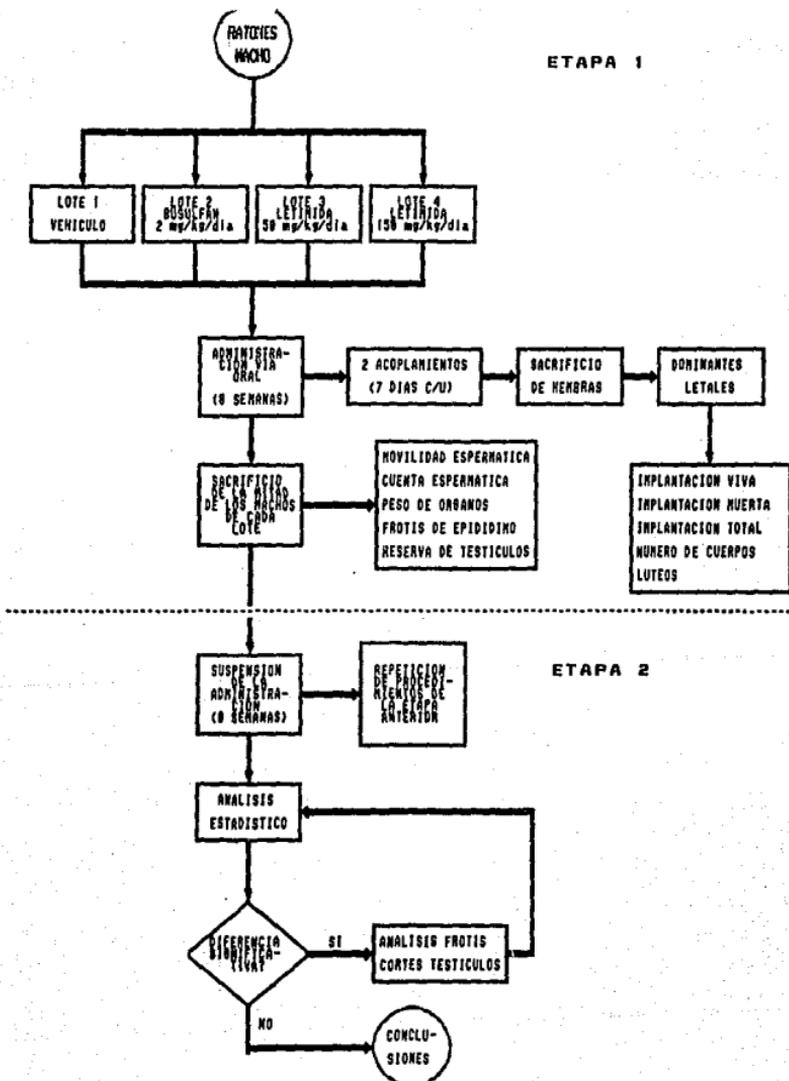


FIGURA 11 DIAGRAMA DE FLUJO

Una sección que aparece tanto en la primera como en la segunda etapa del experimento es la que involucra los acoplamientos con ratones hembra y el posterior estudio que se hace sobre ellas; esta sección es conocida como estudio de dominantes letales, y se aplica a las pruebas de fertilidad como una fase complementaria a modo de índice de fertilidad.

7.2.1 Recepción, distribución y acondicionamiento de animales

75 ratones macho de la cepa NRM1 con 6 semanas de edad y un peso promedio de 27 gramos en el momento de recibirse, se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos. A dos de ellos se les administró por vía oral letimida a dosis de 50 y 150 mg/kg/día, respectivamente; un tercer lote constituyó el testigo negativo, al que se le administró agua y el restante, testigo positivo que recibió busulfán en suspensión, preparado a partir de tabletas de Myleran (Laboratorios Wellcome) en dosis de 2 mg/kg/día

Los animales se marcaron con una solución alcohólica de ácido pícrico, aplicado mediante un hisopo de algodón. Esto con la finalidad de realizar adecuadamente la distribución aleatoria de los animales, así como para llevar posteriormente un mejor control de los mismos.

Cada animal se colocó en una jaula de acero inoxidable, la cual estaba dotada de una charola con cama de aserrín estéril y adaptada a una batería. Previo el experimento y durante él, los animales estuvieron en un local con temperatura de $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, humedad relativa del 50% y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas cada uno, iniciándose el periodo de luz a las 8:00 horas.

Los ratones tuvieron acceso a alimento convencional y agua *ad libitum*.

El aserrín les fue cambiado al menos una vez por semana; también una vez por semana se renovó el alimento y se lavaron los bebederos con agua corriente y escobillón; los tapones se hirvieron durante 20 minutos.

7.2.2 Administración

Durante 8 semanas los ratones macho fueron administrados diariamente con la dosis de letimida, busulfán o vehículo.

La letimida se disolvió en agua destilada como vehículo; el busulfán se preparó mediante la pulverización de una tableta de Myleran (Laboratorios Wellcome) y fue suspendida también en agua destilada.

La administración se realizó por vía oral, empleando una cánula curva y una jeringuilla desechable de 1 ml. A cada animal se le administró un volumen constante. Se registró el aumento ponderal y, para la administración se tomó en cuenta el peso semanal de los animales.

7.2.3 Acoplamientos y sacrificio de hembras

Transcurridas 4 y 7 semanas de tratamiento, los ratones macho se sometieron a un primer y segundo acoplamiento respectivamente con una hembra virgen para cada macho.

Cada hembra tenía de 7 a 9 semanas de edad, y peso promedio de 30.4 gramos.

Los animales se aparearon durante una semana; transcurrido ese tiempo, las hembras se separaron de sus parejas, colocándose en jaulas aparte. Después de 16 días de iniciado el acoplamiento, y considerando el primer día de comenzado éste como día 0 de gestación, las hembras fueron sacrificadas por dislocación cervical.

Una vez sacrificadas las hembras se procedió a extraer ovarios y úteros. Los ovarios se limpiaron de tejido y

grasa, colocándose en una caja de Petri para su estudio.

El útero fue también limpiado y posteriormente se procedió a hacer un corte longitudinal del órgano, de punta a punta para poder exponer a los productos e implantaciones. Una vez hecho esto, se llevó a cabo la cuenta de implantaciones vivas y muertas bajo los siguientes criterios:

a) Implantaciones vivas

Producto completo en cuanto a anatomía gruesa y con un saco amniótico bien definido y turgente. Se muestra una irrigación abundante.

b) Implantaciones muertas

Producto mal irrigado, de color blanquecino, mal formado o comenzándose a reabsorber. Saco amniótico poco turgente. También se considera implantación muerta una reabsorción total donde sólo se aprecia una mancha en el lugar de la implantación.

Las implantaciones vivas y muertas se contaron separadamente, tanto para la parte derecha como para la izquierda del útero. Para hacer una cuenta adecuada, se

separaron cuidadosamente los productos normales de las implantaciones, retirándolos con la placenta.

Para el recuento de las implantaciones el útero se sumergió durante 5 o 7 minutos en una solución acuosa de sulfuro de amonio al 10%. Pasado este tiempo, se extendió el útero sobre una hoja de papel bond blanca, para "revelar" y contar las implantaciones verdaderas, considerando también las reabsorciones y las que presentaron productos muertos.

Los ovarios, previo a su estudio y para conservar su humedad se colocaron en cajas de Petri con gotas de solución salina acuosa al 0.9%, conservando su colocación en el animal (izquierda, derecha). La caja de Petri se colocó bajo un estereomicroscopio y con ayuda de pinzas de microcirugía se procedió a la cuenta y separación de cuerpos lúteos, que se aprecian como protuberancias bien definidas, de color rosa o rojizo.

7.2.4 Sacrificio de machos

Una vez concluidos los acoplamientos con las hembras, se sacrificaron la mitad de los ratones de cada uno de los cuatro lotes. Para cada animal se hicieron las siguientes determinaciones:

1.- Evaluación de motilidad espermática y frotis de cabeza de epididimo.

