

51281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

ESTUDIO DE LA RELACION ENTRE LOS EFECTOS GENOTOXICOS Y TERATOGENICOS DE LA CICLOFOSFAMIDA in vivo

T E S I S

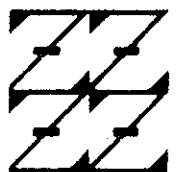
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

P R E S E N T A :

BIOLOGA LUCILA ALVAREZ BARRERA

U N A M FES ZARAGOZA



LO HUMANO EJE DE NUESTRA REFLEXION

DIRECTOR DE TESIS: DR MARIO ALTAMIRANO LOZANO

MEXICO, D. F.

SEPTIEMBRE 2002



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

"La mas larga caminata comienza siempre con un primer paso"

proverbio Hindú

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental, de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", encabezada por el Dr. Mario A. Altamirano Lozano

Durante los estudios de doctorado se contó con el apoyo del programa de becas de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) y del programa PADEP-Tesis doctoral proyecto número 500301

## Agradecimientos

Al Dr Mario A. Altamirano Lozano por su asesoría, apoyo y paciencia en la realización de este trabajo

A los miembros del comité tutorial, por sus comentarios y sugerencias a lo largo del desarrollo de este trabajo

Dr Mario A. Altamirano Lozano

Dr Pedro R. Morales Ramírez

Dr Emilio Rojas del Castillo

Dr Jose Miguel Betancourt Rule

A los miembros del jurado por sus valiosos comentarios y sugerencias en la revisión del escrito:

Dr. Mario A. Altamirano Lozano

Dr Pedro R. Morales Ramírez

Dr Javier Espinoza Aguirre

Dr Edelmiro Santiago Osorio

Dra. Judith Guzmán Rincón

Dra Leticia Morales Ledesma

Dr Jose Miguel Betancourt Rule

Agradezco a: Lupita, Angélica María, María Angélica y Alejandra, por todo lo que aprendimos juntas

A Elia, Carmen y Bertha, por brindarme su amistad y porque hicieron del laboratorio un lugar agradable para trabajar

*Dedico este trabajo a.*

*Miguel.*

Porque te amo  
Por tu amor y por apoyarme siempre

*Mónica.*

Por todo lo que me has dado

*A mi madre y mis hermanos.*

Con todo cariño

*A Dominga y Antonio.*

Por ser los abuelos de Mónica

## Índice.

Abstract	i
1 0 Resumen	ii
2 0 Introducción	1
2 1 Teratogénesis: aspectos generales	1
2 2 Mecanismos de acción de los agentes teratogénicos	2
2 3 Proteratógenos	7
2 4 Mecanismos de protección del embrión	7
2 5 Genotoxicidad	8
2 6 Citogenética y teratogénesis	9
2 7 Ciclofosfamida	11
3 0 Justificación	18
4 0 Hipótesis	18
5 0 Objetivos	19
6 0 Materiales y Métodos	20
6 1 compuesto	20
6 2 Animales	20
6 3 Protocolos	20
7 0 Resultados y Discusión	25
7 1 Resultados del protocolo 1	25
7 2 Discusión del protocolo 1	27
7 3 Resultados del protocolo 2	30
7 4 Discusión del protocolo 2	37
7 5 Resultados del protocolo 3	46
7 6 Discusión del protocolo 3	54
8 0 Discusión general	60
9 0 Conclusiones	64
10 0 Comentarios	65
11.0 Referencias	67

## Abstract

Due to the importance of genetic alterations in the induction of morphological abnormalities, several authors have proposed that there is a possible relationship between the genotoxic and teratogenic effects of chemical agents. However, until now both effects have been tested separately using different methods and different laboratory species, missing the opportunity to evaluate both the external malformations and the genotoxic damage in the same organism.

In the present work we evaluated the induction of Chromosomal aberrations (CA) and gross morphological abnormalities in the embryos of CD-1 mice exposed to cyclophosphamide (CP), a well-known mutagen/teratogen, in order to contribute to the elucidation of the relationship between mutagenesis and teratogenesis, induced in the same organism by chemical agents.

In order to carry out the objective we followed three different treatments:

1) To standardize the methodology, three groups of four mice were used; males, non-pregnant females and pregnant females. The animals were injected intraperitoneally with 10 mg/kg/bw of cyclophosphamide. Results showed that twenty-four hours after the treatment there was an increase in the percentage of bone marrow cells with chromosomal abnormalities and a decrement of mitotic activity in all the groups treated. There was a clear difference in sensitivity between the sexes, since the effects of CP were more pronounced in males than in females, while pregnant mice showed fewer chromosomal aberrations than those not pregnant.

2) In mouse embryos exposed transplacentally to 10 mg/kg of CP, at day 10 of gestation, there was an increase in the proportion of morphological abnormal embryos and in the percentage of hepatic cells with chromosomal aberrations, CP also inhibited the rate of mitotic activity of embryos cells. The results showed that there is a significant difference in terms of chromosomal abnormalities between normal and abnormal (malformed)-looking pups, however there is not a direct relationship between the kind of chromosomal aberration and the type of malformation.

3) In the third treatment we analyzed the genotoxic and teratogenic effects in mouse embryos obtained after a chronic treatment to male mice with a low dose (2.5 mg/kg) of CP, abnormal embryos were not observed, however, an increase in the percentage of cells with CA and in the number of growth-retarded embryos in the treated group was observed.

The method used in the present study allowed to analyze both processes using the same organism, it can help to elucidate what kind of genotoxic damage is induced and how this damage may contribute to the expression of morphological abnormalities.



## 1.0 Resumen.

Reconociendo la importancia que tienen las alteraciones genéticas en la producción de las anomalías morfológicas externas, varios autores han propuesto la existencia de una posible relación entre el efecto genotóxico y teratogénico de los compuestos químicos. Sin embargo hasta ahora estos dos efectos habían sido evaluados por separado, usando diferentes individuos, con lo cual se perdía la oportunidad de evaluar en el mismo organismo la presencia de malformaciones estructurales externas y el daño genotóxico.

En este trabajo se emplearon embriones descendientes de ratones hembras y machos de la cepa CD-1 tratados *in vivo* con Ciclofosfamida, la cual tiene la capacidad de producir efectos citotóxicos, mutagénicos y teratogénicos, con la finalidad de evaluar la presencia de anomalías morfológicas externas, y la frecuencia y tipo de aberraciones cromosómicas (AC) en el mismo organismo, para así tratar de establecer si existe relación entre estos efectos.

Para cubrir el objetivo anterior se realizaron tres protocolos

1) Para estandarizar la técnica, se trataron tres grupos de 4 ratones; machos, hembras y hembras preñadas con una inyección intraperitoneal de 10 mg/kg de ciclofosfamida. Al realizar las evaluaciones en la médula ósea, 24 horas después del tratamiento, se encontró una disminución del IM y un incremento en el porcentaje de células con AC en todos los grupos tratados, respecto a sus testigos. El incremento de células con AC fue estadísticamente mayor en los ratones macho tratados que en las hembras, mientras que las hembras preñadas presentaron menor porcentaje de AC que las hembras no preñadas tratadas con la misma concentración del compuesto. Por lo que se pudo concluir que existen diferencias en la respuesta al daño genotóxico producido por la ciclofosfamida entre sexos.

2) En este protocolo se administró 10 mg/kg de ciclofosfamida a ratones hembra en el día 10 de preñez, los embriones de 13 días de gestación obtenidos de este tratamiento transplacentario presentaban anomalías morfológicas externas, un incremento en el porcentaje de células hepáticas con AC y una disminución del índice mitótico. El análisis de los resultados obtenidos nos permitió observar diferencias en el porcentaje de células con AC entre los embriones con fenotipo normal y los que presentaban anomalías morfológicas externas, sin embargo no se encontró una relación directa entre el tipo de aberración cromosómica (evaluado en células del hígado) y el tipo de malformación.

3) En el tercer protocolo se evaluó el efecto genotóxico y teratogénico en los embriones descendientes de ratones macho tratados con 2.5 mg/kg de ciclofosfamida durante 60 días. En este caso no se observó un incremento en el porcentaje de embriones con anomalías morfológicas externas, sin embargo sí se elevó la frecuencia de embriones que presentaban menor desarrollo (tamaño menor) y un mayor número de células hepáticas con aberraciones cromosómicas.

Aunque en este caso la dosis seleccionada no incremento el porcentaje de embriones con malformaciones externas después del tratamiento crónico con CF, reportes recientes de otros autores siguen apoyando la idea de que el tratamiento de los machos con agentes químicos, por periodos largos de tiempo, antes de la cruce, puede producir tanto daño teratogénico como genotóxico en la descendencia.

El modelo empleado en este trabajo permite evaluar el efecto teratogénico y genotóxico de un agente químico en el mismo individuo. Esto puede ayudar a conocer cuales son los diferentes tipos de daño producidos en un organismo y como contribuye cada uno de ellos para originar una malformación morfológica.

## 2.0 INTRODUCCIÓN.

El desarrollo embrionario de los mamíferos es un proceso biológico complejo, que es el resultado de la sincronización de numerosos eventos, en donde los embriones dependen del organismo materno, por lo que el ambiente en el cual vive la madre tiene gran importancia en el desarrollo del producto. La edad, el estado físico y nutricional de la madre son factores importantes durante el crecimiento en el útero, es por eso que la exposición materna a cualquier agente nocivo puede afectar directa o indirectamente al producto.

Estudios realizados durante el desarrollo embrionario y fetal han mostrado que la exposición a agentes físicos o químicos, algunas enfermedades infecciosas, cambios hormonales, deficiencias o excesos nutricionales, son factores que pueden causar alteraciones en el desarrollo y producir malformaciones (Scialli, 1992; Wilson, 1977).

### 2.1 TERATOGENESIS: ASPECTOS GENERALES

El estudio de las malformaciones congénitas, causadas por diversos factores (físicos, químicos y biológicos) que afectan el desarrollo embrionario o fetal, entre la fertilización y el nacimiento, recibe el nombre de teratología (del griego teras, teratis, monstruo)(O'Rahilly y Muller, 1992; Scialli, 1992; Wilson, 1977)

En 1977, apareció el libro titulado "Handbook of Teratology", que contiene los principios generales de la teratología, los cuales fueron establecidos a partir de la revisión de todos los trabajos realizados por diferentes autores hasta ese momento. A la fecha esos planteamientos siguen vigentes. Cuando estos principios aparecieron se habían identificado 9 mecanismos, 5 estados patogénicos y 2 vías comunes (tabla 1)

#### 2.1.1 Principios generales de la teratogénesis (Wilson 1977)

1 *La susceptibilidad a los agentes teratogénicos depende del genotipo del producto y de la manera en la cual éste interactúa con factores del medio ambiente*

2 *La susceptibilidad a los agentes teratogénicos varía con el estado de desarrollo intrauterino y el tiempo en el cual se produce la exposición*

3 *Los agentes teratogénicos actúan en una vía específica (mecanismo) en las células en desarrollo y en los tejidos para originar una embriogénesis anormal*

En 1977 Wilson apoyaba la existencia de 9 mecanismos de acción de los agentes teratogénicos, éstos pueden darse a escala celular o subcelular. Los mecanismos propuestos por este autor se muestran en la tabla 1

Tabla 1. Mecanismo y efecto producido por un agente teratogénico. El agente teratogénico puede tener uno o más mecanismos, que originan cambios en el sistema en desarrollo, los cuales pueden manifestarse como uno o más tipos de anomalías.

Mecanismo	Efecto producido	Efecto final, producido por cualquiera de los mecanismos.
1. Mutación	1 Incremento o decremento de la muerte celular	1 Pocas células o productos celulares que están involucrados en la morfogénesis o la maduración de funciones.
2 No disyunción y rompimiento cromosómico.	2 Fallas en las interacciones celulares	2 Otros desbalances en el crecimiento y diferenciación
3 Interferencia mitótica	3 Biosíntesis reducida	
4 Alteración de la integridad y función de los ácidos nucleicos.	4 Disturbios en los movimientos morfogenéticos.	
5 Falta de precursores normales	5 Daño mecánico a los tejidos	
6 Fallas en las fuentes de energía celular.		
7 Cambios en las propiedades de las membranas celulares		
8 Fallas en el balance de sales dentro y fuera de las células (osmolar)		
9 Inhibición enzimática		

4 Los teratógenos son capaces de producir uno o más de los cuatro tipos de efectos sobre el desarrollo.

a) muerte del organismo en desarrollo, b) anomalías estructurales o malformaciones, c) deficiencia del desarrollo y/o d) deficiencia funcional (Cohen, 1990; Scialli, 1992)

5. La ruta de llegada del agente al producto en gestación, depende de sus propiedades físico-químicas.

6. Relación dosis respuesta:

La dosis empleada en el tratamiento puede ser tan baja que no produce efecto adverso en el producto, pero cuando se incrementa también se incrementa el daño producido e incluso puede llegar a ser letal

## 2.2 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS AGENTES TERATOGENICOS

A Muerte celular. El teratógeno provoca la destrucción o muerte de las células que son la clave del desarrollo para la formación de tejidos y órganos (Scialli, 1992).

*B Interferencia Mitótica:* Algunos agentes no son estrictamente genotóxicos, porque no dañan al material genético, pero pueden interferir con la división celular, lo cual origina disminución en el número de células, que son necesarias para el desarrollo de eventos normales (tabla 2)

**Tabla 2. Ejemplos de agentes que interfieren con la mitosis.**

Mecanismo aparente	Agente causante.
1. Detener o retrasar la síntesis del ADN	Citocina arabinosa, Hidroxiurea, irradiación.
2 Falla del huso mitótico, debido a la inhibición de la polimerización de la tubulina.	Colchicina, vincristina, griseofulvina, algunos anestésicos.
3 Formación de puentes cromatídicos o separación de cromátidas (adherencia, "puentes")	Irradiación radio miméticos, algunos compuestos químicos

*C Alteraciones en la función de los ácidos nucleicos:* La función final tanto del ADN y del ARN es la síntesis de proteínas, incluyendo enzimas. Es posible entonces, que un agente interfiera con la transcripción del ADN o la traducción del ARN pudiendo causar defectos al nacimiento, por alteraciones en la función de las células

*D Inhibición enzimática:* Agentes que inhiben la actividad de las enzimas, pueden tener el mismo efecto, que los agentes que inhiben la transcripción y la traducción del ácido nucleico.

*E Falta de substratos esenciales:* Estudios en animales y muy pocas experiencias en humanos han mostrado que la falta de algunos nutrimentos durante la preñez están asociados con anomalías en el desarrollo, ya que algunos de ellos están involucrados en la síntesis de proteínas o ácidos nucleicos

*F Fallas en el aporte de energía:* Agentes que interfieren con la función de las mitocondrias y la generación de ATP (ácido adenosintrifosfato), pueden dañar la habilidad de las células para realizar su trabajo durante el desarrollo del embrión

*G Alteración de las membranas celulares:* Debido a que las membranas de las células son muy importantes en la viabilidad celular y en su funcionamiento, la alteración o daño en ellas puede producir muerte celular, o daño en su funcionamiento. Un papel importante de la membrana celular es mantener la comunicación con células vecinas, a través de las estructuras especializadas tales como desmosomas o "gaps" las cuales son muy sensibles a la toxicidad producida por algunos xenobióticos (Scialli, 1992).

*H Genotoxicidad:* Se sabe que muchos agentes genotóxicos son potentes teratógenos, ya que la alteración del material genético de una célula puede desencadenar efectos adversos en el desarrollo embrionario. Las mutaciones

pueden ser causadas por radiación ionizante o por algunos agentes químicos tales como el ácido nitroso, agentes alquilantes y compuestos carcinógenos

Existen dos posibles mecanismos por los cuales una mutación puede originar anomalías en el desarrollo

a) El primero, es que una mutación produzca un gen no funcional. Esto se postula para una mutación que se origina en una etapa temprana de la embriogénesis, ya que una célula puede pasar esta información a todas las células hijas y el gen no elabore su producto (Scialli, 1992).

b) El segundo mecanismo, es la producción de un gen modificado, que origine un producto alterado. Un ejemplo de este mecanismo es la producción de la hemoglobina en forma de hoz, en donde un par de bases de la cadena del ADN fue cambiado, codificando para una cadena de hemoglobina equivocada (Scialli, 1992)

Algunos datos de experimentos realizados con animales sugirieron que las mutaciones, producidas por algunos compuestos tóxicos, son un mecanismo de teratogenicidad, particularmente en roedores donde las crías de padres tratados con un mutágeno presentan malformaciones y en algunos casos se sugiere que la alta incidencia de anomalías encontrada en los descendientes F3 de ratones macho tratados con mutágenos son debidas a alteraciones permanentes en el genoma (Scialli, 1992)

Sin embargo, el reporte de las experiencias de mujeres embarazadas expuestas a dosis altas de radiación ionizante, durante procedimientos médicos y en las explosiones atómicas, como en Hiroshima y Nagasaki, indican un incremento de la muerte celular en los productos en gestación, lo que produce un retraso en el crecimiento, microcefalia y anomalías en el desarrollo del cerebro, pero no se ha identificado un patrón en las anomalías genómicas reproducibles (Scialli, 1992).