Cada ratón fue sacrificado por dislocación cervical; posteriormente se disectó el epididimo derecho y se procedió a hacer un corte en la cabeza del mismo, haciéndose un frotis de esta sección sobre un portaobjetos. Bajo el estereomicroscopio se colocó la parte restante del epididimo y con unas tijeras de microcirugía se hizo un corte en la parte media del órgano, justo sobre las circunvoluciones que dividen el cuerpo de la cola del epididimo. El corte se hizo siguiendo la trayectoria del vaso sanguíneo que irriga esa zona, y una vez separada la cola, se colocó en un vidrio de reloj conteniendo 0.5 ml de solución salina 0.9%. Por medio de una aguja insulínica con punta recortada, y montada en una jeringa de plástico desechable de 10 ml, se perfundió 0.5 ml de solución salina a través del epididimo, ensartando la aguja por el extremo terminal de la cola del órgano.

Gracias al volumen de aire inyectado al mismo tiempo que la solución salina, los espermatozoides son extraídos de la cola del epididimo hacia el vidrio de reloj.

Terminada la perfusión, en el vidrio de reloj se encontraban los espermatozoides disueltos en un volumen total de 1 ml de solución salina.

El vidrio de reloj se colocó en una parrilla a 37 °C para favorecer la homogeneización de los espermatozoides (y mantener las condiciones fisiológicas). Con una pipeta Pasteur y una perilla se tomó una muestra de la solución y se colocó una gota sobre un portaobjetos.

Tras cubrirla con un cubreobjetos, se observó la totalidad del campo bajo microscopio de contraste con objetivo de 10X en número de espermatozoides vivos (movimiento ágil y cruzando el campo) y de espermatozoides muertos (sin movimiento alguno); por diferencia se obtuvieron los espermatozoides con motilidad disminuida (movimiento *in situ*).

Las observaciones se expresaron en porcentaje.

2.- Frotis de cola de epididimo

Una vez evaluado el porcentaje de motilidad, se tomó con una pipeta Pasteur otra muestra de la suspensión de espermatozoides y se colocó en un portaobjetos. Con ayuda de otro, se extendió la gota y se colocó sobre la parrilla hasta que se secara.

Tanto frotis de cola como de cabeza de epididimo se colocaron en un estuche porta preparaciones, esto con la finalidad de conservar muestras para un estudio más detallado en caso de encontrarse un daño provocado por la letimida.

3.- Disección y peso de órgano de aparato reproductor

El testículo derecho fue limpiado de grasa y tejidos ajenos al órgano. Se colocó sobre un papel aluminio pesado previamente. Se repitió la operación con el testículo, el epididimo y la vesícula seminal izquierdos.

4.- Cuenta de espermatozoides en cámara de eritrocitos (Cámara de Neubauer)

Con una pipeta serológica de 1 ml se tomaron 0.2 ml de la suspensión de espermatozoides indicados en el inciso 1) y se colocaron en un vidrio de reloj a temperatura ambiente.

Con una segunda pipeta serológica se tomaron 0.2 ml de solución Ringer - Formol y se homogenizó con la muestra tomada previamente, por medio de una pipeta Pasteur. Con esta misma pipeta se tomó una muestra

y se colocaron un par de gotas en la cámara de Neubauer

La cámara se colocó en el microscopio y se hizo la cuenta correspondiente para posteriormente calcular el número de espermatozoides, mediante la fórmula:

$$\frac{N \times 1,000 \times 2}{0.02}$$

Donde: N = Promedio del número de espermatozoides contados en cada cámara

1,000 =

2 = Número de cámaras contadas

0.02 = Alicuota de muestra tomada

El resultado obtenido se expresó en millones/ml.

7.2.5 Estudio de reversibilidad

Los ratones macho que no fueron sacrificados, se sometieron al estudio de reversibilidad. Para tal efecto, la administración de letimida, busulfán y agua destilada se suspendió en su totalidad, y se repitieron dos apareamientos con hembras, esta vez a la 10 y 13 semanas de iniciado el tratamiento original y bajo las mismas condiciones de los apareamientos anteriores. Se llevaron a cabo idénticas técnicas de sacrificio para hembras y machos descritas previamente.

7.2.6 Análisis estadístico de datos

Se empleó el Análisis de Variancia Unifactorial con prueba de contraste de medias de Neuman - Keuls. El nivel de significación establecido fue de $P < 0.05$ para determinar diferencias entre tratamientos. Con el fin de establecer la reversibilidad del tratamiento con letimida, se empleó t de Student entre los datos del primer y segundo sacrificio.

8 RESULTADOS Y DISCUSION

8.1 MOTILIDAD ESPERMATICA

Los resultados obtenidos con respecto a la evaluación de la motilidad espermática tanto en el primer como en el segundo sacrificio se muestran en la Tabla 14.

TABLA 14 MOTILIDAD ESPERMATICA

		% Vivos	% Muertos	% Deficientes
Primer Sacrificio (9 Se- manas)	Vehiculo	80.0 ± 25.4	11.8 ± 13.4	12.3 ± 16.22
	Busulfán 2 mg/kg	10.2±2.23**	82.8 ± 8.2	2.1 ± 1.6
	Letimida 50 mg/kg	78.7 ± 12.3	27.8 ± 12.1	27.6 ± 37.5
	Letimida 150 mg/kg	51.3±33.9**	37.3 ± 34.0	19.6 ± 22.2
Segundo Sacrificio (14 Se- manas)	Vehiculo	89.5± 6.3	6.1 ± 2.8	2.2 ± 2.0
	Busulfán 2 mg/kg	2.1± 2.73	46.7 ± 47.0	9.8 ± 17.9
	Letimida 50 mg/kg	47.5± 3.8**	33.0 ± 34.0	17.0 ± 26.3
	Letimida 150 mg/kg	80.8 ± 6.8	10.5 ± 4.7	9.0 ± 3.8

* p < 0.05 y ** p < 0.01 para comparación entre tratamientos

• p < 0.05 y •• p < 0.01 para comparación entre sacrificios

Con respecto al porcentaje de espermatozoides vivos en el primer sacrificio se observa una diferencia significativa en la dosis de 150 mg/kg/día de letimida (dosis alta) con respecto al vehiculo y con respecto a la misma dosis en el segundo sacrificio; esta diferencia se atribuye a un error en el manejo de las muestras de espermatozoides ocasionado por fallas en la regulación automática de

la temperatura de la parrilla eléctrica. No se considera determinante de una relación dosis-respuesta debido al peso obtenido de los testículos, como se observa más adelante (12).

El error de la parrilla se corrigió mediante regulación manual de la temperatura y con observación continua con un termómetro de mercurio.

En el segundo sacrificio se observa una diferencia significativa en la dosis de letimida de 50 mg/kg/día, ocasionada por la utilización accidental de pipetas Pasteur conteniendo residuos de mezcla de alcohol ácido. No se atribuye a algún efecto de la letimida el no presentarse significación entre sacrificios, así como por el peso de los órganos obtenidos de los animales tratados.

El busulfán por ser el testigo positivo empleado en el experimento, determinó una diferencia altamente significativa en relación a las demás sustancias.

En relación al porcentaje de espermatozoides muertos, la única diferencia significativa la presentó el testigo positivo. La motilidad disminuida (espermatozoides in situ) no mostró significación en ninguna de las sustancias empleadas (13).

FIGURA 12. MOTILIDAD ESPERMÁTICA, X ESPERMATOZOIDES VIVOS

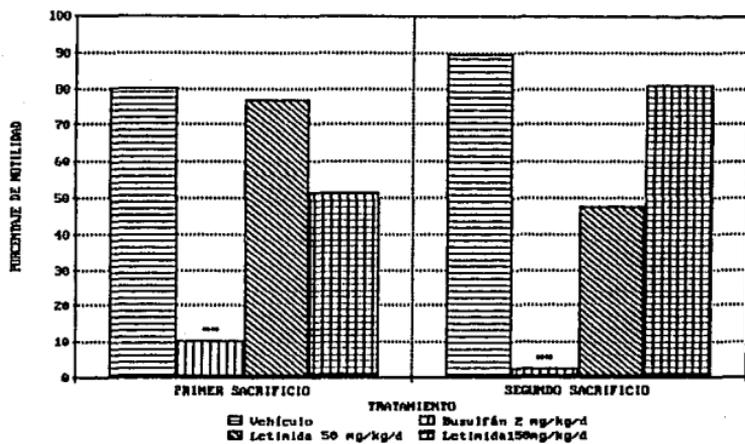
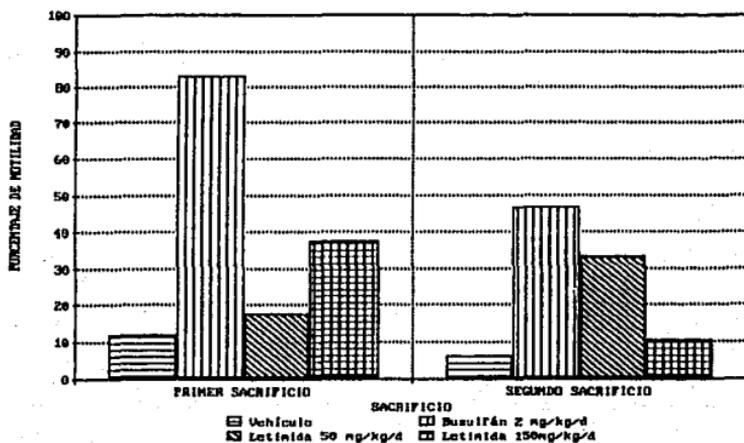


FIGURA 13. MOTILIDAD ESPERMÁTICA X ESPERMATOZOIDES MUERTOS



8.2 CUENTA ESPERMÁTICA

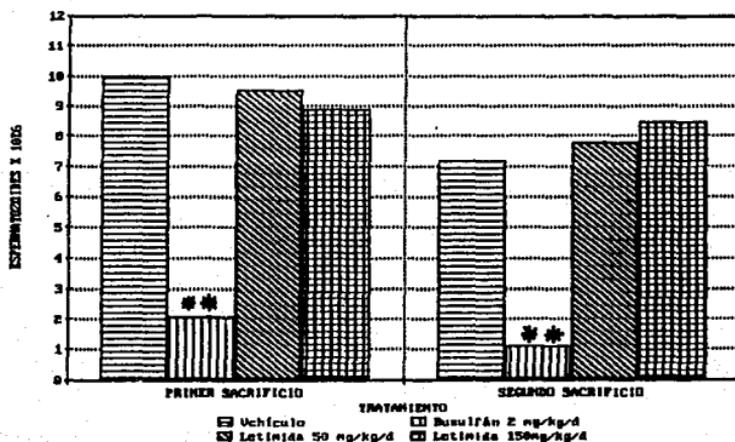
La Tabla 15 resume los valores de cuenta espermática en millones/mililitro, mientras que la Figura 14 muestra gráficamente los datos.

TABLA 15. CUENTA ESPERMÁTICA (millones/ml)

	Primer Sacrificio (9 Semanas)	Segundo sacrificio (14 Semanas)
Vehículo	9.9 ± 3.8	7.1 ± 1.7
Busulfán 2 mg/kg/día	2.1 ± 1.6**	1.1 ± 1.3**
Letimida 50 mg/kg/día	9.5 ± 3.2	7.7 ± 2.3
Letimida 150 mg/kg/día	8.8 ± 4.5	8.4 ± 2.4

NOTA: * p < 0.05 ** p < 0.01 entre tratamientos

FIGURA 14. CUENTA ESPERMÁTICA (millones/ml)



Como se puede observar, no se presenta ninguna diferencia significativa de las dosis de letimida con respecto al testigo negativo, por lo que se asume que la letimida no afecta este parámetro.

8.3 PESO DE ORGANOS

Durante el análisis estadístico y para facilidad de manejo de los datos del peso de los órganos disectados de los ratones macho, las cantidades obtenidas se refirieron a peso relativo, es decir, transformando el peso del órgano al peso que tendría si el ratón pesara 100 gramos.

Las Tablas 16, 17, 18 muestran los datos generales encontrados para los diferentes órganos obtenidos: testículos (derecho e izquierdo), vesícula seminal y epididimo, respectivamente.

TABLA 16 PESO RELATIVO DE ORGANOS (g/100g)

		Testículo Derecho	Testículo Izquierdo
Primer Sacrificio (9 Se- manas)	Vehículo	0.297 ± 0.029	0.283 ± 0.032
	Busulfán 2 mg/kg/día	0.122 ± 0.082**	0.18.1 ± 0.085**
	Letimida 50 mg/kg/día	0.326 ± 20415	0.390 ± 0.246
	Letimida 150 mg/kg/día	0.322 ± 0.032	0.312 ± 0.037
Segun- do Sacrificio (14 Se- manas)	Vehículo	0.301 ± 0.032	0.286 ± 0.038
	Busulfán 2 mg/kg/día	0.191 ± 0.064**	0.181 ± 0.064**
	Letimida 50 mg/kg/día	0.312 ± 0.012	0.292 ± 0.010
	Let 150 mg/kg/día	0.309 ± 0.018	0.285 ± 0.039

* p < 0.05 ** p < 0.01

Como se puede observar, no se presenta diferencia significativa en el peso de los testiculos de los animales tratados con letimida. Esto es un indicio de que el fármaco aparentemente no afecta la morfología del órgano. Los resultados anteriores constatan la no significación mediante sus respectivos gráficos de barras (Figura 15 y 18) y de datos experimentales (figuras 16, 17, 19, 20).