### **2.2.1 El daño al ADN en la teratogénesis producida por agentes químicos.**

El daño al ADN tiene gran importancia en la teratogénesis química. Se ha observado que en ratonas transgénicas preñadas, con una deficiencia en el gen p53 (gen supresor del tumor), el cual es necesario para la reparación del ADN, son más susceptibles al efecto teratogénico del benzo(a)pireno (Nicol y col., 1995) y a la fenitoina (Laposa y Wells, 1995; Laposa y col., 1996; Wells y col., 1997). En algunos experimentos se ha visto que existe una relación entre la formación de aductos y la frecuencia de fetos malformados de rata (Platzek y col., 1994).

Algunos datos señalan que el daño al ADN vía enlace covalente u oxidación puede ser un importante mecanismo de teratogénesis, al menos para el benzo(a)pireno (Nicol y col., 1995) y la fenitoina (Laposa y Wells, 1995; Laposa y col., 1996) (tabla 3). La alquilación, arilación y la oxidación de proteínas y lípidos

también pueden ser los iniciadores de los eventos que originen teratogénesis.

**Tabla 3. Comparación de las características de los compuestos químicos (xenobióticos), que actúan a través de la producción de intermediarios o por interacción a través de receptores (tomada de Laposa y col., 1996).**

Característica	Mecanismo de interacción con el Tejido	
	Intermediario reactivo	A través de Receptor
Especie química inicial	Metabolito intermediario reactivo (altamente inestable) Electrofilico Radical libre Frecuentemente un metabolito menor entre 1 y 10% del total del xenobiótico	Compuesto inicial o un metabolito principal estable
Blanco molecular	Múltiples: diferentes macromoléculas celulares (ADN, proteínas, lípidos y carbohidratos)	Un receptor específico en un tipo de macromolécula (usualmente una proteína)
Interacción con el blanco	Irreversible Enlace covalente (arilación, alquilación) Oxidación	Enlace reversible
Duración de la interacción con el blanco	Acumulativo	Pasajero (no permanente)
Efectos tóxicos	No relacionados con el efecto terapéutico	Generalmente una extensión del efecto terapéutico
Dosis / concentración tóxica	La toxicidad puede originarse a concentraciones terapéuticas de la droga en el plasma ó a concentraciones "seguras" de químicos en el ambiente	La toxicidad se origina cuando la concentración terapéutica o "segura" en el plasma se excede
Inicio de la toxicidad	La toxicidad puede originarse después del tiempo en el cual se da el pico de la concentración del xenobiótico en el plasma Dependiendo del tipo de xenobiótico y de su Toxicidad, puede tardar horas, días, meses o años en presentarse la toxicidad	

### 2.2.2 Otros mecanismos.

Otro de los mecanismos propuestos para la iniciación de la teratogénesis, es la formación de radicales libres y la formación de especies oxígeno reactivas (ROS). Los radicales libres de los xenobióticos y las ROS pueden oxidar y enlazar

covalentemente a moléculas como el ADN, proteínas y lípidos, provocando alteraciones de la función celular y produciendo la muerte del producto en el útero o teratogénesis (Wells y Winn 1996) Por ejemplo la ciclofosfamida (CF) es capaz de enlazar covalentemente al ADN (Benson y col., 1988) y de oxidar tanto al ADN como a algunos lípidos (Lear y col., 1992; Pillans y col., 1989)

Varios agentes químicos, incluyendo muchos que son teratogénicos, son capaces de inducir la síntesis de proteínas de choque térmico, basado en esto Germán en 1984 postuló una relación entre la activación de estas proteínas y la teratogénesis. Algunos autores han concluido que la inducción de estas proteínas es un buen indicador del efecto teratogénico, aunque aún no se conoce el mecanismo específico (Bournias-Vardiabasis y col., 1990; Mirkes y col., 1994).

También se ha propuesto que la muerte celular programada o apoptosis, la cual es muy importante fisiológicamente en el desarrollo embrionario, puede ser modificada por algunos agentes químicos y originar un desarrollo anormal (Chang y col., 1998; Chen y col., 1994; Torchinsky y col., 1995; 1999; Wubah y col., 1996)

### **2.2.3 Mecanismos propuestos para la teratogénesis vía paterna.**

El mecanismo de acción de muchos de los agentes que se sabe afectan uno o más aspectos reproductivos de los machos no se conocen y pueden estar involucrados múltiples modos de acción y ser de gran complejidad (Ratcliffe y col., 1993), entre los mecanismos propuestos se encuentran:

a) Alteración del número o estructura cromosómica o alguna mutación en las células germinales (por ejemplo: translocaciones, deleciones o inserciones de partes del cromosoma) Existe la posibilidad que algunos espermatozoides con anomalías cromosómicas sean seleccionados antes de llegar al óvulo y no puedan fertilizar. Si la fertilización tiene lugar, las anomalías en el espermatozoide pueden producir muerte fetal, a través de letales dominantes, pero si los fetos sobreviven, pueden presentar anomalías congénitas o desordenes genéticos, los cuales pueden ser expresados al nacimiento o después durante el transcurso de su vida (Ratcliffe y col., 1993)

b) Interferencia con la meiosis, o con la formación del huso: agentes con esta capacidad pueden afectar la espermatogénesis, la viabilidad, movilidad y la morfología espermática. También pueden dañar las células de Leydig o de Sertoli o el balance hormonal y la retroalimentación del eje hipotálamo-pituitaria-testículo (Colie, 1993; Ratcliffe y col., 1993).

c) Transferencia del agente tóxico del padre hacia la madre puede darse vía la piel por contacto, o a través del fluido seminal hacia la vagina (Colie, 1993)

d) Daño producido a moléculas relacionadas con la función del espermatozoide, como las proteínas que están asociadas con los ácidos nucleicos en la cabeza del



espermatozoide (protaminas en el espermatozoide maduro), la integridad de estas protaminas es muy importante en la función del material nuclear del espermatozoide

### **2.3 PROTERATÓGENOS.**

Los estudios *in vitro* e *in vivo* utilizando modelos de roedores sugieren que muchos compuestos químicos ambientales, colectivamente llamados xenobióticos, son capaces de causar toxicidad en el embrión o en el feto vía intermediarios que son altamente reactivos. En este caso, el compuesto original, llamado proteratógeno, no es tóxico, pero puede convertirse *in vivo* en un metabolito de vida media corta, altamente tóxico (figura 1). Si no es rápidamente eliminado, este intermediario puede reaccionar irreversiblemente con macromoléculas como el ADN, proteínas y lípidos. Cuando tales daños moleculares exceden la función de la capacidad de reparación, los procesos de desarrollo son alterados, dando como resultado la muerte en el útero del producto o anomalías del desarrollo, llamada teratogénesis (Wells y Winn, 1996). La activación metabólica de los proterátogenos puede tener lugar en el organismo materno o en el tejido fetal, dependiendo de la edad gestacional de los fetos (Abraham, 1995; Cole y col., 1979; 1981; Galloway y col., 1980; Henderson, 1986; King y Wild, 1979).

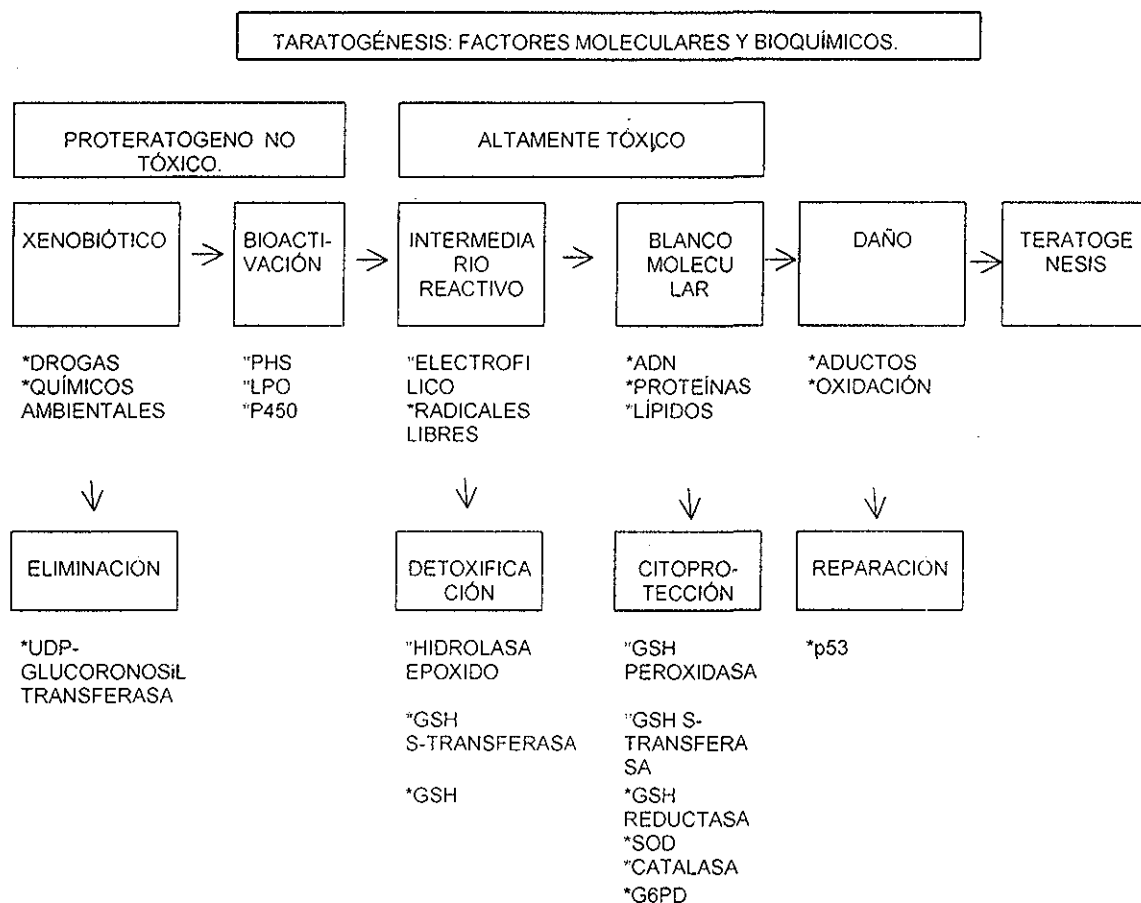
Existe controversia acerca de la edad a la cual el embrión o el feto puede empezar a metabolizar las sustancias químicas, algunos autores consideran que la actividad del citocromo P450 (CYP450) es muy baja en embriones de roedores, durante el periodo de organogénesis (día 15), aunque en algunos reportes mencionan que la bioactivación, atribuida a los citocromos de la familia 1A (CYP1A1), puede iniciarse durante la organogénesis en el ratón (Filler y Lew, 1981; Wells y Winn, 1996).

### **2.4 MECANISMOS DE PROTECCIÓN DEL EMBRIÓN.**

Poco se sabe acerca del proceso de reparación del ADN, en los embriones de mamífero. Se ha determinado experimentalmente que los embriones de ratón son capaces de eliminar bases dañadas, como las guaninas oxidadas, con una eficiencia similar a la que posee el hígado materno (Liu y Wells, 1995). También se ha descubierto que pueden reparar el daño producido por la exposición *in vivo* a metilmetanosulfonato (MMS) y a N-metil-N-nitrosourea (MNU), los cuales producen sustitución de bases (Bochert y col., 1978).

Además se ha postulado que existen mecanismos por medio de los cuales el embrión puede tener protección contra el daño producido por agentes químicos, como son, la eliminación de los xenobióticos, que puede llevarse a cabo por una familia de enzimas que catalizan su conjugación o de sus metabolitos con el ácido UDP-glucorónico, incrementando su solubilidad y facilitando su eliminación (Brierly y Burchell, 1993; Burchell y Coughtrie, 1989). Otra vía importante para la detoxificación es la conjugación con el glutatión (GSH), catalizada por la glutatión S-transferasa (GSTs). La importancia en la teratogénesis de los tóxicos, y

particularmente del GSH en la protección del embrión ha sido demostrada para varios teratógenos *in vivo* y en cultivos de embriones (Hales 1981; Ornaghi y col., 1993; Saillenfait y col., 1993; Wells y Winn, 1996).



ABREVIATURAS: SOD: enzima superóxido dismutasa; G6PD: enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa; UDP: Uridín difosfato; PHS: Prostaglandina H sintetasa; LPO: Lipo oxigenasa \*p53: gen tumor supresor; GSH: glutatión

Figura 1: Factores moleculares y bioquímicos que intervienen en la teratogénesis producida por agentes químicos (Tomado de Wells y Winn, 1996).

## 2.5 GENOTÓXICIDAD.

Genotóxicidad es un término muy general, que se refiere a los posibles efectos en el material genético, dichos efectos pueden dividirse en dos tipos: macro-lesiones y micro-lesiones. Las macro-lesiones son anomalías que pueden ser vistas en una preparación citológica, como los cariotipos, ya que son alteraciones en el número de los cromosomas, rompimientos, rearrreglos o deleciones grandes del material cromosómico. Mientras que las microlesiones involucran uno o pocos pares de bases y estas incluyen sustitución, adición o deleción de pares de bases (Scialli, 1992)

Existen varios tipos de cambios citogenéticos o macrolesiones que pueden ser detectados en los cromosomas, como las aberraciones cromosómicas estructurales y los cambios numéricos los cuales pueden originar aneuploidías. La prueba de aberraciones cromosómicas es usada para detectar la inducción de rompimientos cromosómicos en células somáticas o germinales por medio de la observación directa del cromosoma durante el análisis de metafase (Anderson, 1993).

De los daños que puede producir un agente químico, las aberraciones cromosómicas tienen un gran impacto durante la preñez, ya que entre el 50 y 60% de los abortos espontáneos, en embarazos reconocidos, están asociados con anomalías cromosómicas. Los embriones cromosómicamente anormales son generalmente seleccionados en las primeras semanas de vida por mecanismos que involucran el desarrollo de la placenta y la implantación (interacciones materno-fetal), lo cual puede llegar a generar un aborto. Las aberraciones cromosómicas pueden causar cambios en la morfología y en la función de la placenta (tales como tamaño, forma, vascularidad y la presencia de inclusiones trofoblásticas). Se postula que las aberraciones pueden también afectar la proliferación celular o la muerte celular programada (apoptosis) durante la diferenciación de las vellosidades coriónicas (Qumsiyeh y col., 2000).

## **2.6 CITOGENÉTICA Y TERATOGENÉESIS.**

### **2.6.1 Citogenética y Teratogénesis transplacentaria.**

Mientras que la mutagénesis es un proceso que se puede dar en una sola célula, la teratogénesis es un fenómeno que involucra una población celular donde el efecto final es determinado por un balance crítico entre las células afectadas y las no afectadas. Durante la organogénesis, el daño genético puede darse simultáneamente en la mayoría de las células que constituyen un órgano en crecimiento. Sin embargo, el efecto teratogénico puede ser causado, también, por fenómenos secundarios de la mutagénesis, como son, la reducción de la actividad mitótica y la muerte celular, producidas por el mutágeno durante la morfogénesis (Novotná y Jelínek, 1990).

Aunque no existen evidencias directas de la relación entre el daño genotóxico y la teratogénesis, estudios con animales sugieren que la exposición transplacentaria a agentes genotóxicos incrementa la muerte fetal y las malformaciones congénitas (Kola y col., 1986; Meyne y Legator, 1983). Por lo que se ha propuesto que existe, una relación causal entre estos dos efectos, ya que se demostró que algunos agentes mutagénicos también tienen acción teratogénica (Hsu y Hirschhorn, 1977; Novotná y Jelínek, 1986).

Lo anterior es apoyado por existencia de ciertos agentes químicos como el clorambucil, la mostaza nitrogenada y la estreptonigrina, que son teratógenos y también producen anomalías cromosómicas en los embriones de rata (Matsuda y col., 1983; Soukup y col., 1967; Szabo, 1989). Numerosos agentes

que inhiben la síntesis de ADN también son teratogénicos y se postula que, la muerte celular asociada con la reducción de la síntesis, es uno de los factores más importantes en la producción de anomalías en el desarrollo (Kola y col., 1986; Manson, 1981).

Sin embargo, se sabe que no todos los agentes teratogénicos tienen actividad mutagénica, ya que existen agentes que producen malformaciones en más del 90% de los embriones de ratas tratadas sin producir cambios cromosómicos visibles citogenéticamente, como la hidroxiurea y la deficiencia materna de riboflavina (Szabo, 1989). Hicantone, un antiparásitario, con actividad antitumoral, produce embriofetalidad y teratogénesis en el ratón y el conejo pero no produce cambios citogenéticos en células maternas ni fetales (Sieber y col., 1974; Szabo, 1989).

Aunque también existe la posibilidad de que solamente una porción del daño cromosómico inducido experimentalmente sea detectado en el embrión *in vivo*, debido al daño o muerte de las células, las cuales tal vez no puedan llegar a la etapa de metafase para revelar los cambios cromosómicos (Szabo, 1989).