FIGURA 15. PESO RELATIVO DEL TESTICULO DERECHO

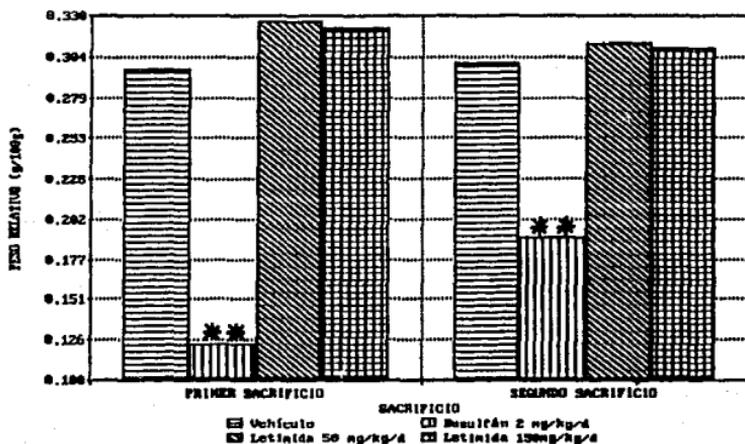


FIGURA 16. PESO RELATIVO DEL TESTICULO DERECHO, PRIMER SACRIFICIO

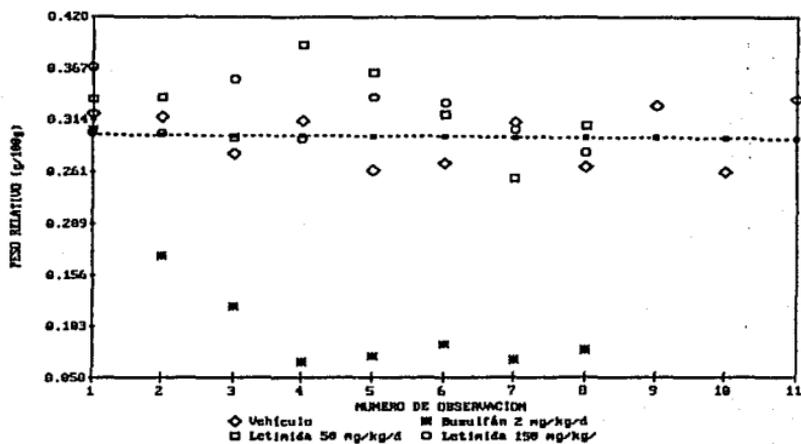


FIGURA 17. PESO RELATIVO DEL TESTICULO DERECHO, SEGUNDO SACRIFICIO

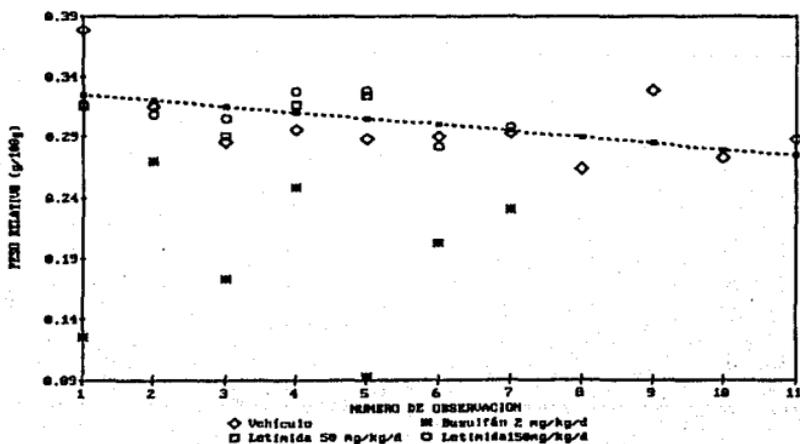


FIGURA 18. PESO RELATIVO TESTICULO IZQUIERDO

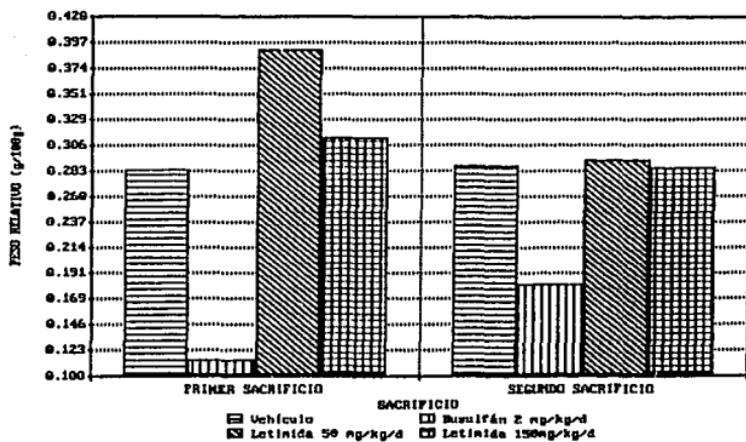


FIGURA 19. PESO RELATIVO TESTICULO IZQUIERDO, PRIMER SACRIFICIO

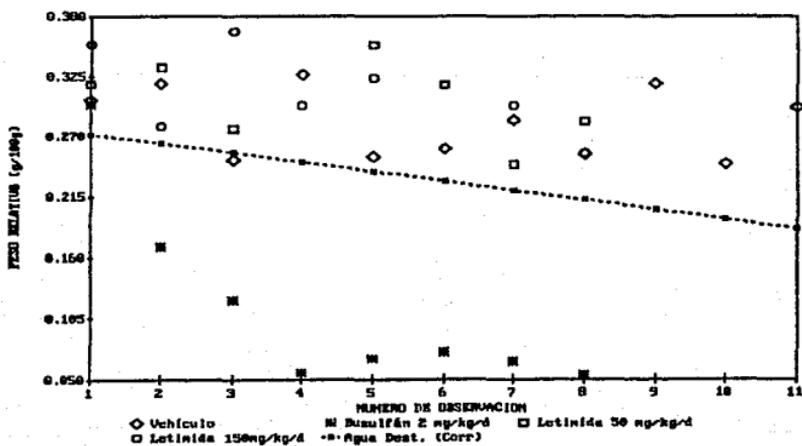
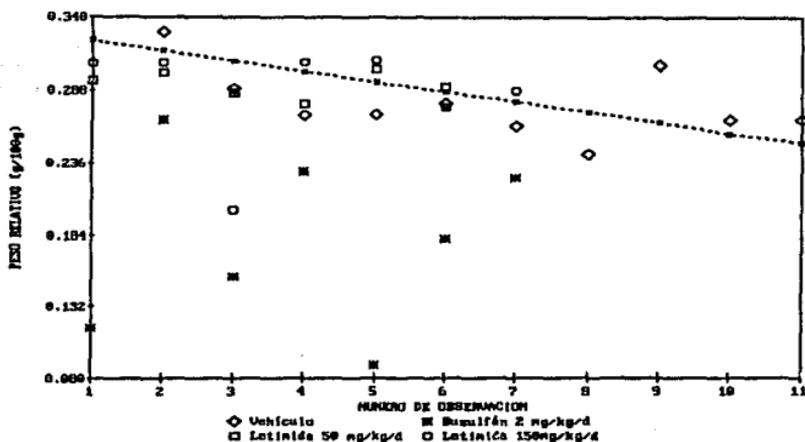


FIGURA 20. PESO RELATIVO TESTICULO IZQUIERDO, SEGUNDO SACRIFICIO



Es pertinente aclarar el contenido de los gráficos de puntos experimentales, a fin de poder interpretar adecuadamente los anteriores y los que posteriormente se presentarán.

Primeramente, en el eje de las abscisas, como se puede observar, aparece como referencia "Número de observación", atendiendo a un orden ascendente en los pesos de los ratones de cada lote y al número de los mismos en cada uno (por ejemplo, en el lote del testigo negativo se utilizaron 11 animales). Cabe recordar que el tratamiento estadístico se llevó a cabo empleando pesos relativos.

Como también se puede observar, los datos correspondientes al testigo negativo se sometieron a una regresión lineal, a fin de

establecer un parámetro de referencia para poder determinar el grado de desviación de los datos respecto a una serie de pesos teóricos. El llevar a cabo tal regresión lineal permitió detectar dos observaciones importantes: primero, todos los gráficos presentan una pendiente negativa, es decir, que animales con menor peso real presentan valores de peso relativo más elevado. Esto es ocasionado por los valores de peso relativo, ya que guardan proporción inversa con el peso real del ratón. Cualquier órgano, independientemente del animal que se trate (incluyendo al ser humano, y bajo condiciones adecuadas de salud y alimentación) presenta una distribución normal de peso con su desviación standard correspondiente. Entonces, un animal obeso tendrá, en proporción, un órgano más pequeño que un animal de bajo peso, mas esto no significa que físicamente el órgano pese menos. Segundo, el valor de las pendientes obtenidas es muy pequeño, así como los coeficientes de correlación. Estadísticamente, se puede asumir a partir de las características de las rectas de regresión que no existe entonces relación alguna entre el peso del animal y el del órgano; no obstante, con valores muy pequeños de pendiente se debe llevar a cabo un análisis de variancia especial para la regresión lineal a fin de constatar la correlación entre los datos que se están analizando. Tal análisis de variancia se llevó a cabo, obteniéndose valores de $p < 0.01$ y ratificando que, efectivamente, existe relación entre el peso del ratón y el peso del órgano tratado.

En el caso de los gráficos concernientes al peso de los testículos, se observa que no hay dispersión significativa de los

datos de letimida con respecto a la recta teórica. Los únicos datos que se desvian de la normalidad son los del testigo positivo.

El segundo de los órganos disectados de los animales tratados durante el desarrollo del presente experimento es el epididimo. La 17 resume los resultados obtenidos.

TABLA 17. PESO RELATIVO DE EPIDIDIMO

	Primer Sacrificio (9 Semanas)	Segundo Sacrificio (14 Semanas)
Vehículo	0.158 ± 0.050	0.133 ± 0.025
Busulfán 2 mg/kg/día	0.135 ± 0.073	0.122 ± 0.009
Letimida 50 mg/kg/día	0.135 ± 0.126	0.126 ± 0.009
Letimida 150 mg/kg/día	0.134 ± 0.011	0.134 ± 0.161

Las figuras 21, 22 y 23 ilustran el comportamiento de los datos de la tabla anterior.

FIGURA 21. PESO RELATIVO DE EPIDIOIDINO

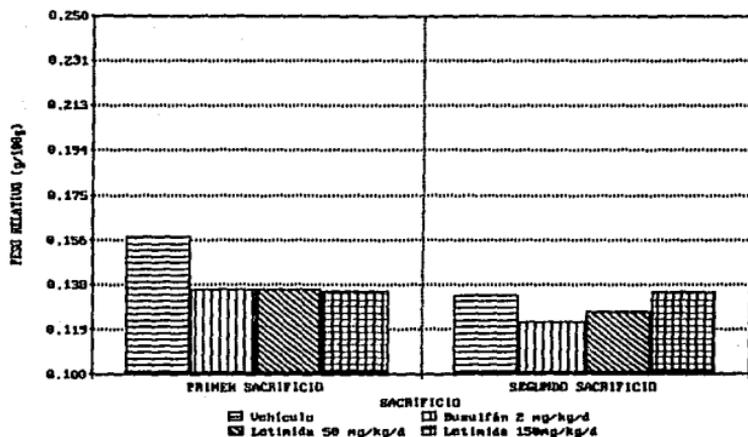


FIGURA 22. PESO RELATIVO DE EPIDIOIDINO, PRIMER SACRIFICIO

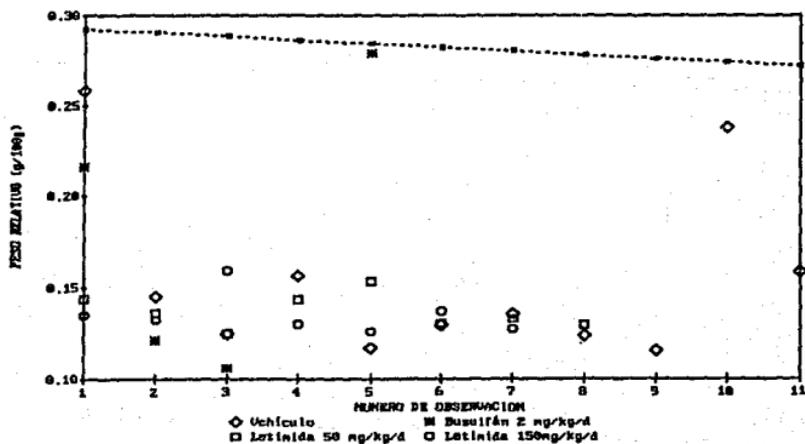
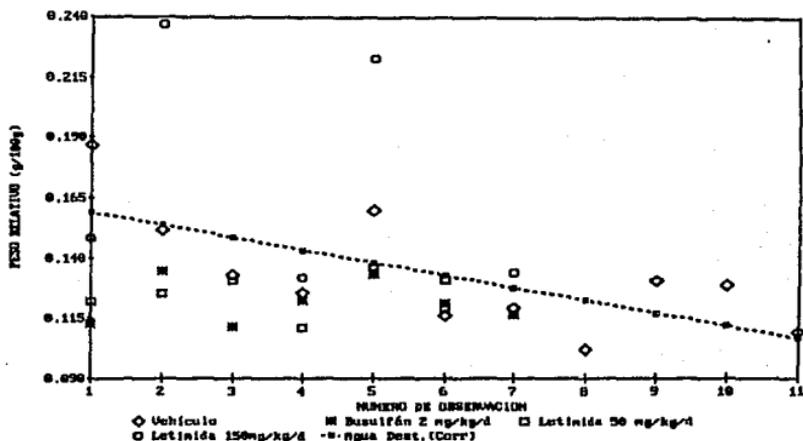


FIGURA 23. PESO RELATIVO DE EPIDIDIMO, SEGUNDO SACRIFICIO



Tanto en el gráfico de barras como en los de datos experimentales se observa que no se presenta ninguna diferencia significativa en cuanto a peso de epididimo se refiere. En este órgano tampoco se observa alguna afectación producida por el busulfán, ya que esta sustancia afecta directamente el testículo, como se mencionó en un capítulo anterior.

El último órgano disectado de los ratones macho fue la vesícula seminal. La tabla 18 muestra los pesos relativos obtenidos.

FIGURA 18. PESOS RELATIVOS DE VESICULA SEMINAL

	Primer Sacrificio (9 Semanas)	Segundo Sacrificio (14 Semanas)
Vehículo	0.224 ± 0.074	0.297 ± 0.074
Busulfán 2 mg/kg/día	0.262 ± 0.094	0.290 ± 0.047
Letimida 50 mg/kg/día	0.273 ± 0.096	0.281 ± 0.033
Letimida 150 mg/kg/día	0.227 ± 0.067	0.286 ± 0.051

Como puede observarse, no se presenta ninguna diferencia significativa en los pesos de este órgano. Las figuras 24, 25 y 26 constatan lo anterior, especialmente las dos últimas gráficas, al mostrar una dispersión muy variada de los datos de todos los lotes utilizados en el experimento.

FIGURA 24. PESO RELATIVO DE VESICULA SEMINAL



FIGURA 25. PESO RELATIVO DE VESICULA SEMINAL, PRIMER SACRIFICIO

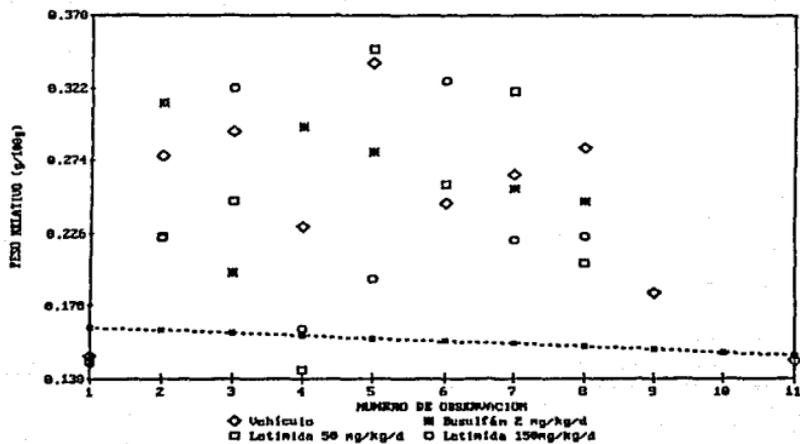
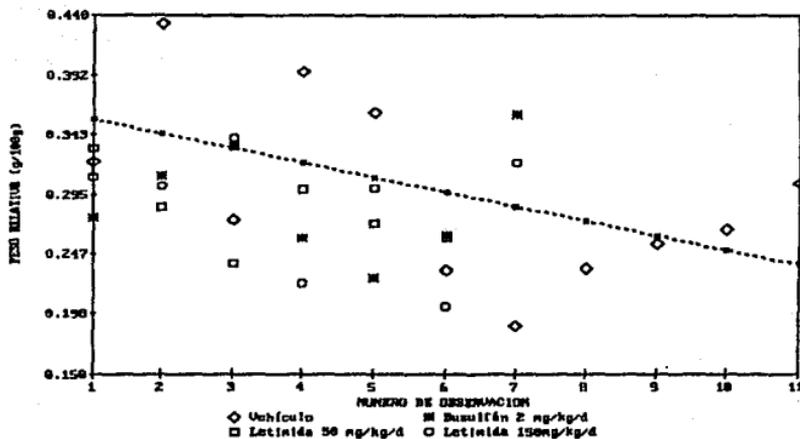


FIGURA 26. PESO RELATIVO VESICULA SEMINAL, SEGUNDO SACRIFICIO



8.4 DOMINANTES LETALES

Para poder establecer finalmente si la letimida afecta la fertilidad, se llevó a cabo la prueba de dominantes letales en hembras, evaluando el número de cuerpos lúteos, implantaciones totales y de productos vivos y muertos encontrados tras el sacrificio de las hembras. La tabla 19 muestra los resultados globales obtenidos, los cuales no presentan diferencias significativas entre los animales tratados con letimida con respecto a los testigos. Como se puede observar, el testigo positivo fue la única sustancia que presenta significación evidente, por lo que la letimida no afecta los parámetros de fertilidad evaluados con los dominantes letales.