Dentro de los parámetros que se han analizado en embriones *in vivo* se encuentran: el porcentaje de células con aberraciones cromosómicas (Adler, 1983; Fränz, 1978; Inui y col., 1978; Soukup y col., 1967; Theiss y col., 1983), la frecuencia de micronúcleos en sangre e hígado fetal (Cole y col., 1979; 1981; 1982; Henderson, 1986; King y Wild, 1979) y la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (Allen y col., 1981; Au y col., 1982; Basler, 1979; Braun y col., 1986; Henderson, 1986; Kram y col., 1980).

### **2.6.2 Citogenética y teratogénesis en los descendientes (F1) de machos tratados.**

Existen evidencias epidemiológicas de que la exposición paterna a agentes químicos que se encuentran en el ambiente o en el área de trabajo puede producir abortos espontáneos, defectos al nacimiento y cáncer en su descendencia (Narod y col., 1988; Savitz y Chen, 1990), sin embargo a pesar del peligro que esto representa, se sabe poco acerca del o los mecanismos involucrados en la producción de estos efectos (Wyrobek, 1993).

La fertilización con espermatozoides con algún defecto genético, puede causar efectos adversos en el desarrollo de embriones antes o después de la implantación (Titenko-Holland y col., 1998).

Para examinar los efectos genotóxicos de la exposición de los padres (machos) a agentes químicos, se han empleado las pruebas de: mutaciones letales dominantes (LD) y translocaciones heredables (TH) en roedores (Shelby, 1996). La prueba de LD es usada para detectar la inducción de anomalías cromosómicas, numéricas o estructurales que producen la muerte embrionaria. La prueba de TH detecta la inducción de rearrreglos cromosómicos transmitidos a las

crías de machos tratados que producen esterilidad, semiesterilidad y algunas veces defectos en el desarrollo morfológico o neurológico.

Aun no se conoce el papel que tienen las aberraciones cromosómicas estructurales y numéricas, en el daño encontrado en los descendientes de los padres tratados con agentes químicos. Algunas de las crías que presentan malformaciones y cáncer también presentan aberraciones. Existen estudios que apoyan la hipótesis de que mecanismos diversos, incluyendo fallas en la fertilización, retardo o inhibición de la proliferación, muerte celular (en la forma de necrosis) y el daño citogenético (aberraciones: AC y micronúcleos MN) en embriones morfológicamente normales y anormales, están involucrados en la toxicidad producida por el tratamiento de machos (Titenko-Holland y col., 1998).

Los efectos producidos en los descendientes de machos tratados, pueden deberse a daño genético o epigenético en el espermatozoide, a la presencia del agente o de sus metabolitos en el semen el cual puede afectar el producto directamente o actuar en el útero grávido (Brinkworth, 2000), o pueden deberse a mecanismos indirectos o sistemáticos en el macho que afectan el nivel hormonal y posiblemente la libido (Joffe, 1979; Soyka y Joffe, 1980; Tyl, 1993).

## 2.7 CICLOFOSFAMIDA.

La Ciclofosfamida (figura 2), es un agente alquilante empleado como antineoplásico para el tratamiento de muchas clases de enfermedades, como por ejemplo, la enfermedad de Hodgkin, leucemia, mieloma múltiple, sarcoma ovárico y linfosarcoma, también se utiliza como inmunosupresor y es uno de los agentes alquilantes, más estudiado por sus efectos teratogénicos y mutagénicos. Esta sustancia requiere ser metabolizada por el organismo para adquirir sus propiedades antineoplásicas, mutagénicas y teratogénicas (Anderson y col., 1995; IARC, 1987).

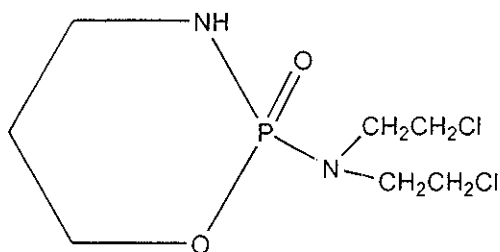


Figura 2. Estructura química de la ciclofosfamida. (2-[bis-(2-chloroethyl)amino]-tetra-hidro-2H-1,3,2-oxazaphosphorine-2-oxide).Peso Mol. 260.

### 2.7.1 Metabolismo de la Ciclofosfamida.

La ciclofosfamida es metabolizada principalmente en el hígado, aunque

otros órganos también pueden metabolizarla (Brock y col 1971; Foley y col., 1961; Kachel y Martin 1994; Patel 1987) El sistema de citocromo P-450 cataliza la oxidación de la ciclofosfamida en la posición del carbón 4 y produce la 4-hidroxiciclofosfamida, la cual existe en equilibrio tautomérico con la aldofosfamida bajo condiciones fisiológicas, estas se descomponen espontáneamente produciendo mostaza de fosforamida y acroleína. La 4-hidroxiciclofosfamida y aldofosfamida pueden además ser oxidados y formar carboxifosfamida y 4-ceto-ciclofosfamida (Kachel y Martin 1994; Little y Mirkes 1990; Moore 1991; Struck y col , 1983) (Figura 3)

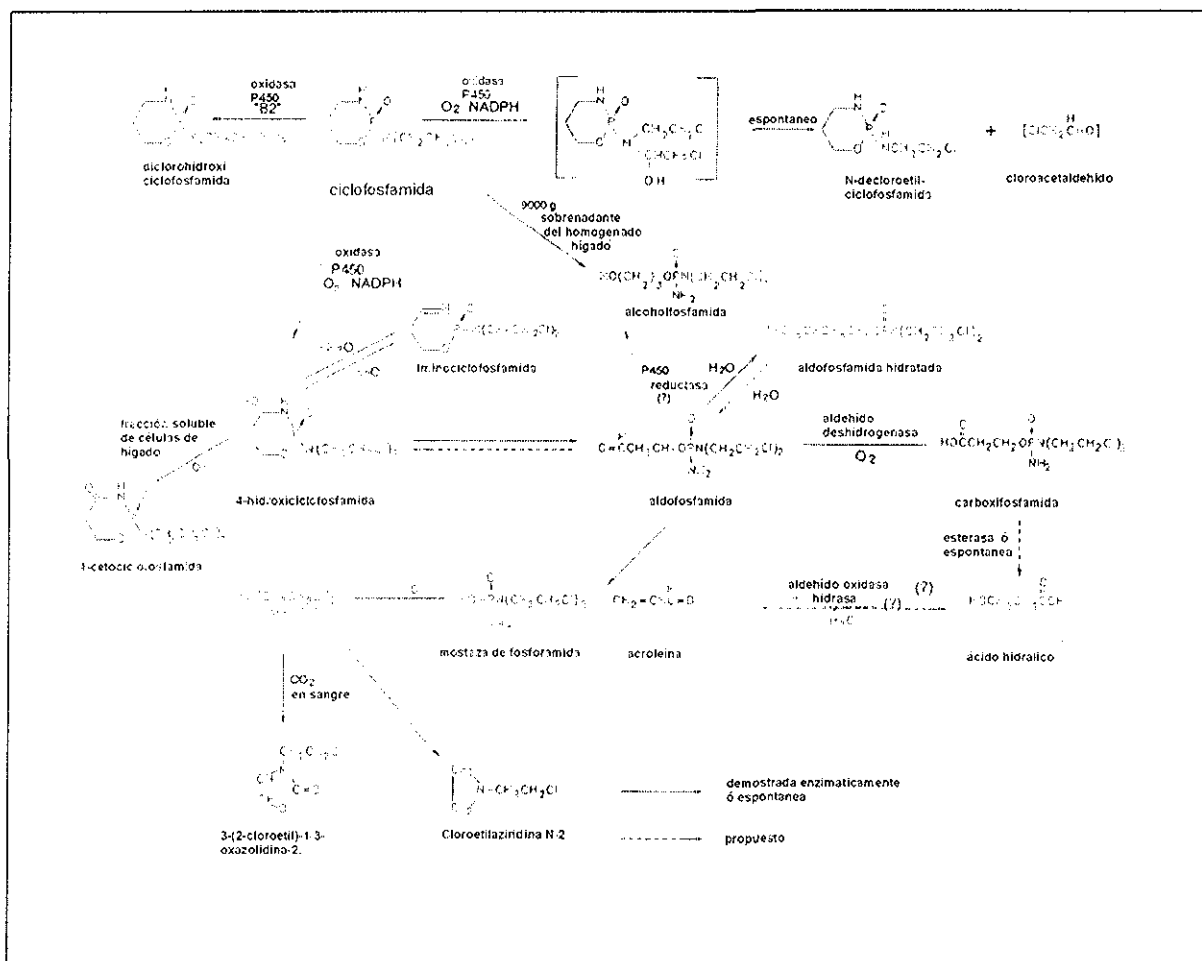


Fig. 3. Diagrama del metabolismo de la ciclofosfamida. Tomado de Struck y Col., 1994

Se sabe que en el hígado de la rata las principales formas de citocromo P-450 responsables del metabolismo de la CF son la 2C6 y la 2C11, mientras que en el humano la forma 2B6 es probablemente la responsable de este proceso (Anderson y col., 1995; Cholerton y col., 1992; Jao y col., 1972). sin embargo en el ratón no se conocen las formas que participan en el metabolismo de esta sustancia

La distribución de la CF y su metabolismo ha sido estudiada en humanos y en varios modelos animales (Brock y col., 1971) En pacientes que recibieron de 6 a 80 mg/kg de CF marcada, se observó que la distribución a todos los tejidos fue muy rápida, mostrando una vida media en el plasma sanguíneo de 6.5 h. La eliminación o excreción de la CF se da entre 5 y 8.2 horas (Anderson y col., 1995; Moore, 1991)

En estudios con plasma sanguíneo de ratas y de humanos tratados con CF, se encontró que el pico de la concentración de los metabolitos producidos, se presentaba a las 2 horas y permanece aproximadamente constante entre 3 y 4 horas, después de lo cual la droga es eliminada. El 60% de los metabolitos de la droga son excretados en los 4 primeros días y del 10 al 14% son eliminados sin cambio. Esto explica porque se observan efectos desde las 2 primeras horas hasta después de varios días de la administración de la CF en varios sistemas de prueba (Anderson y col., 1995)

En 1988 Benson y col., analizaron la formación de aductos de la CF con el ADN. El tiempo de formación del enlace se observó entre 2 y 7 horas después de la aplicación intraperitoneal en el ratón, mientras que en la rata el tiempo estimado fue de entre 1 a 4 h. El principal aducto formado fue el N-(2-hidroxietil)-N-[2-(7-guaninil)etil] amina

La vida media de la CF en ratonas preñadas, fue de 40 min, la concentración máxima se encontró a los 20 min después de la aplicación. Al realizar una estimación del tiempo de llegada de la sustancia al embrión preimplantado, que se encontraba en el tubo uterino, éste fue muy similar al encontrado para los tejidos maternos (Suero materno  $t/2 = 30$  min, tubos uterinos  $t/2 = 45$  min). El tiempo de vida media de la CF en diferentes especies fue de: 0.2 h en el ratón, de 0.7 h en rata y en el hombre de 4 h (Spielmann y Vogel., 1987)

Se cree que la mostaza de fosforamida es el principal metabolito con actividad antineoplásica de la CF, mientras que la acroleína, la cual es altamente tóxica y es producida en cantidad equimolar, es la responsable de los efectos tóxicos (Anderson y col., 1995; Brock y col., 1971; Hales, 1982; IARC, 1987)

La ciclofosfamida puede ser transformada a sus formas biológicas activas en el hígado materno, en la placenta o en el tejido fetal (Chorvatovicova y Ujházy, 1995)

### **2.7.2 Efectos mutagénicos de la ciclofosfamida.**

La CF produce daño genético en las células somáticas de humano, ya sea por exposición laboral o por tratamiento médico, incrementando la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH's), de aberraciones cromosómicas, de micronúcleos y de mutaciones en el gen hprt (Ammenheuser y col., 1988; Bigbee y col., 1990; Dobos y col., 1974; Düker, 1981; Huttner, 1992; Musilova y col., 1979;

Raposa 1978; Schuler y col., 1979; Sorsa y col., 1988)

Los efectos mutagénicos de la CF han sido comprobados en diferentes estudios citogenéticos *in vivo*, utilizando como modelos de prueba a la rata, al ratón y al hámster Chino, evaluando el daño que produce en diferentes tipos de células somáticas, como las de la médula ósea y los linfocitos y en las de células fetales. Los resultados muestran que es un buen inductor de daño cromosómico, produce rompimientos de tipo cromatídico característico de los compuestos ciclo-dependientes o S-dependientes (Adler, 1990; Anderson y col., 1995; Ghaskadbi y col., 1992; Goetz y col., 1975; Krishna y col., 1986; Meyne y Legator, 1983; Röhrborn y Basler, 1977)

Por otro lado, la CF también produce daño cromosómico en células germinales de ratón, rata y hámster Chino (Allen y col., 1987; Backer y col., 1988; Cusido y col., 1995; Hansmann, 1974; Johannisson y Ocker., 1997; Lähdetie, 1988; Moreland y col., 1981; Pacchierotti y col., 1983; Qiu y col., 1995; Schleiermacher, 1968; Skare y Schrotel, 1984; Sotomayor y col., 1978; Waters y Nolan 1995). Se sabe que también produce daño en los embriones descendientes de machos tratados. Se ha registrado 12% de translocaciones en los descendientes de ratones machos tratados con 350 mg/kg (Jenkinson y Anderson, 1990; Sotomayor y Cumming, 1975), mientras que con dosis de 210 mg/kg produce cerca del 6% de translocaciones en embriones de 13-16 días de gestación (Datta y col., 1970)

### **2.7.3 Efectos embriotóxicos y teratogénicos de la CF.**

La ciclofosfamida es capaz de producir efectos embriotóxicos y teratogénicos en diferentes organismos cuando se administra a hembras preñadas (transplacentariamente). En ratón la ciclofosfamida produce exencefalia, paladar hendido y defectos en los dedos cuando es administrada durante los días 10 y 12 de la gestación (Chernoff y col., 1989; Francis y col., 1990; Gebhardt, 1970). Dependiendo del día de la aplicación, de la vía de administración y de la dosis, las malformaciones oculares inducidas en conejos, ratas y ratón pueden ser: ojos abiertos, afaquia y microfaquia (Piersma y col., 1991). Anormalidades de la cola, sindactilia, oligodactilia, polidactilia, focomelia y amelia fueron las malformaciones encontradas en ratón después de la aplicación de 10-40 mg/kg de CF (Mirkes, 1985; Torchisky y col., 1995).

En el humano se ha reportado que el tratamiento con ciclofosfamida en el primer trimestre, de desarrollo embrionario, produce malformaciones tales como; ausencia de dedos, falta de una arteria coronaria y hernia umbilical e inguinal. Mientras que su administración en el segundo trimestre puede originar retardo en el desarrollo físico y mental, carcinogénesis e infertilidad, efectos que pueden aparecer después de muchos años (Nicholson 1968; Sokal y Lessmann, 1960; Toledo y col., 1971; Zemlickis 1993). En 1993 Zemlickis reportó el caso de una mujer que fue tratada con ciclofosfamida (quimioterapia) durante el primer trimestre de embarazo y dio a luz a gemelos, un varón y una niña. En este caso la



niña fue normal pero el niño presentó múltiples anomalías congénitas y además desarrolló cáncer once años después

#### **2.7.4 Citogenética y teratogénesis de la ciclofosfamida.**

##### **2.7.4.1. Análisis citogenético y teratogénico de la aplicación transplacentaria de la ciclofosfamida.**

Existen algunos trabajos donde se ha realizado el análisis citogenético de los fetos obtenidos de madres tratadas con ciclofosfamida, como por ejemplo el de Braun y col., en 1986, quienes evaluaron el efecto transplacentario de la aplicación de 5 y 10 mg/kg de ciclofosfamida, en embriones de ratón de 10 días de gestación. Sus resultados mostraron que con la dosis de 10 mg/kg, se producían 1.3% de células con aberraciones cromosómicas, del macerado del embrión completo. Meyne y Legator en 1983, también encontraron un incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales en embriones de ratón de 12 días de gestación.

Porter y Singh (1988) encontraron un alto grado de asociación entre la frecuencia de ICH's y la incidencia de malformaciones en los fetos de ratón expuestos transplacentariamente a CF, por otra parte Novotná y Jelínek (1990) analizaron la frecuencia de aberraciones cromosómicas y la proliferación celular en varios tejidos de embriones de pollo, después de la administración de CF y encontraron que el efecto de retardo del ciclo celular, también producía incremento del porcentaje de células muertas y un incremento del porcentaje de células con aberraciones cromosómicas y postularon que todos estos efectos producen una morfogénesis anormal.

##### **2.7.4.2 Análisis citogenético y teratogénico en la F1 de machos tratados con ciclofosfamida.**

Existen trabajos que muestran que la aplicación de una sola dosis de 100 mg/kg de CF a ratas y ratones machos, puede producir un incremento de descendientes con malformaciones macroscópicas (Jenkinson y col., 1987; Jenkinson y Anderson, 1990). En ambos casos la malformación más frecuente fue, el retardo en el crecimiento, mientras que la exencefalia fue la segunda malformación más frecuente en ratón y en la rata la segunda fue la anasarca (edema masivo generalizado).