Las figuras 27, 28, 29 y 30 ilustran los datos obtenidos, corroborando la no significación.

TABLA 19. DOMINANTES LETALES

	Acoplam	VEHICULO	BUS 2	LET 50	LET 150
C.LUTEOS	1Q	10.60±4.79	8.60±6.55	9.11±6.23	9.41±5.51
	2Q	6.80±6.35	3.25±5.09	8.93±5.94	9.19±5.82
	3Q	12.09±3.05	0.67±5.89**	11.5 ±5.89	13.43±2.51
	4Q	13.45±1.29	2.00±4.90**	13.16±1.17	8.1.00±1.41
I.TOTAL	1Q	8.55±5.38	8.06±6.06	9.82±5.72	9.39±5.38
	2Q	6.40±6.19	3.00±4.86*	6.20±6.07	9.00±5.73
	3Q	9.45±4.48	0.50±1.22**	10.50±5.24	11.57±5.62
	4Q	13.09±1.8.1	0.40±0.89**	13.17±1.17	12.43±4.39
I.VIVA	1Q	8.85±5.51	6.47±5.34	9.35±5.50	8.00±5.28
	2Q	5.80±5.72	2.25±4.09**	5.20±5.09	8.44±5.63
	3Q	9.09±4.18	0.33±0.82**	8.83±4.71	10.86±2.04
	4Q	11.45±2.01	0.33±0.82**	13.17±1.17	10.57±4.96
I.MUERTA	1Q	0.60±0.88	1.80±1.86	0.47±0.62	1.12±1.65
	2Q	0.60±1.04	0.81±1.47	1.00±1.16	0.56±1.31
	3Q	0.40±0.7	0.17±0.41	1.67±1.21	0.71±0.76
	4Q	1.54±1.51	0	0	1.42±2.06

NOTA: * p < 0.05 ** p < 0.01.

FIGURA 27. DOMINANTES LETALES. CUERPOS LUTEOS.

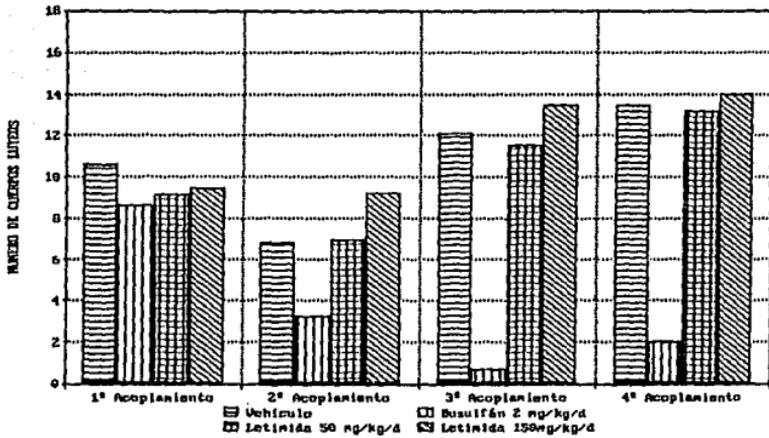


FIGURA 28. DOMINANTES LETALES. IMPLANTACIONES TOTALES.

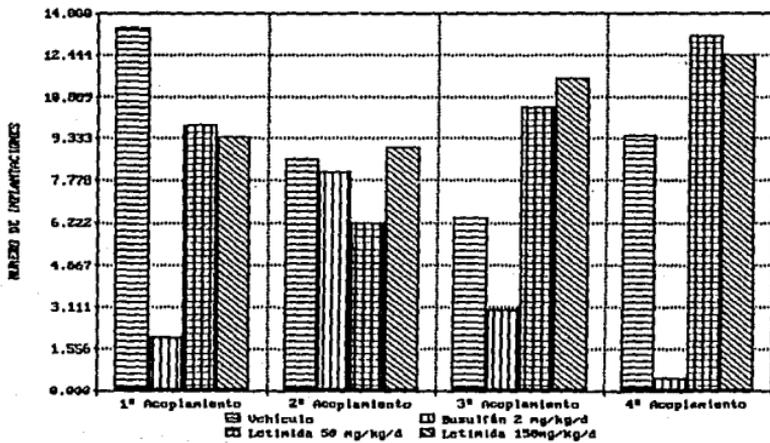


FIGURA 29. DOMINANTES LETALES. IMPLANTACIONES VIVAS

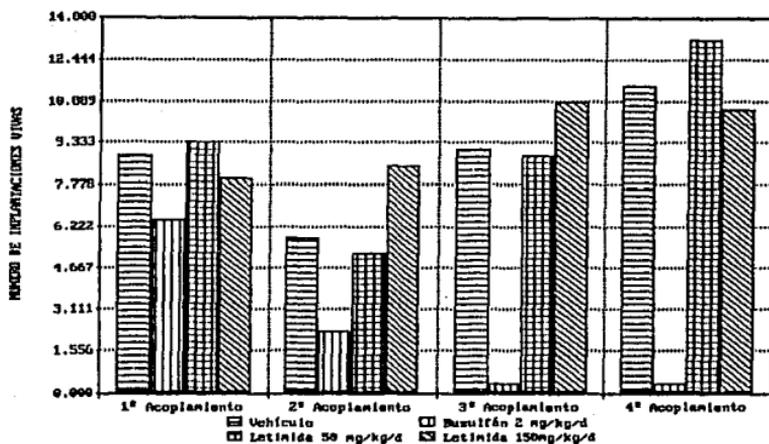
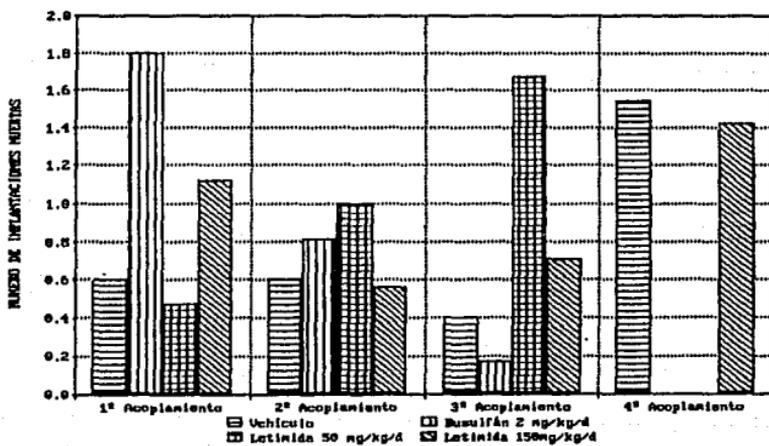


FIGURA 30. DOMINANTES LETALES. IMPLANTACIONES MUERTAS



CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La letimida aparentemente no presenta toxicidad hacia el aparato reproductor del ratón macho de la cepa NRM1, porque no modificó los parámetros evaluados, que comprendieron motilidad y cuenta espermática, así como peso de órganos clave en el ciclo fértil del animal, tales como testículo, epididimo y vesícula seminal.

Al mismo tiempo, se demostró indirectamente que la letimida no provoca efectos adversos hacia la fertilidad mediante la evaluación con dominantes letales, que arrojaron resultados negativos.