Fabricant y colaboradores en 1983, encontraron un incremento de la muerte postnatal así como cambios en la conducta de la progenie de ratas macho tratados con CF. También se ha reportado, disminución del peso fetal, incremento de la incidencia de fetos malformados y modificaciones en la conducta en la F2 y en las generaciones subsecuentes (Anderson y col., 1995; Auroux y col., 1990; Hales y col. 1992).

Albanese en 1987, reportó que embriones de ratones de 8 y 15 días de

gestación, descendientes de machos tratados con CF, presentaban un incremento en la frecuencia de células con aberraciones cromosómicas estructurales, este incremento correlacionó muy bien con el parámetro de letales dominantes.

Jenkinson y Anderson en 1990, reportaron un incremento en la frecuencia de fetos con malformaciones macroscópicas y de menor tamaño, en los descendientes de rata macho tratados oralmente con una solución de CF (dosis de 3.5-5.1 mg/kg). Además de 53 fetos anormales, analizados cromosómicamente, el 36% tenían translocaciones, trisomías y deleciones.

#### 2.7.5 Mecanismos de acción de la ciclofosfamida (CF).

La CF es un agente alquilante cuyos efectos teratogénicos y mutagénicos han sido demostrados en muchas especies. El mecanismo de su acción mutagénica se basa principalmente en la inhibición de la síntesis del ADN lo cual origina la muerte de las células en proliferación (Colvin, 1983; Chernoff y col, 1989; Little y Mirkes 1990). También se sabe que es capaz de formar enlaces covalentes (Benson y col., 1988) y de oxidar al ADN y algunos lípidos (Lear y col., 1992; Pillans y col., 1989).

Se han propuesto varios mecanismos para explicar su efecto teratogénico, entre los que se encuentran los mismos que originan su genotoxicidad, como: la inhibición de la síntesis del ADN que produce principalmente muerte celular (Little y Mirkes, 1990; Mirkes, 1985; Novotná y Jelínek, 1990). En experimentos *in vitro* de los brotes de extremidades de ratón, reportan una relación entre los efectos teratogénicos y la muerte celular (Manson y col., 1982). También se ha observado que la CF es capaz de alterar el ciclo celular en embriones de pollo *in vivo* (Heringová y col., 1998).

Además de inhibir la síntesis del ADN, la CF también inhibe la síntesis de histonas en blastocistos de 84 h de edad, produciendo un incremento significativo en el número de células con aberraciones cromosómicas. También inhibe la actividad de la fosfatasa alcalina no específica y de la esterasa (Kola y Folb, 1985; Kola y Col., 1986) y se ha propuesto que la fosfatasa alcalina juega un papel importante en la diferenciación celular del embrión preimplantado (Lois e Izquierdo, 1984; Mulnard y Huygens, 1978).

También se ha propuesto como otro de los posibles mecanismos de la CF, la modificación de la apoptosis celular (Chen y col., 1994; Chang y col., 1998). En 1995 Torchisky y colaboradores encontraron una alta correlación, entre la modificación del número de células que se encontraban en apoptosis y la severidad de las anomalías presentes en las extremidades y en la cola de fetos de ratón de 13 días de gestación tratados con este compuesto.

Con base en varios experimentos en donde la co-administración de la CF y tiorles tales como la cisteína o el glutatión, disminuyeron el número de fetos de rata con malformaciones, se postuló que uno de los mecanismos de la teratogenicidad

de la CF puede ser la generación de radicales libres (Ashby y col , 1976; Dirven y col., 1994; Fantel, 1996; Hales 1981; Kanekal y Kehrer, 1993; Wells y Winn 1996) o de moléculas oxígeno reactivas (Al-Bekairi y col , 1991; Chorvatovicova y Ujházy, 1995; Ghaskadbi y col , 1992; Kola y col , 1989). Se ha demostrado que tanto la GSTs, (Dirven y col., 1994) como la Superóxido-dismutasa (Kanekal y Kehrer, 1993), participan en la protección contra el daño teratogénico de la ciclofosfamida, lo cual apoya la idea de que uno de los mecanismos de esta sustancia puede ser la formación de radicales libres (Ashby y col , 1976; Hales 1981; Wells y Winn 1996).

Por otro lado la presencia de fetos malformados en las camadas de machos tratados, sugiere que el efecto de la ciclofosfamida sobre algunas de las características genéticas del espermatozoide puede originar efectos teratogénicos (Jenkinson y Anderson, 1990), además de producir letales dominantes y translocaciones heredables, lo cual es importante, ya que esos efectos demuestran que algunas mutaciones producidas por la CF pueden realmente causar daños en el organismo de los descendientes de los machos expuestos a este compuesto

Dado que la CF requiere ser metabolizada para la producir efectos mutagénicos y teratogénicos, algunos investigadores analizaron el efecto de sus metabolitos y encontraron que los metabolitos con mayor actividad teratogénica son la acroleína y la mostaza de fosforamida (Mirkes y col., 1981; Slott y Hales, 1987).

Tanto la mostaza de fosforamida como la acroleína, a concentraciones teratogénicas, pueden dañar el ADN, y la mostaza de fosforamida puede formar entrecruzamientos en el ADN y rompimientos de una hebra (Little y Mirkes, 1987; Little y Mirkes 1990; Mirkes, 1985) dando como resultado la alteración del ciclo celular en forma dosis-dependiente, con un decremento en el porcentaje de células en  $G_1/G_0$ , un retraso en la fase S, y un incremento en el porcentaje de células en  $G_2/M$ . A concentraciones altas se observa un incremento en la cantidad de desechos nucleares y evidencias histológicas de muerte celular (Little y Mirkes 1992).

La acroleína es un mutágeno conocido que puede formar enlaces covalentes con el ADN (Chung y col , 1984; Lutz y col ,1982). Varios grupos han demostrado que la acroleína puede causar daño al ADN, principalmente rompimiento de una cadena (Crook y col , 1986; Erickson y col., 1980) También se sabe que la acroleína tiene una alta reactividad por los tioles libres que enlazan proteínas y puede causar una disminución del glutatión el cual es el principal tiol celular (Ku y Billings 1986; Little y Mirkes, 1990; Ohno y col , 1985)

### 3.0 JUSTIFICACIÓN.

Basados en evidencias epidemiológicas y de estudios con animales que sugieren que la exposición transplacentaria a agentes genotóxicos incrementan el porcentaje de muerte fetal, malformaciones congénitas y la incidencia de cáncer varios autores han postulado la existencia de una relación entre el efecto mutagénico y teratogénico de los agentes químicos. Además lo anterior también es apoyado por lo observado cuando se aplica tratamiento a ratas y ratones macho, donde sus descendientes presentan anomalías congénitas y un porcentaje elevado de células con anomalías cromosómicas.

Hasta ahora las evidencias de la posible relación entre ambos efectos, han sido obtenidas de trabajos donde se evalúan éstos parámetros en organismos diferentes, haciendo difícil comprobar si existe o no tal relación. Por lo cual en el presente trabajo proponemos que si se emplea una sustancia que sea capaz de producir tanto efectos genotóxicos como teratogénicos (Ciclofosfamida) y un método que permita evaluar malformaciones morfológicas externas y aberraciones cromosómicas en el mismo individuo, esto permitirá aclarar si ambos efectos tienen alguna relación.

### 4.0 HIPÓTESIS.

Por lo tanto se espera que al tratar ratones de la cepa CD-1, machos y hembras preñadas con ciclofosfamida, se produzcan en ambos casos descendencia con malformaciones y alteraciones cromosómicas y si existe una relación directa entre ambos efectos se espera que los embriones descendientes de los padres tratados que presenten malformaciones también presenten un incremento en el porcentaje de células con AC.

Si ambos eventos no están relacionados se espera que en algunos fetos, la frecuencia de AC se incremente sin la presencia de malformaciones o que se presente un aumento en la incidencia de malformaciones sin la presencia de AC.

### 3.0 JUSTIFICACIÓN.

Basados en evidencias epidemiológicas y de estudios con animales que sugieren que la exposición transplacentaria a agentes genotóxicos incrementan el porcentaje de muerte fetal, malformaciones congénitas y la incidencia de cáncer varios autores han postulado la existencia de una relación entre el efecto mutagénico y teratogénico de los agentes químicos. Además lo anterior también es apoyado por lo observado cuando se aplica tratamiento a ratas y ratones macho, donde sus descendientes presentan anormalidades congénitas y un porcentaje elevado de células con anormalidades cromosómicas.

Hasta ahora las evidencias de la posible relación entre ambos efectos, han sido obtenidas de trabajos donde se evalúan éstos parámetros en organismos diferentes, haciendo difícil comprobar si existe o no tal relación. Por lo cual en el presente trabajo proponemos que si se emplea una sustancia que sea capaz de producir tanto efectos genotóxicos como teratogénicos (Ciclofosfamida) y un método que permita evaluar malformaciones morfológicas externas y aberraciones cromosómicas en el mismo individuo, esto permitirá aclarar si ambos efectos tienen alguna relación.

### 4.0 HIPÓTESIS.

Por lo tanto se espera que al tratar ratones de la cepa CD-1, machos y hembras preñadas con ciclofosfamida, se produzcan en ambos casos descendencia con malformaciones y alteraciones cromosómicas y si existe una relación directa entre ambos efectos se espera que los embriones descendientes de los padres tratados que presenten malformaciones también presenten un incremento en el porcentaje de células con AC.

Si ambos eventos no están relacionados se espera que en algunos fetos, la frecuencia de AC se incremente sin la presencia de malformaciones o que se presente un aumento en la incidencia de malformaciones sin la presencia de AC.

## 5.0 OBJETIVOS.

### ***Objetivo General.***

Evaluar el efecto genotóxico y la frecuencia de malformaciones externas producidas por la administración de la ciclofosfamida en ratones de la cepa CD-1 *in vivo*, empleando una metodología que permita determinar ambos efectos en el mismo organismo.

### ***Objetivos Particulares.***

I: Validar el modelo de ratón: Evaluar el efecto de la ciclofosfamida sobre el índice mitótico y la frecuencia de aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratones macho y hembra CD-1.

II: Evaluar el efecto genotóxico y teratogénico, del tratamiento transplacentario de la ciclofosfamida, empleando una metodología que permita evaluar ambos efectos en el mismo organismo

II.1: Evaluar la frecuencia y el tipo de malformaciones macroscópicas o externas en los embriones obtenidos de las hembras tratadas con CF.

II.2: Evaluar el efecto de la ciclofosfamida sobre el índice mitótico y la frecuencia de aberraciones cromosómicas en las células del hígado de los embriones obtenidos de hembras tratadas con CF

III: Evaluar el efecto genotóxico y la frecuencia de malformaciones producidas en la F1, de ratones macho tratados con ciclofosfamida. Tratar de evaluar ambos efectos en el mismo organismo

III.1: Cuantificar el número y tipo de malformaciones macroscópicas inducidas por la ciclofosfamida en los embriones descendientes de ratones macho tratados.

III.2: Analizar el efecto de la ciclofosfamida sobre el índice mitótico y la frecuencia de aberraciones cromosómicas en las células de hígado de los embriones obtenidos de los machos tratados.

## 6.0 MATERIALES Y MÉTODOS.

### 6.1. COMPUESTO.

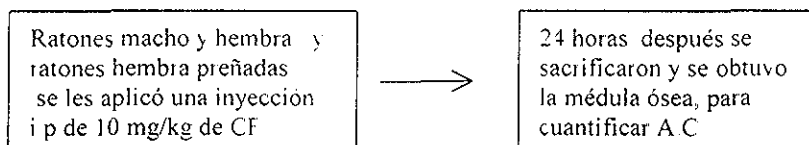
Ciclofosfamida (CF):  $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P \cdot H_2O$  (2H-1,3,2-Oxazaphosphorine), fue obtenida de Sigma Chemical Co (St. Louis MO USA), peso molecular 279.1. Se disolvió en agua destilada para su aplicación.

### 6.2. ANIMALES.

Se utilizaron ratones hembras y machos de la cepa CD-1 de dos meses y medio de edad, los cuales se mantuvieron en condiciones controladas de bioterio luz-obscuridad, con agua y alimento a libre demanda y se aclimataron durante una semana antes del tratamiento.

### 6.3. PROTOCOLOS.

#### 6.3.1 Protocolo 1. Efecto citogenético en la médula ósea de ratón adulto.



Para el análisis y evaluación de las aberraciones cromosómicas, se administró intraperitonealmente (ip) una dosis única de 10 mg/kg a 4 ratones machos, 4 hembras y 4 hembras preñadas. En este caso se contó con 3 grupos de animales testigos negativos (4 machos, 4 hembras no preñadas y 4 hembras en el día 10 de preñez) a los cuales se les aplicó un volumen equivalente del vehículo (agua destilada).

Veintidós horas después de la aplicación de la CF a todos los grupos, excepto al de las hembras preñadas, se les administró ip 0.1 ml por cada 10 gramos de peso de una solución de colchicina al 0.1%. Dos horas después se sacrificaron por dislocación cervical y se les extrajo la médula ósea con 5 ml de solución hipotónica (KCl al 0.057M) y se dejó incubando a 37°C por 30 min. Después de la incubación, las células se centrifugaron y se fijaron con una solución 3:1 de metanol-ácido acético, se realizaron 3 cambios del fijador y el paquete celular fue resuspendido en solución fresca del mismo, para realizar por goteo las preparaciones, las cuales fueron secadas y teñidas con una solución de Giemsa al 10% en agua corriente para posteriormente revisarlas al microscopio óptico.

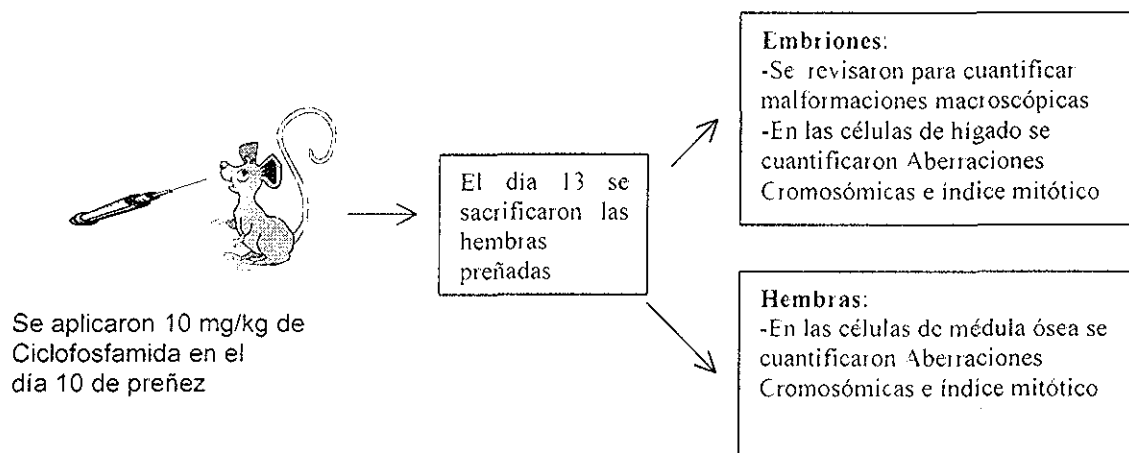
En el caso de las hembras preñadas, 24 horas después de la aplicación de la CF se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajo la médula ósea de ambos fémures la cual se colocó en solución de Hank's con 0.15 ml de una solución de colchicina al 0.1% durante 60 minutos, para después continuar con la técnica descrita anteriormente.

### 6.3.1.1 Registros y análisis estadístico de los datos.

Para el índice mitótico (IM) se evaluaron 4000 células de cada ratón, y 100 metafases por animal fueron revisadas para cuantificar el número y tipo de aberraciones cromosómicas, excluyendo los gaps.

Los resultados del IM y del porcentaje de células con aberraciones cromosómicas fueron analizados utilizando una prueba de Z de diferencia de proporciones. La media del número de aberraciones por célula fue analizada utilizando el análisis de varianza seguida de la prueba de "t" de Student.

### 6.3.2 Protocolo 2. Efecto transplacentario.



Se utilizó un grupo de 12 hembras preñadas a las cuales se les aplicaron 10 mg/kg de CF ip el día 10 de preñez. Al día 13 se sacrificaron por dislocación cervical y se obtuvieron los embriones por cesárea. En este tratamiento se trabajó también con 12 hembras en el grupo testigo.

#### 6.3.2.1. Registros para evaluar embriotoxicidad.

Todas las hembras se pesaron y revisaron diariamente, hasta que se sacrificaron y se registro la siguiente información

- Número de embriones totales
- Número de reabsorciones
- Peso fetal por camada
- Número de implantes totales

#### 6.3.2.2. Malformaciones macroscópicas.

Los embriones fueron revisados individualmente para registrar la frecuencia y tipo de malformación presente.