Es recomendable la realización de un estudio de fertilidad en hembra con el objeto de estudiar la influencia del sexo en el comportamiento de la letimida.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Albert, M. (1967) "Etude Comparative de l'évolution des Paramètres du Sperme Epididymaire de Souris Lors des Stades Pubertaires et Après Administration d'un Agent Alkylant, le Busulfan". *Memoire en vue du Diplome d'etudes et de Recherches en Biologie Humaine Université de Paris*.
- 2.- Albert, M., Roussel, C. (1983) "Strain Differences in the Concentration, Motility and Morphology of Epididymal Sperm in Relation to Puberty in Mice". *Intl.J.Androl.* 6: 446-460.
- 3.- Albert, M., Roussel, C. (1983) "Changes from Puberty to Adulthood in the Concentration, Motility and Morphology of Mouse Epididymal Spermatozoa". *Intl.J.Androl.* 6: 446-460.
- 4.- Barlow, S., Sullivan, F. (1984) "Reproductive Hazards" en Barlow, S. (editor). *REPRODUCTIVE HAZARDS OF INDUSTRIAL CHEMICALS*. Academic Press, Inc. London. pp 3-8.
- 5.- Barlow, S., Sullivan, F. (1984) "Reproductive Toxicity Testing in Animals" en Barlow, S (editor) *REPRODUCTIVE HAZARDS OF INDUSTRIAL CHEMICALS*. Academic Press Inc. London. pp 9-22.
- 6.- Bateman, A., Epstein, S. (1980) "Dominant Lethal Mutations in Mammals" en Vennit (editor). *MUTAGENICITY TESTING: A PRACTICAL APPROACH*. Academic Press. London. pp 541-568.
- 7.- Bevan, J. (1982) "FUNDAMENTOS DE FARMACOLOGIA: INTRODUCCION A LOS PRINCIPIOS DE ACCION DE LOS FARMACOS" (Segunda edición). Harper & Row Latinoamericana. México, 1982.
- 8.- Blanco, L. (1981) "Efecto Analgésico de la Letimida y el Acetaminofén en Dolor Post-Quirúrgico Ortopédico". *V Congreso Nacional de Farmacología*. Puebla, Puebla. México.
- 9.- Blank, J., Desjardins, C. (1984) "Spermatogenesis is Modified by Food Intake in Mice". *Biol.Reprod.* 30: 410-415.
- 10.- Bollag, W. (1953) "Der Einfluss von Myleran auf die Keimdrüsen von Ratten". *Experientia* 9: 268.

- 11.- Budavari, Susan (1989) THE MERCK INDEX: AN ENCYCLOPEDIA OF CHEMICALS, DRUGS AND BIOLOGICALS (Decimoprimerá edición). Merck and Co. Inc. USA (1989). pp 870.
- 12.- Burgens, A., Mitchell, J. (1972) GADDUM'S PHARMACOLOGY (Séptima edición). Oxford University Press. London. pp 112-117.
- 13.- Collins, T. (1978) "Reproduction and Teratology Guidelines: Review of Deliberations by the National Toxicology Advisory Committee's Reproduction Panel". *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 2:141-147 (1978).
- 14.- Crossland, J. (1980) "The Screening and Testing of Drugs" en LEWIS'S PHARMACOLOGY (Quinta edición). Longman. Londres. pp 139-143.
- 15.- Davison, C., Mandel, G. (1971) "Nonnarcotic Analgesics and Antipyretics: Salicylates" en Di Palma, J (editor). DRILL'S PHARMACOLOGY IN MEDICINE (Cuarta edición). Mc Graw Hill. E.U. pp 379-403.
- 16.- Devendra, P. (1986) "Effect of Di(2-ethylhexil)phtalate (DEHP) on Spermatogenesis in Adult Rats". *Toxicology* 42: 47-55 (1986).
- 17.- Dixon, R. 1980 "Toxic Responses of the Reproductive System" en Doull, J (editor). CASARETT AND DOULL'S TOXICOLOGY: THE BASIC SCIENCE OF POISONS (Segunda edición). Macmillan Publishing Co. E.U. pp 332-356.
- 18.- Dixon, R., Hall, J. (1982) "Reproductive Toxicology" en Hayes, W. (editor). PRINCIPLES AND METHODS OF TOXICOLOGY. Raven Press. N.Y.
- 19.- Díaz Barriga-Arceo, S. (1988) "Estudio Genotóxico de la Letimida en Ratón y en Cultivo de Linfocitos Humanos". *Tesis de Maestría en Ciencias con especialidad en Biología Clínica*. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N. México.
- 20.- Díaz Barriga-Arceo, S. (1991) "Citogenetic and Teratogenic Evaluation of Letimide". *Toxicol.Lett.* 56: 99-107.
- 21.- Díaz Barriga-Arceo, S. (1991) "Genotoxic Evaluation of Letimide with the Mouse Bone Marrow Micronucleus Test". *Toxicol.Lett.* 56: 95-98.

- 22.- Flower (1986) "Agentes Analgésicos, Antipiréticos y Antiinflamatorios. Drogas Empleadas en el Tratamiento de la Gota" en Goodman, A (editor). LAS BASES FARMACOLOGICAS DE LA TERAPEUTICA MEDICAMENTOSA. Editorial Médica Panamericana. México. pp 644-680.
- 23.- Galton, D., Morweena, T. (1958) "Busulfan (1,4-Dimethanesulfonyloxybutane, Myleran): Summary of Clinical Results:." *Ann.NY.Acad. Sci.* 68: 967:973.
- 24.- Goldstein, A., Aronow, L. (1978) FARMACOLOGIA (Segunda edición). Editorial Limusa. México. pp 425-428., 449-467., 857-908.
- 25.- Gomes, W. (1970) "Chemicals Affecting Testicular Function" en A. D. Johnson, W. R. Gomes y N. L. Vandemark (editores) THE TESTIS: DEVELOPMENT, ANATOMY AND PHYSIOLOGY. Academic Press, N. Y.
- 26.- Green, S. (1987) "A Guide for Mutagenicity Testing Using the Dominant Lethal Assay". *Mut.Res.* 189:167-174.
- 27.- Griffin, J. P. (1979) "Animal Toxicology Studies in the Safety Evaluation of New Drug Substances" en Bowers y Velo (Editores) DRUG ASSESSMENT: CRITERIA AND METHODS. Elsevier/North Holland Biochemical Press.
- 28.- Gude, W. (1982) HISTOLOGICAL ATLAS OF THE LABORATORY MOUSE. Plenum Press. N.Y. pp 13-16.
- 29.- Guyton, A. (1989) TRATADO DE FISIOLOGIA MEDICA (Séptima edición). Editorial Interamericana Mc. Graw Hill. México.
- 30.- Kirk (1982) ENCYCLOPEDIA OF CHEMICAL TECHNOLOGY (Tercera edición). John Wiley & Sons, Inc. USA. Tomo II pp 574-584., tomo III pp 519-523.
- 31.- Komatsu, H. (1982) "Increased Sperm Abnormalities due to Dietary Restriction". *Mut.Res.* 93: 439-446.
- 32.- Kopilla, K. (1974) "Effect of Letimide on Human Volunteers Administered Orally in Increasing Doses from 600 mg/day to 2400 mg/day in Divided Doses". Reporte farmacológico no publicado.

- 33.- Krzanowska, H. (1981) "Sperm Head Abnormalities in Relation to the Age and Strain of Mice". *J.Reprod.Fert.* 62: 385-392 (1981).
- 34.- Lam, D., Furrer, R., Bruce, W. (1970) "The Separation, Physical Characterization, AND Differentiation Kinetics of Spermatogonial Cells of the Mouse". *Proc.Nat.Acad.Sci.* 65(#1): 192-199.
- 35.- Lamb, J., Ross, M., Chapin, R. (1986) "Experimental Methods for Studying Male Reproductive Function in Standard Toxicology Studies". *J.Amer.Coll.Toxicol.* 5(#4): 225-234.
- 36.- Leber, A. P. (1988) "Chemical Induction of Dominant Lethal Mutations in Mammals" en Ballantine, B (editor) PERSPECTIVES IN BASIC AND APPLIED TOXICOLOGY. Wright, Butterworth & Co. London. pp 199-205.
- 37.- Lee, I., Dixon, R. (1972) "Antineoplastic Drug Effects on Spermatogenesis Studied by Velocity Sedimentation Cell Separation". *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 23: 20-41.
- 38.- Lee, I. P., Dixon, R. (1978) "Factors influencing reproduction and genetic toxic effects on male gonads". *Environ.Health Persp.* 24: 117-127.
- 39.- Leeling, J. (1971) "Biological Disposition of Letimide-4-¹⁴C in Man". Report #51. Reporte farmacológico no publicado.
- 40.- Leeling, J. (1971) "Biological Disposition of Letimide in Man". Reporte farmacológico no publicado.
- 41.- Linder, R. (1986) "Testicular Toxicity and Infertility in Male Rats Treated with 1,3-dinitrobenzene". *J.Toxicol.Environ.Health* 19: 477-489.
- 42.- López, H. (1981) "Efecto analgésico de la Letimida Administrada a dos Niveles de Dosis en Dolor Post-Quirúrgico Ortopédico". V Congreso Nacional de Farmacología. Puebla, Puebla. México.
- 43.- Mendoza, R. (1979) "Efecto Analgésico de la Letimida en Dolor Post-Quirúrgico". III Congreso Nacional de Farmacología. Morelia Michoacán, México.

- 44.- Meyers, F. (1972) MANUAL DE FARMACOLOGIA CLINICA. Editorial El Manual Moderno, México. pp 42-61., 296-307.
- 45.- Meza, J. (1974) "The Microscopic Gastrointestinal Bleeding of Letimide Compared with Bayer^(R) Aspirin, Bufferin^(R) and Placebo". Reporte farmacológico no publicado.
- 46.- Meza, J. (1980) "Efecto Analgésico de la Letimida en Pacientes con Dolor en el Post-Operatorio Inmediato". IV Congreso Nacional de Farmacología. Mérida, Yucatán. México.
- 47.- Mitruka, B., Rawnsley, H. (1976) ANIMALS FOR MEDICAL RESEARCH: MODELS FOR THE STUDY OF HUMAN DISEASES. John Wiley & Sons. USA. pp 291-376.
- 48.- Moutschen, J. (1959) "Chromosomes Deficiencies Induced with Myleran". *Experientia* 25: 310-311.
- 49.- Moutschen, J. (1961) "Differential Sensitivity of Mouse Spermatogenesis to Alkylating Agents." *Genetics* 46: 291-299.
- 50.- Munro, I. (1980) "Reproductive Toxicity" en Galli, C (editor). THE PRINCIPLES AND METHODS IN MODERN TOXICOLOGY. Elsevier North Holland Biomedical Press. pp 125-138.
- 51.- Paulus, H. (1982) "Agentes Analgésicos, Antipiréticos y Antiinflamatorios" en Bevan, J (editor). FUNDAMENTOS DE FARMACOLOGIA. Harper & Row latinoamericana. México. pp 291-304.
- 52.- Paulus, H. (1982) "Obtención y Evaluación de Nuevos Fármacos" en Bevan, J (editor). FUNDAMENTOS DE FARMACOLOGIA . Harper & Row Latinoamericana. México. pp 52
- 53.- Phillips, B. "The Subacute (6 week) Oral Toxicity in the Rat". Toxicology Report #21. Reporte toxicológico no publicado.
- 54.- Phillips, B., Hartnagel, R. "The Acute Oral Toxicity of MA1443 in the Mouse, Rat, Guinea Pig and Dog". Toxicology Report #11. Reporte toxicológico no publicado.
- 55.- Phillips, B., Jammes, T. (1967) "The Biological Disposition of MA1443". Biochemical Pharmacology Report #18. Reporte farmacológico no publicado.

- 56.- Pinto Machado, J. (1968) "Influence du Busulfan (1,4-Dimethanesulfonyloxibutane) sur le Développement Prénatal de la Souris". *Archives Portugaises des Sciences Biologiques*. Tomo 16, Fascículo 2. Francia.
- 57.- Rodriguez, R. (1969) "Blind Comparison Between the Analgesic Potency of MA1443 and Acetylsalicylic Acid". Pharmacology Report #153. Reporte farmacológico no publicado. México.
- 58.- Roosen-Runge, E. (1962) "The Process of Spermatogenesis in Mammals". *Biol.Rev.* 37: 343-377.
- 59.- Rumack, B., Peterson, R. (1990) "Clinical Toxicology" en J. Doull (Editor). CASARETT AND DOULL'S TOXICOLOGY: THE BASIC SCIENCE OF POISONS (Sexta edición). Macmillan Publishing Co. E.U.A.
- 60.- Salazar, M. (1988) ESTUDIO TOXICOLOGICO DE LA LETIMIDA SOBRE LA FERTILIDAD, REPRODUCCION Y DESARROLLO EMBRIONARIO. *Tesis de Maestría en Ciencias con especialidad en Biología Clínica*. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. México.
- 61.- Sanen, F. (1974) "The Analgesic Activity of Letimide Compared With Aspirin and Placebo in Clinical Pain". Reporte farmacológico no publicado.
- 62.- Sanen, F. (1974) "Letimide Analgesic Activity When Compared With Aspirin and Placebo". Reporte farmacológico no publicado.
- 63.- Sanen, F. (1974) "The Microscopic Gastrointestinal Bleeding of Letimide Compared with Bayer(R) Aspirin, Bufferin(R) and Placebo". Reporte farmacológico no publicado.
- 64.- Smith, M., Smith, P. (1966) THE SALICYLATES: A CRITICAL REVIEW. John Wiley and Sons. E.U.A.
- 65.- Traina, V. (1983) "The Role of Toxicology in Drug Research and Development". *Res.Rev.* 3: 43-72.
- 66.- Truhaut, R. (1980) "Toxicity Testing: Scope and Design" en Galli, C (editor). THE PRINCIPLES AND METHODS IN MODERN TOXICOLOGY. Elsevier/North Holland Biomedical Press. pp 1-7.

- 67.- U. S. Pharmacopeial Convention (1975) UNITED STATES PHARMACOPEIA (Decimonovena revisión). U.S.A. pp 38-40.
- 68.- U. S. Pharmacopeial Convention (1987) DRUG INFORMATION FOR THE HEALTH CARE PROVIDER (Séptima edición). USPDI. U.S.A. pp 1539-1549.
- 69.- Valdecasas, F. (1977) "Desarrollo de la Terapéutica Medicamentosa" en Valdecasas, F (Ed.) LAS BASES FARMACOLOGICAS DE LA TERAPEUTICA MEDICAMENTOSA (Primera edición). Salvat Editores. Barcelona. pp 1-7.
- 70.- Vettorazzi, G. (1980) "Chemical Safety Evaluations and Toxicological Decisions" en Galli, C (editor). THE PRINCIPLES AND METHODS IN MODERN TOXICOLOGY. Elsevier-North Holland Biomedical Press. pp 9-34.
- 71.- Vidrio, H. "General Pharmacology of Compound MA1443". Pharmacology report #132. Reporte farmacológico no publicado.
- 72.- Viguier-Martinez, M. (1984) "Effect of Prenatal Treatment with Busulfan on the Hypothalamo-Pituitary Axis, Genital Tract and Testicular Histology of Prepubertal Male Rats". *J.Reprod.Fert.* 70: 67-73.
- 73.- Wyrobek, A. (1983) "An Evaluation of the Mouse Sperm Morphology Test and Other Sperm Tests in Nonhuman Mammals: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program". *Mut.Res.* 115: 1-72.
- 74.- Wyrobek, A., Bruce, (1975) "Chemical Induction of Sperm Abnormalities in Mice". *Proc.Nat.Acad.Sci.* 72(#11): 4425-4429.
- 75.- Wyrobek, A., Bruce, R. (1978). "The Induction of Sperm-Shape Abnormalities in Man and Humans" en A. Hollaender y F. J. Serres (editores). CHEMICAL MUTAGENS: PRINCIPLES AND METHODS FOR THEIR DETECTION. Vol 5. Plenum Press, N. Y. pp 257-285.
- 76.- Zbinden, G. (1979) "Toxicological Methods in the Selection of a New Drug" en Bowers, J (editor). DRUG ASESMENT: CRITERIA AND METHODS. Elsevier-North Holland Biomedical Press. pp 101-119.

77.- (1968) "VAN NOSTRAND'S SCIENTIFIC ENCYCLOPEDIA". D. Van Nostrand
Co. Inc. U.S.A.