### 6.3.2.3. Análisis citogenético de los embriones.

A cuatro embriones de cada camada se les extrajeron los hígados y se colocaron en 5ml de una solución salina de Hank's a 37°C, se maceraron perfectamente y se les agregaron 0.15 ml de una solución de colchicina al 0.1%, dejándolos reposar a 37°C durante 90 minutos. Transcurrido este tiempo las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos y el botón celular se resuspendió en 5 ml de solución hipotónica (KCl 0.057 M) en la que se dejaron reposar durante 40 minutos a 37°C para centrifugarlo nuevamente y realizar 3 cambios de fijador (3:1 metanol-ácido acético). Finalmente las preparaciones se realizaron por goteo, se secaron a la flama y se tiñeron con Giemsa. En estas preparaciones se evaluó el índice mitótico (IM) y el porcentaje de células con aberraciones cromosómicas.

### 6.3.2.4. Análisis citogenético de las células de la médula ósea de las hembras preñadas con y sin tratamiento.

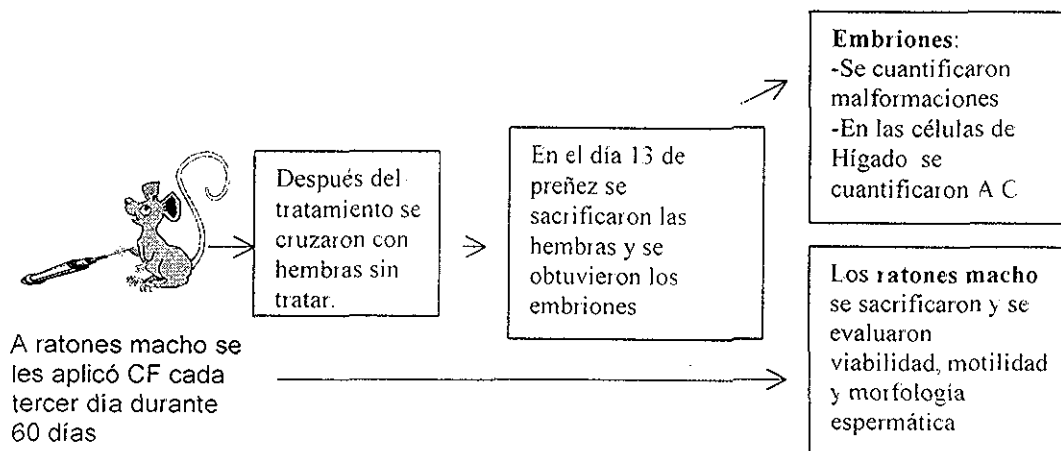
Una vez que fueron obtenidos los embriones, a las hembras se les extrajo la médula ósea la cual se colocó en solución salina de Hank's a 37°C y se siguió la misma técnica que para las muestras de hígado obtenidas de los embriones. Evaluando IM y frecuencia y tipo de aberraciones cromosómicas.

### 6.3.2.5. Registros y análisis estadístico de los datos.

Número de implantes por camada; Reabsorciones por camada; Media del peso fetal por camada: A estos parámetros se le aplicó la prueba de "t" de Student.

Embriones con malformaciones: Al porcentaje de embriones malformados y de camadas con embriones malformados se les aplicó la prueba de Z de diferencia de proporciones.

### 6.3.3 Protocolo 3. Efecto crónico en ratón macho y en sus descendientes.



Se utilizaron 7 grupos de 10 ratones machos cada uno, a los cuales se les aplicó una de las siguientes dosis: 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 15.0 ó 20 mg/kg de CF ip, durante 60 días cada tercer día. Al término de cada tratamiento los machos se dejaron descansar por 72 h y se cruzaron con dos hembras sin tratamiento. Las hembras preñadas se sacrificaron al día trece de preñez, se obtuvieron los embriones, se realizó la revisión de cada uno de estos para detectar malformaciones macroscópicas. De los grupos de tratamiento anterior se seleccionó la dosis más baja que produjera malformaciones gruesas para realizar el siguiente tratamiento.

#### **6.3.3.1. Registros para evaluar embriotoxicidad.**

Se pesaron y revisaron diariamente todas las hembras, hasta que se sacrificaron, para registrar la siguiente información:

- Número de embriones totales
- Número de reabsorciones
- Peso fetal por camada
- Número de implantes por camada

#### **6.3.3.2. Malformaciones macroscópicas.**

Los embriones fueron revisados individualmente para registrar la frecuencia y tipo de malformación presente.

#### **6.3.3.3. Análisis citogenético de las células fetales.**

A cuatro embriones de cada camada se les extrajeron los hígados y se colocaron en 5ml de una solución salina de Hank's a 37°C, se maceraron perfectamente y se les agregó 0.15 ml de una solución de colchicina al 0.1%, dejándolos reposar a 37°C durante 90 minutos. Transcurrido este tiempo las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos y el botón celular se resuspendió en 5 ml de solución hipotónica (KCl 0.057 M) en la que se dejaron reposar durante 40 minutos a 37°C para centrifugarlo nuevamente y realizar 3 cambios de fijador (3:1 metanol-ácido acético). Finalmente las preparaciones se realizaron por goteo, se secaron a la flama y se tiñeron con Giemsa. En estas preparaciones se evaluó el IM y el porcentaje de células con aberraciones cromosómicas (AC) según los criterios anteriormente descritos.

Después de las cruces los ratones macho fueron sacrificados y se obtuvieron los espermatozoides que se encontraban en el epidídimo y se evaluaron viabilidad, motilidad y morfología espermática.

#### 6.3.3.4 Registros y análisis estadístico de los datos.

Número de implantes por camada; Reabsorciones por camada; Media del peso fetal por camada: A estos parámetros se le aplicó la prueba de "t" de Student.

Embriones con malformaciones: Al porcentaje de embriones malformados y de camadas con embriones malformados se les aplicó la prueba de Z de diferencia de proporciones

Espermatozoides: A la viabilidad, motilidad y a la morfología espermática evaluadas se les aplicó la prueba de "t" de Student

## 7.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 7.1 RESULTADOS DEL PROTOCOLO 1: Efecto citotóxico y citogenético en la médula ósea de ratón adulto

#### 7.1.1. Índice mitótico (IM).

Los resultados obtenidos al evaluar el IM en los grupos de los ratones machos, de las hembras no preñadas y en el de las hembras preñadas tratados con 10 mg/kg de ciclofosfamida (CF) se muestran en la tabla 1. En todos los casos se observó que la aplicación del compuesto produjo una disminución de manera significativa del IM ( $P < 0.05$ ).

#### 7.1.2. Aberraciones cromosómicas (AC).

Las frecuencias y tipo de AC presentes en las células de la médula ósea de los ratones hembra y macho tratados con CF se muestran en la tabla 1. En el grupo testigo de ratones machos la frecuencia de células con aberraciones fue de  $0.8 \pm 0.5$ , observándose un incremento significativo en este valor en el grupo de machos tratados ( $26.0 \pm 6.5$ ). En el grupo de hembras tratadas también se obtuvo un incremento significativo de células con aberraciones, comparadas con el grupo de las hembras testigo ( $12.3 \pm 3.0$  vs  $0.5 \pm 0.6$ ).

Cuando se compararon los grupos de hembras preñadas tratadas con CF con el de hembras preñadas no tratadas, se observó un aumento significativo en la frecuencia de células con AC ( $4.8 \pm 1.3$  vs  $0.8 \pm 0.9$ ).

Al realizar el análisis de los datos entre las hembras no preñadas tratadas con CF y las hembras preñadas tratadas se encontró que estas últimas presentaban una menor frecuencia de AC ( $12.3 \pm 3.0$  vs  $4.8 \pm 1.3$ ), y en todos los casos los tipos de aberraciones más frecuentes fueron los rompimientos y los fragmentos de tipo cromatídico.

Por su lado, el análisis de las frecuencias de AC entre los grupos de hembras (preñadas y no preñadas) y machos tratados con CF mostró que los machos son más sensibles a esta sustancia (Tabla 1).

Tabla 1.1. Efecto de la aplicación intraperitoneal de 10 mg/kg de Ciclofosfamida sobre el índice mitótico (IM) y la frecuencia de células con aberraciones cromosómicas (AC) de la médula ósea de ratón hembra y macho de la cepa CD-1, evaluados 24 horas después de la aplicación.

Grupo	Ratón Número	Índice Mitótico (%)*	Cél con Aberraciones (%)**	Número de aberraciones.					
				Total de AC Σ	Romp. cromó- sómico	Romp. Cromati- dico	Fragmen- tos	Pulveri- zacio- nes	Poliploi- dias
Machos Testigos	1	28	1	1	0	1	0	0	0
	2	25	0	0	0	0	0	0	0
	3	18	1	1	0	1	0	0	0
	4	29	1	1	0	1	0	0	0
	Media ± de	2.5 ± 0.5	0.8 ± 0.5	3	0	3	0	0	0
Machos Tratados	1	15	32	50	2	15	25	8	0
	2	15	29	64	0	6	44	14	0
	3	15	26	36	0	10	18	8	0
	4	12	17	24	0	2	15	7	0
	Media ± de	1.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	26.0 ± 6.5 <sup>a</sup>	174	2	33	102	37	0
Hembras Testigos	1	22	0	0	0	0	0	0	0
	2	23	0	0	0	0	0	0	0
	3	26	1	1	0	0	1	0	0
	4	25	1	1	0	1	0	0	0
	Media ± de	2.4 ± 0.2	0.5 ± 0.6	2	0	1	1	0	0
Hembras Tratadas	1	15	10	19	1	14	4	0	0
	2	12	15	18	0	11	5	0	2
	3	15	9.0	15	0	8	7	0	0
	4	26	15	28	0	6	20	1	1
	Media ± de	1.7 ± 0.6 <sup>b</sup>	12.3 ± 3.0 <sup>bc</sup>	80	1	39	36	1	3
Hembras Preñadas Testigos	1	22	0	0	0	0	0	0	0
	2	25	0	0	0	0	0	0	0
	3	30	2	2	0	2	0	0	0
	4	17	1	1	0	1	0	0	0
	Media ± de	2.3 ± 0.6	0.8 ± 0.9	3	0	3	0	0	0
Hembras Preñadas Tratadas	1	0.97	5	5	0	5	0	0	0
	2	14	5	6	0	6	0	0	0
	3	12	6	8	0	4	4	0	0
	4	19	3	3	0	2	1	0	0
	Media ± de	1.4 ± 0.4 <sup>d</sup>	4.8 ± 1.3 <sup>ed</sup>	22	0	17	5	0	0

de= desviación estándar Romp = rompimiento

Se revisaron 4000 células por ratón para IM \*Analizadas con la prueba de diferencia de proporciones "Z"

Se revisaron 100 metafases para AC \*\* Analizada con "t" de Student

Diferencias Significativas: <sup>a</sup>P<0.05 vs grupo de machos testigo; <sup>b</sup>P<0.05 vs grupo de hembras testigo; <sup>c</sup>P<0.05 vs grupo de machos tratados; <sup>d</sup>P<0.05 vs grupo de hembras preñadas testigo <sup>e</sup>P<0.01 vs grupo de hembras tratadas

## 7.2. DISCUSIÓN DEL PROTOCOLO 1: Efecto citogenético en la médula ósea de ratón adulto.

Los resultados obtenidos en el primer grupo de experimentos concuerdan con los publicados anteriormente por varios autores en los cuales se reporta que la ciclofosfamida (CF) produce una alta frecuencia de aberraciones cromosómicas (AC) en las células de la médula ósea de ratón (Anderson y col., 1995; Goetz y col., 1975; Krishna y col., 1986; Meyne y Legator 1983; Novotná y Jelinek, 1986; Novotná y Jelinek 1990; Röhrborn y Basler 1977)

Los datos del presente trabajo muestran que hay una clara diferencia en la inducción de AC entre ratones macho y ratones hembra tratados con CF. Los ratones macho muestran un mayor porcentaje de células con AC, comparado con las hembras tratadas.

En trabajos previos se ha descrito que la CF incrementa la frecuencia de micronúcleos en diferente proporción entre individuos de distinto sexo y se ha reportado que los machos son más sensibles que las hembras, sin embargo no se encontraron diferencias respecto a la inducción de AC (Krishna y col., 1991; 1994). En 1985 Rabello-Gay y col. reportaron que en ratones desnutridos (con una dieta deficiente en proteínas), la frecuencia de AC causada por la aplicación de CF en machos adultos era mayor que en las hembras.

Se sabe que las variaciones en las respuestas entre machos y hembras, pueden ser debidas a diferencias en el metabolismo, a la presencia de diferentes isoenzimas (Hadidi y col., 1988; Timbrell, 1993), y a las diferencias en los ambientes hormonales internos, entre otros. En estudios realizados en hígado de rata, se reportó que la concentración de los citocromos P-450 (CYP), responsables del metabolismo de la CF, son más altos en los machos adultos que en las hembras (Semler y col., 1992).

En 1998 Robertson y colaboradores, encontraron que un citocromo el CYP 3A18, presentaba concentraciones 25 veces más altas en el hígado de los machos comparado con el de las hembras, mientras que otro el CYP3A9 presentaban un patrón inverso, fue 6 veces más alta en el hígado de las hembras. Con los datos anteriores concluyeron que la subfamilia de los citocromos CYP3A, en rata tiene isoformas específicas en machos y hembras, las cuales están reguladas por la hormona del crecimiento de una manera similar a otros citocromos P450 con dimorfismo sexual.

Los citocromos P-450 son una superfamilia de hemoproteínas, constituida por al menos 154 productos génicos (Kulkarni, 1997) y su principal función es el metabolismo de los xenobióticos. En la rata se sabe que los principales citocromos responsables del metabolismo de la CF son el CYP2C6 y el CYP2C11 (Kraner y col., 1996; McClure y Stupans, 1995; Weber y Waxman 1993), mientras que en el ratón no se ha descrito aún la subfamilia del citocromo responsable del

metabolismo de la CF, aunque se sospecha que el 2B1 pudiera estar involucrado en este proceso (Wei y col , 1994)

A pesar de que en el ratón no se han descrito diferencias en el contenido de los citocromos P-450 (Andress y col , 1992), es muy posible que los resultados observados en el presente trabajo se deban a diferencias sexuales en el sistema enzimático responsable del metabolismo de la CF, ya que se sabe que ciertos roedores presentan un dimorfismo sexual en la expresión de algunos genes hepáticos incluyendo los de algunos citocromos

En el humano si se han observado diferencias en la sensibilidad entre sexos. En 1993 Zemlickis y col , reportaron el caso de una mujer embarazada de 29 años de edad que fue tratada con ciclofosfamida, la cual dio a luz a gemelos, una niña normal y un varón con múltiples malformaciones el cual desarrolló cáncer después de algunos años. También se han observado diferencias con respecto a la edad, ya que, en los pacientes pediátricos el metabolismo de la CF es más rápido que en los adultos (Tasso y col , 1992)

Por otra parte cuando se realizó el análisis del porcentaje de células con aberraciones cromosómicas, en hembras preñadas y no preñadas, también se encontraron diferencias significativas. Las hembras preñadas presentaron un porcentaje menor de células con AC

Existen pocos informes sobre el daño citogenético en células de hembras preñadas y sólo se ha observado una respuesta diferencial en cuanto a la toxicidad (Beliles 1972; Nordberg y col., 1986) y aunque éstas diferencias no están bien documentadas, pueden tener una base hormonal o estar relacionadas con la alteración en la compartimentalización de los xenobióticos (Burrell y col , 1992; Mathews y Devi, 1994)

La preñez, es una condición fisiológica normal, la cual se caracteriza por cambios morfológicos y funcionales progresivos e importantes, que involucran prácticamente a todos los órganos y sistemas maternos y que pueden tener gran impacto en la absorción, la distribución y la eliminación de los compuestos químicos que se administran durante este periodo (Burrell y col., 1992; Holmstrom, 1990; Müller 1988; Nordberg y col., 1986; Odagiri y col., 1994; Wiebe y Sipila 1994; Zakrzewski , 1991).

En animales de laboratorio se ha descrito un incremento del peso del hígado materno durante la preñez (Campbell y col., 1974; Dean y Stock 1975; Neale y Parke 1973; Osimitz y Kulkarni 1985) y este incremento es atribuido a la proliferación de células del parénquima (Campbell y col , 1974) acompañado además por un incremento en la producción total de microsomas (Osimitz y Kulkarni 1985). Por otro lado durante la preñez también se han descrito cambios en la capacidad de oxidación de los citocromos P-450 (Feuer 1979; Feuer y Kardish, 1975; Guarino y col , 1969; Gut y col., 1976; Jannettl y Anderson, 1981; Kulkarni 1997; Lucier y col , 1975; Neale y Parke 1973; Osimitz y Kulkarni 1985;

Pak y Ecobichon, 1981; Schlede y Borowski, 1974; Symons y col., 1982; Tabei y Heinrichs, 1976; Turcan y col., 1981) y al parecer estos cambios son dependientes de la especie, del substrato examinado y de la edad de gestación (Kulkarni, 1997)

Los datos encontrados en la literatura sobre el contenido de los citocromos P-450 hepáticos durante la gestación, en el ratón, son contradictorios, ya que algunos casos se menciona que no se modifican (Gut y col., 1976; Osimitz y Kulkarni 1985; Schlede y Borowski, 1974) mientras que en otros se ha demostrado una disminución de éstos durante la preñez (Déan y Stock, 1975; Guarino y col., 1969; Kulkarni 1997; Miller y col., 1992; Neale y Parke 1973; Vodcnik y col., 1980), e incluso se describe la inducción de una isoenzima específica de la preñez llamada P-450gest (Hulla y Juchau, 1989; Jannettl y Anderson, 1981; Kulkarni, 1997; Lucier y col., 1975; Miller y col., 1992) en dos cepas de ratón (Lambert y col., 1987) misma que también se ha encontrado en el conejo (Williams y col., 1984) En algunos casos se han observado diferencias significativas en el metabolismo de sustancias que tienen la misma clase de biotransformación, entre los días 12 y 18 de gestación en el ratón (Osimitz y Kulkarni 1985)

Las diferencias observadas en las frecuencias de AC en relación al sexo y a la preñez encontradas en este trabajo, después del tratamiento con CF, pueden estar relacionadas con factores hormonales y su interacción con los citocromos P-450 (Angley y col., 1995; Chang y col., 1994; Kraner y col., 1996; McClure y Stupans, 1995), ya que se ha descrito que varios citocromos están regulados hormonalmente o son sexo-específicos (Chang y Bellward 1996; Honkakoski y col., 1992; Kato y Yamazoe, 1992; Sessink y col., 1996; Shimada y col., 1997; Warner y col., 1993), aunque no se descarta la posibilidad de que en el caso de las hembras preñadas se modifique la compartimentalización de los xenobióticos (Burrell y col., 1992; Mathews y Devi, 1994).



## 7.3 RESULTADOS DEL PROTOCOLO 2. Efecto transplacentario.

### 7.3.1 Efecto embriotóxico:

En la tabla 2.1 se presentan los resultados obtenidos al evaluar número total de implantes, reabsorciones y la media del peso del embrión por camada en el grupo de 12 ratones hembra preñadas tratadas con 10 mg/kg de CF en el día 10 de preñez y sacrificadas en el día 13, y los del grupo testigo. De los parámetros antes mencionados, solamente la media del peso embrionario por camada presentó una disminución, en el grupo tratado, la cual fue estadísticamente significativa comparada con el grupo testigo (2.5g vs 3.5g)

**Tabla 2.1: Efecto de la administración de 10 mg/kg de ciclofosfamida a ratones hembra, en el día 10 de preñez y sacrificadas el día 13.**

	Testigos	Tratados CF.
Número de hembras preñadas	12	12
Número total de implantes	140	153
Implantes /camada (X±d.e)	11.6 ±1.2	12.75±2.4
Media de reabsorciones/Camada (X±de)	0.9±0.9	0.6±0.6
Total de embriones obtenidos	129	146
Media del peso embrionario g/Camada (X±de)	3.5±0.9	2.5±0.7*
Media del peso por embrión (X± de)	0.3±0.05	0.2±0.05

de= desviación estándar \*P<0.05 con "t" de Student

### 7.3.2 Anormalidades y malformaciones gruesas.

En la tabla 2.2 se presentan los resultados obtenidos al revisar los embriones al microscopio estereoscópico y evaluar las anormalidades morfológicas que presentaban. En este caso, los embriones con anormalidades se agruparon en: aquellos que presentaban alguna malformación macroscópica y los que presentaban alguna otra anormalidad, como son los hematomas y talla pequeña, que no son consideradas como malformación. El total de embriones con alguna anormalidad abarca a los dos anteriores. Cabe aclarar que un mismo embrión pudo presentar más de una malformación o presentar algún tipo de malformación y a la vez alguna anormalidad.

**Tabla 2.2: Anormalidades producidas en los embriones de ratones hembra tratadas con 10 mg/kg de ciclofosfamida, en el día 10 de preñez y sacrificadas el día 13.**

	Testigos	Tratados
Número de camadas analizadas	12	12
Número de embriones examinados	123	140
Número de embriones malformados	3(2.4)	42(30)*
Embriones con anormalidad	3(2.4)	18(12.9)
Total de embriones con alguna anormalidad	6(4.9)	42(30)*
Número de camadas con embriones malformados.	3(25)	9(75)*
Embriones malformados/ Camada (X±de)	0.25±0.452	3.5±4.2**

de= desviación estándar ( ) valor en %

\*P<0.05 con prueba de 'Z' para diferencia de proporciones

\*\*P<0.05 con 't' de Student

Como se puede observar en la tabla 2.2 el porcentaje de embriones que presentaron alguna anomalía en el grupo tratado fue mayor (30%), al presentado por el grupo testigo (4.9%), diferencia estadísticamente significativa. También el porcentaje de embriones malformados por camada en el grupo tratado fue estadísticamente diferente al del grupo testigo.

Las anomalías encontradas, en los embriones, fueron agrupadas en: malformaciones presentes en cabeza (craneofaciales) y malformaciones en extremidades (Tabla 2.2.1). Las diferentes anomalías que no son consideradas como malformaciones, como es el caso de los hematomas y de los embriones que presentaron menor tamaño (talla pequeña) se agruparon en otra categoría llamada "otras anomalías". Cabe aclarar que aquí se consideraron los embriones que presentaban "cola corta" la cual sí es considerada una malformación pero, que no entró en las dos categorías anteriores.

**Tabla 2.2.1: Porcentaje de embriones con determinada malformación, descendientes de ratones hembra tratadas con 10 mg/kg de CF.**

Malformaciones craneofaciales	Testigos número	Tratados número
Anencefalia	0.0	1(0.7)
Dolicocefalia	0.0	14(10.0)*
Micrognatia	0.0	2(1.4)
<b>Malformaciones en extremidades</b>		
Afalangia	1(0.8)	14(10.0)*
Sindactilia	0.0	13(9.3)*
Focomelia	0.0	7(5.0)*
Polidactilia	0.0	4(2.9)
<b>Otras anomalías</b>		
Cola corta	2 (1.61)	22(15.7)*
Hematomas	0.0	2(1.4)
Talla pequeña	3(2.4)	18(12.8)*

( ) valor en %

\*P<0.05 con prueba Z diferencia de proporciones

Como se puede observar en la tabla anterior el grupo de embriones descendientes de las hembras tratadas presentaron 3 tipos de malformaciones craneofaciales y aunque en el grupo testigo no presentó ninguna, solo la dolicocefalia fue estadísticamente diferente comparada con el grupo testigo.

De las malformaciones presentes en las extremidades tanto inferiores como superiores, los embriones tratados presentaron, afalangia (10% de los embriones), sindactilia (9.3%) y focomelia (5%) las que fueron estadísticamente diferentes al grupo testigo.

En la última parte de la tabla 2.2.1 se presentan las anomalías clasificadas como "otras anomalías", tales como cola corta, malformación que se encontró en 22 de los embriones tratados (15.7%) y embriones con menor tamaño (12.8%) ambos valores fueron estadísticamente diferentes al grupo testigo. Por otra parte únicamente 2 embriones del grupo tratado presentaron hematomas.

**7.3.3 Índice mitótico (IM), frecuencia y tipo de aberraciones cromosómicas (AC) de los embriones obtenidos de ratones hembra testigo y tratadas con CF.**

De los embriones obtenidos en cada camada, tanto en las hembras tratadas como en las testigos se tomaron 4 al azar a los cuales se les extrajo el hígado, del que se realizaron 4 preparaciones para evaluar IM y la frecuencia y tipo de AC. Del total de embriones (48 en cada grupo) solo en 36 testigos y en 42 tratados fue posible realizar el análisis citogenético. Los resultados de estas evaluaciones se presentan en la tabla 2.3.

**Tabla 2.3: Promedio del IM y promedio del porcentaje de células con AC, en células del hígado de los embriones, obtenidos del tratamiento transplacentario con CF (10 mg/kg).**

	IM (X±de)	Número de células revisadas para AC	Células con AC		Número total de AC	Tipo de aberración				
			Número total	(X±de)		rct	rsc	frag	púlv.	poliplo
Testigo N=36	2.6±0.70	3646	32	0.8±1.1	35	21	5	7	0	2
Tratado N=42	1.7±0.85*	3775	263	7.3±6.3**	320	203	5	82	1	29

d.e= desviación estándar N=4000 cél. por ratón para IM

abreviaturas: rct: rompimiento cromatídico; rcs: rompimiento cromosómico; frag: fragmentos; púlv: pulverización; poliplo: poliploidía

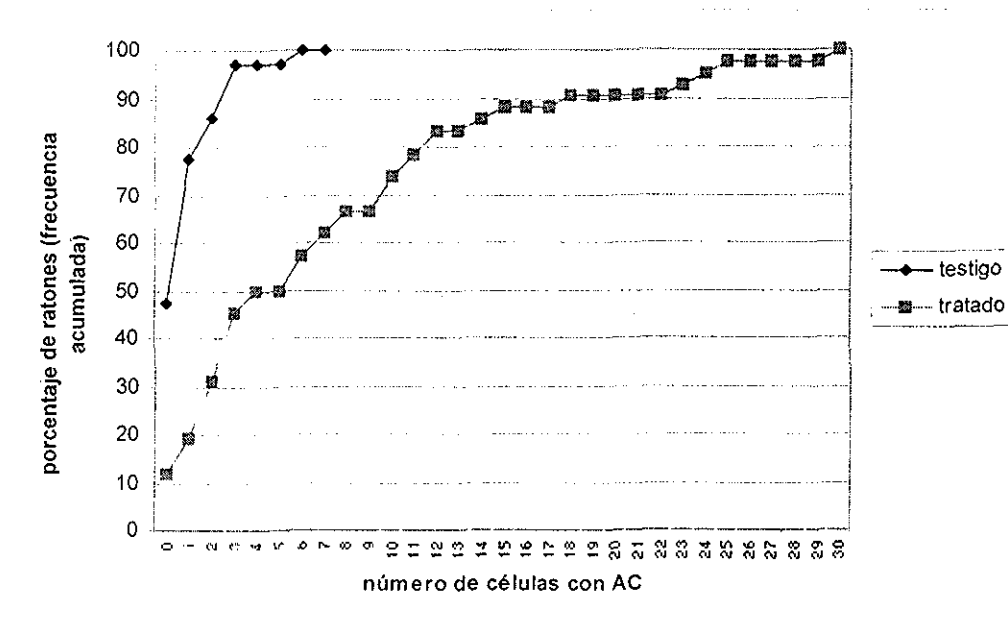
\*P< 0.05 con Z prueba de diferencia de proporciones

\*\* P< 0.05 con "t" Student

**(IM):** Como se puede observar en la tabla 2.3, el IM del grupo de embriones tratados disminuyó al ser comparado con el del grupo testigo. Al realizar el análisis estadístico entre las camadas del grupo tratado, se encontraron diferencias, estadísticamente significativas (datos no mostrados).

**(AC):** En cuanto a los resultados del porcentaje de células que presentaban AC, los 36 embriones testigos presentaron en promedio 0.8% de células con AC (tabla 2.3 y gráfica 1), mientras que las camadas del grupo tratado presentaron una media de 7.3±6.3% de células con AC, lo cual fue estadísticamente diferente.

Al analizar los datos del porcentaje de células con AC por camada dentro del grupo tratado, se encontró que había variaciones muy grandes mientras que unas camadas (60%) tenían AC en el 4% de sus células otras presentaban hasta el 25% de células con AC, y aunque no hubo diferencia estadísticamente significativa entre ellas, es evidente que existen diferencias en la sensibilidad de las camadas.



Gráfica 1: Número de células con aberraciones cromosómicas en los embriones descendientes de hembras testigo y tratadas con CF. Como se puede observar, el 100% de los embriones testigo tienen 6 ó menos células con aberraciones cromosómicas (promedio de 0.82%), mientras que los tratados tienen una mayor cantidad de células con AC.

### 7.3.3.1 Fenotipo y aberraciones cromosómicas (AC) de los embriones obtenidos de ratones hembra testigo y tratadas con CF.

Los mismos embriones a los que se les evaluó el IM y el porcentaje de células con AC, también fueron revisados al estereoscopio. En el grupo testigo los 36 embriones (tabla 2.4), presentaron fenotipo normal, de éstos 19 (52.8%) presentaron células con AC y en los restantes 17 (47.2%) no se encontraron AC. Mientras que en el grupo tratado de 42 embriones, 30 presentaron fenotipo normal y 12 fenotipo anormal. De los individuos con fenotipo normal el 83.3% presentaron AC y el 100% de los embriones anormales presentó células con AC (tabla 2.4)

Tabla 2.4: Fenotipo y porcentaje de células con AC, de los embriones obtenidos de ratones hembras preñadas testigos y tratadas con 10 mg/kg de ciclofosfamida.

	Total de embriones	Embriones con fenotipo normal			Embriones con fenotipo anormal		
		Total	Con AC Número	Sin AC Número	Total	Con AC Número	Sin AC Número
Testigo	36	36 (100)	19 (52.8)	17 (47.2)	0	0	0
Tratado	42	30 (71.5)	25 (83.3)	5 (16.6)	12 (28.5)	12 (100)	0

( ) valor en %

En la tabla 2 5 se presenta el IM y la frecuencia y tipo de AC, de los embriones que sí presentaron células con AC, del grupo testigo y del tratado

**Tabla 2.5: Índice mitótico, frecuencia y tipo de aberraciones cromosómicas, de los embriones que sí presentaron células con AC, obtenidos de ratones hembras preñadas testigos y tratadas con CF.**

Característica del embrión	% IM (X±de)	Número de células examinadas para AC	Células con A C		Número Total de aberraciones	Tipo de aberración				
			Número	% X ± de		rct	rsc	frag	pulv	Polipl
Testigo Fenotipo normal N=19	2 8±0 8	2026	32	1 6±1 1	35	21	5	7	0	2
Tratado Fenotipo normal N=25	1 8±0 8*	2414	178	7 6±5 9**	213	127	2	67	1	16
Tratado fenotipo anormal N=12	1 4±0 6*	887	85	9 9±6 1***	107	76	3	15	0	2

abreviaturas: de= desviación estándar rct: rompimiento cromatídico; rcs: rompimiento cromosómico; frag: fragmentos; pulv: pulverización; polipl: poliploidía

N=4000 cél por ratón para IM

\*P< 0.05 con Z prueba de diferencia de proporciones respecto al grupo testigo

\*\*P< 0 05 con 't' de Student. respecto al grupo testigo

### 7.3.3.2 Fenotipo (tipo de malformación), índice mitótico, frecuencia y tipo aberraciones cromosómicas de los embriones obtenidos de ratones hembra tratadas con CF.

Analizando por separado al grupo de embriones tratados, (tabla 2 5). Se puede observar que existen diferencias entre los embriones que presentan anomalías y los que son fenotípicamente normales, ya que el IM del grupo de los 12 embriones con fenotipo anormal fue menor (diferencia no estadísticamente significativa) al de los embriones con fenotipo normal dentro del mismo grupo de animales tratados. Lo anterior también se reflejó en el número de células revisadas, ya que en algunos casos se encontraron pocas metafases.

El porcentaje de células con aberraciones cromosómicas fue de 9 9% en los embriones tratados con fenotipo anormal y de 7 6 en los de fenotipo normal (diferencia no estadísticamente significativa)

En la tabla 2 6 se agruparon los embriones por malformación (en letras negritas) y se dan los datos del IM y del porcentaje de células con aberraciones cromosómicas. En algunos casos un mismo embrión presentó más de un tipo de malformación, por lo tanto puede estar dentro de más de una clasificación. Como se puede observar no existe tipo específico de malformación, ni tampoco en un área definida del cuerpo. Mientras que el índice mitótico y el porcentaje de células con aberraciones cromosómicas fueron muy variables.

Independientemente de la malformación, los tipos de aberración más frecuentes fueron los rompimientos cromatídicos y los fragmentos.

Tabla 2.6. Anormalidad, IM, tipo y porcentaje de células con AC en los embriones de hembras tratadas con 10 mg/kg de ciclofosfamida.

Embrión.	Camada	I.M	Número de células examinadas	Células con A.C		Número total de aberraciones	Tipo de aberración			
				No.	%		rct	rsc	frag	polipl
<b>Anencefalia</b>	A12	1.5	48	9	18.8	10	0	0	0	0
<b>Dolicocefalia y pequeño</b>	A4	0.6	16	1	6.3	1	0	0	0	1
<b>Dolicocefalia y focomelia</b>	A4	0.5	45	1	2.2	1	0	0	0	1
<b>Dolicocefalia y cola corta</b>	A4	1.6	103	6	5.8	3	0	3	0	0
<b>Micrognatia</b>	A12	1.3	46	5	10.9	11	0	0	0	0
<b>Micrognatia y hematoma</b>	A12	1.1	42	6	14.3	8	0	0	0	0
<b>Afalangia</b>	A6	1.9	109	2	1.8	2	0	0	0	2
<b>Afalangia y cola corta</b>	A6	2.1	108	6	5.5	6	0	0	3	3
<b>Afalangia, sindactilia y cola corta.</b>	A6	1.1	112	10	8.9	10	2	0	2	6
<b>Sindactilia, afalangia y cola corta</b>	A6	1.1	112	10	8.9	10	2	0	2	6
<b>Sindactilia y pequeño</b>	A9	1.4	109	11	10.1	12	10	2	0	0
<b>Focomelia y dolicocefalia</b>	A4	0.5	45	1	2.2	1	0	0	0	1
<b>Dolicocefalia y Cola Corta</b>	A4	1.6	103	6	5.8	6	3	0	3	0
<b>Afalangia y Cola Corta</b>	A6	2.1	108	6	5.5	6	0	0	3	3
<b>Afalangia, Sindactilia y Cola Corta</b>	A6	1.1	112	10	8.9	10	2	0	2	6
<b>Cola Corta</b>	A11	2.3	105	22	20.9	30	22	1	7	0
<b>Micrognatia y Hematoma</b>	A12	1.1	42	6	14.3	8	8	0	0	0
<b>Hematoma</b>	A12	1.6	44	6	13.6	10	10	0	0	0
<b>Dolicocefalia y Pequeño</b>	A4	0.6	16	1	6.3	1	0	0	0	1
<b>Sindactilia y Pequeño</b>	A9	1.4	109	11	10.1	12	10	2	0	0

abreviaturas: rct: rompimiento cromatídico; rcs: rompimiento cromosómico; frag: fragmentos; poliplo: poliploidia.

Cabe mencionar que al parecer existen diferencias de sensibilidad entre camadas ya que, al revisar los datos por tipo de malformación en cada embrión, se puede observar que algunos de los embriones con malformaciones, provienen de las mismas camadas, por ejemplo los 3 embriones de la camada A4 presentaron dolicocefalia y los 3 embriones con afalangia son de la camada A6.

#### 7.3.4. Índice mitótico, frecuencia y tipo de aberraciones cromosómicas de las células de la médula ósea de las hembras preñadas testigo y tratadas con CF.

En las células de la médula ósea de las hembras a las cuales se les extrajeron los embriones, se evaluó el IM y el porcentaje de células con AC. Estos resultados son presentados en la tabla 2.7.

**IM:** El IM que presentaron las hembras preñadas no tratadas (grupo testigo) fue de 2.3%, mientras que en el grupo de hembras preñadas tratadas fue de 1.6%, esta disminución fue estadísticamente significativa

**AC:** En cuanto a las AC, en las hembras preñadas testigos, el porcentaje de células con aberraciones cromosómicas fue de 0.8%, mientras que en el grupo de hembras preñadas tratadas fue de 1.9%, este incremento no fue estadísticamente significativo. Los rompimientos cromatídicos y los fragmentos fueron los más frecuentes.

**Tabla 2.7: Efecto de la aplicación de 10 mg/kg de ciclofosfamida sobre el I.M y la frecuencia de células con AC en la médula ósea de las ratonas preñadas, tratadas en el día 10 de preñez y sacrificadas el día 13.**

Ratón hembra preñada	% I.M (X±de)	Número de células revisadas	Células con A.C.		Número total de aberraciones	Tipo de aberración				
			Núm	Porcentaje (X±de)		rct	rsc	frag	pulv	polipl
Testigo N=10	2.3±0.48	1040	8	0.8±0.8	8	7	0	0	1	0
Tratado N=9	1.6±0.97*	870	16	1.9±1.7	16	3	0	8	0	5

abreviaturas: de= desviación estándar rct: rompimiento cromatídico; rsc: rompimiento cromosómico; frag: fragmentos; pulv: pulverización; polipl: poliploidía

\*P< 0.05 con Z prueba de diferencia de proporciones. respecto al grupo testigo

Cabe mencionar que el porcentaje de células con AC producidas en las células de las ratonas tratadas fue menor al porcentaje inducido en sus embriones, que fue de 7.3

## 7.4 DISCUSIÓN DEL PROTOCOLO 2. Efecto transplacentario

### 7.4.1. Efecto embriotóxico:

La administración de 10 mg/kg de CF a ratones hembra en el día 10 de preñez no modificó la media de implantes por camada, ni la de reabsorciones, pero sí disminuyó de manera significativa la media del peso embrionario por camada.

El hecho de que la media de implantes por camada no se haya modificado, se debió a que cuando se aplicó el compuesto, el proceso de implantación ya se había dado, esto ocurre entre los días 4 y 5 de preñez (Hogan y col., 1986). En cuanto a las reabsorciones, existen reportes que indican que la aplicación de CF a bajas concentraciones no afecta este parámetro (Francis y col., 1990), aunque se sabe que la CF y algunos de sus derivados producen severas malformaciones y reducción en el peso fetal en ratas y ratón (Gibson y Becker, 1971)

Se ha descrito que el peso fetal es un parámetro muy sensible que indica fototoxicidad *in vivo* (Cohen, 1990). Porter y Singh en 1988, encontraron que al tratar con dosis bajas de CF (5, 10 y 15 mg/kg) a ratonas preñadas había una relación entre el peso y la viabilidad fetal

### 7.4.2 Anormalidades y malformaciones gruesas.

En este trabajo se encontró que la aplicación de la CF incrementó el porcentaje de embriones malformados por camada (del 2.4% en los testigos a 30% en los tratados). Los efectos teratogénicos de la CF han sido ampliamente estudiados en ratón y entre los principales efectos se encuentran: defectos en los dedos y paladar hendido cuando la CF se administra entre los días 10 al 12 de gestación (Chernoff y col., 1989; Francis y col., 1990; Gibson y Becker 1971; Mirkes, 1985; Porter y Singh, 1988; Torchinsky y col., 1995).

Al examinar los embriones, la malformación craneofacial que se encontró en mayor porcentaje fue la dolicocefalia, (cabeza en forma ovoide), esto coincide con lo que se reporta de que la aplicación de un agente teratogénico en el día 10 de gestación, puede producir aproximadamente 35% de malformaciones en cabeza (Beaudoin, 1980). Respecto a las malformaciones en extremidades, la frecuencia de embriones que presentaron afalangia, sindactilia y focomelia, son más altas que las reportadas por autores como Porter y Singh en 1988 y por Torchinsky y colaboradores en 1995. Esto puede deberse, a la diferencia en la sensibilidad entre cepas de la misma especie, ya que, en los otros trabajos utilizan ratones de las cepas ICR y Swiss Webster.

En 1988 Porter y Singh reportaron que la aplicación de 10 mg/kg de CF a ratones hembras en el día 12 de gestación y sacrificadas al día 18, dio como resultado 73% de fetos normales, 18% con oligodactilia, 6% con sindactilia y 3% con braquidactilia. En la dosis de 15 mg/kg los efectos que observaron fueron más



drásticos ya que también se incrementó la frecuencia de ojos abiertos y paladar hendido. Con base a lo anterior, ellos proponen que la CF tiene una dosis umbral entre 10 y 15 mg/kg

Dado que se sabe que durante la organogénesis la apoptosis es un proceso normal que contribuye a la formación de las extremidades superiores e inferiores y que la Ciclofosfamida tiene la capacidad de interferir con la apoptosis celular (Mirkes y col., 2000; Umpierre y col., 2001), la sindactilia observada en este trabajo, puede deberse a una alteración ó a un retraso en este proceso. Para investigar este hecho se deben de realizar evaluaciones al termino de la gestación (día 20)

#### **7.4.3 Índice mitótico, frecuencia y tipo de aberraciones cromosómicas de los embriones obtenidos de ratones hembra testigo y tratadas con CF.**

El índice mitótico de los embriones, obtenidos de las hembras tratadas con CF, fue estadísticamente menor, comparado con el grupo testigo, también se encontraron diferencias, estadísticamente significativas, entre las camadas del grupo tratado (datos no mostrados), en donde había datos muy bajos del IM.

Los valores del IM encontrados en el presente trabajo son bajos comparados con los descritos por El-Nahas y colaboradores en 1997, quienes reportan un 4.3 de IM en las células del hígado de fetos de ratón (albino) de 17 días de gestación, sin tratamiento y de 2.6 en fetos tratados transplacentariamente con 15 mg/kg de CF. Por otro lado Porter y Singh (1988) trabajando con fetos de ratón Swiss Webster, de 12 días de gestación, encuentran un IM de 3.7 en los animales sin tratamiento, mientras que en los tratados transplacentariamente con 5, 10, 15 y 20 mg/kg de CF sus IM fueron de 2.7, 2.1, 2.1 y de 1.6 respectivamente

Aunque los valores del índice mitótico, reportados en el presente trabajo, son menores a los encontrados en los antecedentes, el comportamiento concuerda con los trabajos anteriores. Como ya se menciono anteriormente la ciclofosfamida es una sustancia citostática y citotóxica, que tiene la capacidad de interferir con la síntesis del ADN (Kola y col., 1986), por lo cual es capaz de afectar la proliferación celular, produciendo disminución en el IM. También se observaron diferencias en la susceptibilidad entre los embriones del grupo tratado, ya que algunos de ellos presentaron un índice mitótico muy bajo.

A pesar de que existen reportes que mencionan, la gran dificultad para obtener células en metafase para cuantificar aberraciones cromosómicas en los fetos (Titenko-Holland y col., 1998), nosotros logramos obtener buenos resultados. El porcentaje de células del hígado de los embriones que presentaron algún tipo de AC, en el grupo testigo fue de 0.82%, mientras que las camadas del grupo tratado presentaron 7.32%. Los rompimientos cromatídicos y los fragmentos fueron los principales tipos de aberración encontrados en ambos grupos

La evaluación de la frecuencia de AC en fetos de ratón se ha realizado macerando el embrión completo, lo que ha impedido la revisión de la morfología externa. En 1986 Braun y colaboradores determinaron la frecuencia de AC en macerados de embriones de ratón de 11 días, tratados transplacentariamente con 10 mg/kg de CF y encontraron que el porcentaje de células con aberraciones era variable (Cero, 1.29 y 1.0%) y dependía del tiempo que había transcurrido después del tratamiento. Los tipos de aberraciones que encontraron fueron; rompimientos cromatídicos y los gaps. En el caso de sus grupos testigos también encontraron valores muy variables que van desde Cero, hasta 2.36 por ciento de células con AC. Por otro lado en un trabajo en donde se empleó a la ciclofosfamida como testigo positivo, se encontró con una dosis de 15 mg/kg de CF aplicada transplacentariamente, que un 30% de células de hígado fetal presentaban aberraciones cromosómicas, de las cuales la mayoría de estas eran rompimientos cromatídicos (El-Nahas y col., 1997).

A pesar de que en trabajos anteriores se observa que existe mucha variabilidad en el porcentaje de células fetales con AC, en general los valores de este parámetro se incrementan cuando se aplica CF. En nuestros resultados observamos un incremento importante en el porcentaje de células con AC (de 0.82 a 7.32%).

En algunos trabajos donde el análisis citogenético transplacentario se realizó con otros parámetros como: los intercambios de cromátidas hermanas en embriones de ratón preimplantados (Allen y col., 1981; Porter y Singh, 1988; Vogel y col., 1985; Vogel y Spielmann, 1986;) y en fetos (Kram y col., 1979) y el porcentaje de células con micronúcleos en hígado fetal (Cole y col., 1981), se observó que los grupos tratados con ciclofosfamida presentaban un aumento en dichos parámetros.

El incremento en el porcentaje de células fetales que presentan micronúcleos e intercambios de cromátidas hermanas después de la aplicación transplacentaria de la CF (Abraham 1995; Xing y col., 1992), junto con nuestros datos del incremento de células con aberraciones cromosómicas, confirman la genotóxicidad transplacentaria de la CF. Las consecuencias de estos efectos en los embriones han sido poco estudiados, aunque algunos autores postulan que estos pueden iniciar malformaciones embrionarias, defectos en el nacimiento o inducir cáncer postnatal (Adler, 1983; Xing y col., 1992).

Por otra parte, un hallazgo interesante fue que, dentro del grupo de fetos testigo que presentaron células con aberraciones cromosómicas, el 36% de ellos tenían un porcentaje menor o igual a 1% de células con AC, mientras que en el grupo tratado se observó que más del 90 % tenían entre el 4 y el 18% de células con AC.

Dentro del grupo de embriones tratados, se encontró que había variaciones muy grandes, por ejemplo 13 embriones (aprox. 30%) presentaron más del 10% de células con AC, e incluso uno presentó el 25% de células con AC, esto refleja

diferencias en la susceptibilidad individual de los embriones dentro de un mismo grupo

#### **7.4.3.1 Fenotipo (tipo de malformación), índice mitótico, frecuencia y tipo de aberraciones cromosómicas de los embriones obtenidos de ratones hembra testigo y tratadas con CF.**

Como ya se mostró en los resultados el 100% de los embriones del grupo testigo presentaron un fenotipo normal y de estos el 52.8 % presentaron células con AC. A este respecto no existen antecedentes en los que después de un tratamiento transplacentario en el mismo organismo se hayan evaluado ambos parámetros. Y en cuanto al porcentaje de embriones de una camada que presenten células con AC, tampoco hay datos. Algunos autores mencionan en sus trabajos, que de 8 embriones revisado y de un total de 400 células, el 25% de las células presentaron AC (Braun y col. 1986), pero no mencionan cuantos fetos de cuantos presentaron AC. Aunque también cabe mencionar aquí que la mayoría de los embriones que presentaron AC, solo tenían una sola célula con AC, lo que concuerda con lo reportado como normal, cerca del 1% de células con AC. Además se observa una clara diferencia con respecto al grupo tratado donde el 83.3% de los individuos con fenotipo normal presentaron AC y el 100% de los anormales tenían células con AC. Todo lo anterior permite observar que existe una clara diferencia entre el grupo testigo y el tratado en cuanto al daño generado.

Respecto a los tipos de malformación como ya se observó se presentaron varios tipos y en diferentes zonas del cuerpo y no se encontró una relación directa entre el tipo de malformación y la presencia de células con AC, ni con el tipo de aberración cromosómica.

#### **7.4.3.2 Fenotipo (tipo de malformación), índice mitótico, frecuencia y tipo de aberraciones cromosómicas de los embriones obtenidos de ratones hembra tratadas con CF.**

Al analizar los datos del grupo de embriones descendientes de las hembras tratadas con CF, se observaron diferencias entre los que presentaron anomalías morfológicas externas y los de fenotipo normal, los datos de IM fueron menores en los embriones malformados (diferencia no significativa), lo que muestra que se presentó una reducción más drástica en el número de células en división, y aunque no se encontró una relación directa entre el tipo de malformación que presentaron los embriones y la frecuencia o tipo de aberración que presentaban las células de sus hígados, el incremento fue mayor en los embriones malformados.

La ciclofosfamida produjo daño genotóxico y teratogénico en el mismo individuo, incrementando ambos parámetros, pero no se encontró una relación directa entre el tipo de malformación y el porcentaje o tipo de aberración cromosómica, los tipos de aberraciones más frecuentes fueron los rompimientos cromatídicos y los fragmentos, que son los más reportados para este compuesto,

cuando se evalúa en otros órganos como la médula ósea. Dado que se encontraron embriones que tenían aberraciones cromosómicas y que no presentaban malformaciones, podemos decir que son dos eventos independientes que se producen en un mismo organismo y por lo tanto ese organismo es sensible a los dos efectos. Aunque no podemos descartar por completo que el efecto genotóxico (tal vez distinto al evaluado aquí), contribuya u origine eventos que al final se manifiesten como una malformación.

Trabajos previos han tratado de correlacionar la inducción de malformaciones y el daño cromosómico en fetos expuestos transplacentariamente a compuestos químicos (Ingalls y col., 1963; Porter y Sing, 1988; Sieber y col., 1974; Soukup y col., 1965), sin embargo nunca se había realizado ambas determinaciones (teratogénicos y genotóxicos) en el mismo individuo. En reportes anteriores las evaluaciones se realizaron en individuos diferentes.

En 1988 Porter y Sing encontraron una correlación estadísticamente positiva de  $r=0.86$  con  $P<0.01$  entre los defectos en los dedos y el parámetro de ICH's, en dos grupos de fetos de ratón expuestos transplacentariamente a CF, entre el día 12 y 18 de gestación, por lo cual sugirieron que los efectos mutagénicos de la CF puede ser un factor indirecto que contribuya al efecto teratogénico de la CF.

Entre los antecedentes con otros compuestos podemos mencionar un trabajo publicado en 1996 por Nomura y col., en donde se administró uretano a ratones para posteriormente evaluar el porcentaje de aberraciones cromosómicas en embriones de 9 días. Los resultados mostraron que el porcentaje de células fetales que presentaron AC se incrementó significativamente, al igual que la frecuencia de fetos con malformaciones.

Autores que han utilizado otros modelos biológicos, como los embriones de pollo, para tratar de encontrar alguna relación entre los parámetros de genotoxicidad y teratogenicidad, concluyeron que la producción de aberraciones cromosómicas, los efectos en la proliferación y la muerte celular en varios tejidos, producida por la aplicación de la CF, afectan la morfogénesis del producto en desarrollo (Novotná y Jelínek 1986; 1990).

Los datos mostrados en la literatura hacen pensar que tal vez la CF tiene un efecto tóxico indirecto que afecta el crecimiento y desarrollo fetal, ya que existen reportes en los que se menciona que puede alterar el Ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones, dañando la división celular y la formación de tejidos, además de interferir con el mecanismo involucrado en la formación y elongación de los dedos de las extremidades (Moore, 1982; Porter y Singh, 1988).

Tampoco podemos descartar la hipótesis de que la CF o sus metabolitos produzcan su efecto teratogénico vía la alquilación del ADN del embrión, ya que se sabe que se enlazan firmemente al ADN, ARN y a las proteínas del feto (Murthy y col., 1973; Short y Gibson 1974). Por otro lado, también hay que considerar la

hipótesis de que el feto posee una habilidad pobre, comparada con el adulto, para reparar macromoléculas dañadas por agentes alquilantes (Porter y Singh, 1988; Short y Gibson 1974), la cual está apoyada en las evidencias indirectas, de que la habilidad de reparar daño, es esencial en la formación de ICH's, y como se ha encontrado, una correlación entre los ICH's y la frecuencia de efectos teratogénicos (Porter y Singh, 1988), cabe la posibilidad de que esta baja capacidad de reparación esté contribuyendo al efecto teratogénico de la CF.

Existe controversia respecto a la capacidad que tiene un feto, para reparar el daño originado por compuestos químicos, por ejemplo, Counis y col en 1979 reportó que en células de embriones de pollo el sistema de reparación del ADN no funciona durante la diferenciación celular. Mientras que otros autores postulan que sí existe, aunque es mínima (Bochert y col., 1978; Eibs y Spielmann, 1977; Liu y Wells 1995; Lu y col., 1993; Spielmann y Vogel, 1987). En recientes publicaciones han demostrado la expresión de algunos genes que intervienen en la reparación por escisión de nucleótidos en embriones de rata de 10 días de gestación y también reportaron que no se afectaba la transcripción de algunos de ellos cuando un cultivo de embriones era expuesto a 4-hidroperoxiciclofosfamida (Vinson y Hales, 2001).

La alta frecuencia de AC en el hígado del embrión está reflejando de cierta forma la susceptibilidad del material cromosómico, del producto en gestación al daño producido por la CF ya sea por vía directa o indirecta. Aunque no se cuantificó el daño en cada miembro u órgano del embrión es posible pensar que también son susceptibles a la acción de este compuesto y que de una manera u otra el efecto mutagénico de la CF puede contribuir a su efecto teratogénico.

#### **7.4.4 Índice mitótico, frecuencia y tipo de aberraciones cromosómicas de las células de la médula ósea de las hembras preñadas testigo y tratadas con CF.**

Como ya se mencionó en la discusión del protocolo 1, existen pocos reportes del daño citogenético ocasionado a las células de hembras preñadas y solo se ha observado una respuesta diferencial en cuanto a la toxicidad (Beliles 1972; Nordberg y col., 1986). Aunque las diferencias en toxicidad no están bien documentadas, estas pueden tener una base hormonal o estar relacionadas con la alteración en la compartimentalización de los xenobióticos (Burrell y col., 1992; Mathews y Devi, 1994) y cambios en la función de los citocromos P-450 que son los encargados del metabolismo de la CF.

El porcentaje de células con aberraciones cromosómicas reportada en este protocolo, es menor que el que se obtuvo en el primer protocolo, esta diferencia puede deberse, a que los tiempos de evaluación, no son iguales, ya que en el primer protocolo, ésta se realizó 24 horas después de la aplicación del compuesto y en el segundo protocolo se realizó a las 72 horas, el compuesto se aplicó en el día 10 de preñez y se evaluaron 3 días después, cuando se sacrificó a la hembra para la obtención de los embriones.

Como se señaló anteriormente son muy pocos los reportes donde estudian hembras preñadas y no preñadas registrando AC, aunque existen reportes donde se señala que el tiempo de la toma de la muestra que transcurre después de la aplicación del compuesto químico es un factor importante en la frecuencia de AC, ya que generalmente existe un tiempo en cual se puede determinar un incremento (Xing y col., 1992) El tiempo entre la exposición y la toma de la muestra puede también ser importante, para determinar la diferencia en la sensibilidad, de los diferentes tejidos (Braun y col., 1986; Röhrborn y Buckel, 1976; Srám y col., 1981).

Con respecto a la diferencia encontrada entre las AC producidas en las células del hígado del embrión y la médula ósea materna, existen publicaciones en las que dan tratamiento transplacentario con algún compuesto químico y evalúan la genotóxicidad en los fetos y en sus madres. En la mayoría de los casos se reporta una diferencia en la sensibilidad entre ellos, algunas veces los fetos son mas sensibles y en otros las madres, pero también existen trabajos que reportan igual sensibilidad. El tratamiento con benceno, produjo un incremento del porcentaje de ICH's, similar en células de ratón maternas y fetales, pero la frecuencia de micronúcleos en hígado fetal fue más elevada, en fetos de 14 y 15 días de gestación (Ning y col., 1991). Mientras que con vinblastina la inducción de micronúcleos fue mayor en células de médula ósea materna, que en las fetales (Xing y col., 1992).

En ratones expuestos por 48 h a gas uretano, por inhalación, el porcentaje de células con AC fue más elevado en los homogenizados de los embriones que en la médula ósea de las hembras, las aberraciones tipo cromatídicas fueron las que se encontraron con mayor frecuencia (Nomura y col., 1996).

Cidial, un insecticida que fue administrado a ratones hembras preñadas en el día 16 de gestación, produjo mayor efecto en la proliferación celular de los fetos, que en las células maternas, mientras que las diferencias en el porcentaje de células con aberraciones cromosómicas maternas y fetales no fueron estadísticamente significativas (El-Nahas y col., 1997).

En trabajos anteriores donde evalúan la genotóxicidad transplacentaria de la CF (micronúcleos o ICH's), se reporta que produce efectos más severos en las células fetales que en las de la médula ósea de ratones adultos (Abraham, 1995; Chorvatovicová y Ujházy, 1995; Cole y col., 1983; Curry y col., 1990; Harper y col., 1989; Henderson y col., 1984), mientras que Xing y col., en 1992 reportan un mayor porcentaje de micronúcleos en el hígado fetal en comparación con la médula ósea de ratones CD-1 tratados con una dosis de 20 mg/kg de CF, aunque cuando evaluaron la frecuencia de ICH's no encontraron diferencias.

En un trabajo publicado por El-Nahas y col., en 1997, donde utilizaron 15 mg/kg de CF como testigo positivo, encontraron que el 30.2% de las células de hígado fetal y el 23.3% de las de médula ósea materna, tenían algún tipo de AC, predominando los rompimientos cromatídicos.

Con base a todos los antecedentes y a nuestros resultados, podemos decir que los embriones de ratón son más susceptibles al efecto genotóxico y mutagénico de la ciclofosfamida (evaluado como micronúcleos, intercambios o aberraciones cromosómicas) que las hembras tratadas de las cuales descienden.

Lo anterior indica que la respuesta o la sensibilidad de la médula ósea materna y las células fetales es diferente, esto puede deberse a factores tales como las interacciones del metabolismo materno y fetal, función de la placenta, etapa del desarrollo fetal así como el tipo de células fetales (Chorvatovicova y Ujházy, 1995; Müller, 1988), transporte y estabilidad de las formas reactivas de cada sustancia, formación y persistencia de los metabolitos en la proximidad de las células que se van a analizar y la cinética de la proliferación celular (Abraham, 1995; Cole y col., 1979; 1981; 1982; Henderson, 1986)

Los metabolitos activos de las sustancias químicas pueden ser formados en el tejido materno y ser transferidos transplacentariamente o pueden ser tomados *in útero* por el embrión o por el feto (Autrup, 1993). En el caso de la CF se sabe que es un compuesto cuya toxicidad depende de su activación metabólica *in vivo* y que esto ocurre vía oxidativa por el sistema de citocromos P-450, por lo que las diferencias en la actividad enzimática entre tejidos pueden ser importantes en la manifestación de la susceptibilidad al daño producido por ella (Odagiri y col., 1994; Takehara y col., 1990).

Chorvatovicova y Ujházy en 1995 propusieron que la CF puede ser transformada a sus formas biológicamente activas en el hígado materno o en el hígado fetal y que a eso se debía la gran sensibilidad que presentaban las células fetales a diferencia de las de la médula ósea materna, que tienen menos contacto con los metabolitos activos

Aunque existe controversia acerca de la capacidad de los embriones o fetos para metabolizar sustancias exógenas, algunos autores proponen que esta inicia en etapas tempranas del desarrollo, como en la embriogénesis y que se incrementa conforme transcurre el tiempo de gestación (Müller, 1988; Odagiri y col., 1994) de ahí la importancia de la etapa en la cual se encuentra el feto cuando se aplica el tratamiento.

Por otra parte también cabe la posibilidad de que el incremento de aberraciones en los fetos, se deba a la acumulación de la CF o de sus metabolitos, debido a la inmadurez del sistema de desintoxicación del mismo, ya que la conjugación del glutatión y la actividad de la enzima UDP-glucuronosiltransferasa, en el feto es de solamente del 10% en comparación con la del adulto. Además el sistema de citocromos P-450 muestra una actividad casi insignificante en el feto hasta el nacimiento (Ruckpaul y Rein, 1990) aunque en algunos casos se reporta que en embriones de roedores la actividad inicia hasta final del periodo de la organogénesis o sea alrededor del día 15 (Wells y Winn,

1996), y esta actividad se incrementa linealmente hasta los 20 días de nacido en el ratón y alcanza el nivel del adulto, hasta cuando el ratón tiene 40 días de edad

Considerando que la habilidad de los fetos para metabolizar compuestos extraños es generalmente menor que el de los adultos y que el sistema de reparación es fisiológicamente inmaduro, esto puede generar gran absorción, retención o incremento de la sensibilidad de los órganos fetales (Petkova-Bocharova y col , 1998).

Otro proceso importante a considerar es el metabolismo intracelular, incluyendo los procesos de eliminación de metabolitos y de los radicales libres, ya que pueden existir diferencias en los mecanismos de protección enzimática, en las células de distintos órganos, variando la susceptibilidad a la CF (Chorvatovicova y Ujhazy, 1995; Odagiri y col. 1994)



## 7.5 RESULTADOS DEL PROTOCOLO 3. Efecto crónico de la CF en ratón macho y en sus descendientes.

A seis grupos de 10 ratones machos se les aplicaron diferentes dosis de CF (2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 15.0 ó 20.0 mg/kg), cada tercer día, durante 2 meses. Después de terminado el tratamiento se dejaron transcurrir 72 horas y se colocaron para que se cruzaran (uno de estos machos con dos hembras sin tratamiento). Lo anterior se realizó con la finalidad de obtener la dosis más baja en la cual los embriones descendientes presentaran malformaciones pero sin llegar a un porcentaje elevado de muertes

### 7.5.1 Selección de la dosis.

#### 7.5.1.1 Efecto tóxico, reprotóxico y embriotóxico:

En la tabla 3.1 se presentan los resultados obtenidos al evaluar la mortalidad, fertilidad, número total de implantes, reabsorciones y peso embrionario por camada. Los resultados muestran que en los tratamientos con las dosis más altas (15 y 20 mg/kg) se observó mayor porcentaje de muertes, así como una disminución del número de implantes y un incremento del número de reabsorciones, mientras que el peso de los embriones por camada disminuyó de manera significativa en las dosis de 5.0, 7.5 y 10.0 mg/kg.

**Tabla 3.1: Efecto de la aplicación de ciclofosfamida durante 60 días a ratones macho y en sus descendientes.**

Dosis (mg/kg)	N	Mortalidad %	Índice de Fertilidad	Implantes/camada (X±de)	Reabsorciones/camada (X±de)	Peso(g)/Camada (X±de)	Índice de letales dominantes.
0.0	10	0.0	0.9	12.7±3.2	0.7±1.2	3.4±1.0	0.06
2.5	10	0.0	0.8	12.2±2.7	4.0±6.5	2.7±0.7	0.34***
5.0	10	0.0	0.7	9.0±4.4 **	1.1±0.9	1.9±1.1**	0.12
7.5	10	0.0	0.7	10.6±3.2	0.8±0.8	1.97±1.0**	0.07
10.0	10	0.0	0.6*	11.2±1.9	1.2±1.6	1.9±0.5**	0.11
15.0	11	27.3*	0.8	8.9±2.8 **	5.7±2.8**	-----	0.64***
20.0	18	77.8*	0.8	8.3±5.2	4.8±2.4**	--	0.58***

de= desviación estándar.

----- No se obtuvieron los datos

\*P<0.05 con Z de proporciones comparado con el testigo (dosis 0 mg/Kg)

\*\*P<0.05 con t de Student comparado con el testigo

\*\*\*P<0.05 X<sup>2</sup> vs testigo

Con los datos del número de implantes totales por camada y el de las reabsorciones se calculó el porcentaje de dominantes letales de acuerdo a la fórmula utilizada por Morelan y col., en 1981. Como se observa en la tabla 3.1 el índice de dominantes letales se incrementó significativamente en los tratamientos con 2.5, 15 y 20 mg/kg de CF. Es importante señalar que, en las dosis de 15.0 y 20.0 mg/kg el 50% de las hembras preñadas tenían todos los implantes muertos, es decir se encontraron solo reabsorciones

### 7.5.1.2 Anormalidades y malformaciones macroscópicas.

La tabla 3.2 muestra los resultados obtenidos de las camadas de los machos tratados, se puede observar que el porcentaje de embriones malformados se incrementó en las dosis de 2.5 y 15 mg/kg respecto al testigo.

El total de embriones con alguna anomalía, abarca a aquellos que presentaban cualquier malformación macroscópica y a los que presentaban alguna otra anomalía, como son los hematomas, que no son considerados como una malformación. Cabe aclarar que un mismo embrión pudo presentar más de una malformación y a la vez alguna anomalía. En este caso una disminución en la talla de los embriones (pequeños), sí es considerada como una malformación.

**Tabla 3.2: Número de anomalías producidas en los embriones descendientes de ratones macho tratados con ciclofosfamida durante 60 días y cruzados con hembras sin tratamiento.**

	Testigo 0 mg/kg	Tratado 2.5 mg/kg	Tratado 5.0 mg/kg	Tratado 7.5 mg/kg	Tratado 10mg/kg	Tratado 15mg/kg	Tratado 20mg/kg
Camadas analizadas	17	10	10	12	8	5	3
Embriones Examinados	193	106	87	115	75	36	21
Embriones malformados	5 (2.6)	32 (30)*	4 (4.6)	7 (6.1)	6 (8.0)	9(25)*	0
Embriones con otras anomalías	2	0	0	2	1	0	4
Total de embriones con anomalía	7 (3.6)	32 (30)*	4 (4.6)	9 (7.83)	7 (9.3)	9(25) *	4(19) *
Camadas con embriones malformados	4 (23.5)	7 (70)*	3 (30)	5(41.7)	2 (25)	1(20)	0
Embriones malformados por camada (X±de)	0.3±0.6	3.2±3.7*	0.4±0.7	0.58±0.9	0.75±1.5	1.6±3.6	0

de= desviación estándar ( ) valor en %

\* P<0.05 con Z de proporciones comparado con el testigo (dosis 0 mg/Kg)

Como se puede observar en la tabla 3.3 se encontraron varios tipos de malformaciones, entre ellas la micrognatia y la sindactilia las cuales fueron más frecuentes en los embriones del grupo tratado con 2.5 mg/kg, mientras que en las dosis de 7.5 y 10.0 mg/kg la frecuencia de sindactilia fue significativamente mayor. En la dosis de 15 mg/kg se presentaron tres anomalías, micrognatia, sindactilia y embriones con talla menor al del grupo testigo.

**Tabla 3.3. Número y porcentaje de anomalías producidas en los embriones descendientes de ratones macho tratados durante 60 días con ciclofosfamida.**

	Testigo 0 mg/kg	Tratado 2.5 mg/kg	Tratado 5.0 mg/kg	Tratado 7.5 mg/kg	Tratado 10 mg/kg	Tratado 15 mg/kg	Tratado 20 mg/kg
Exencefalia	1(0.5)	0	0.0	1(0.87)	0.0	0.0	0.0
Micrognatia	1(0.5)	27(25.5)*	0.0	0.0	0.0	2(5.6)*	0.0
Cefalocele	0.0	0.0	2 (2.2)	1(0.87)	1(1.3)	0.0	0.0
Afalangia	2(1.0)	1(0.94)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Sindactilia	0.0	21(19.8)*	0.0	4(3.48) *	6(8.0)*	5(13.9)*	0.0
Cola corta	2(1.0)	3(2.8)	2(2.2)	2(1.7)	0.0	2(5.6)	0.0
Pequeños	1(0.5)	0.0	0.0	0.0	1(1.3)	9(25.0)*	--
Hematoma	2(1.0)	0.0	0.0	2(1.7)	1(1.3)	0.0	4(19.0)*

( ) valor en % \* P<0.05 con Z de proporciones comparado con el testigo (dosis 0 mg/Kg)

### 7.5.2 Efecto del tratamiento con diferentes dosis de CF cada tercer día durante 60 días en los espermatozoides de los ratones macho.

Una vez realizadas las cruces, los machos fueron sacrificados y se procedió a revisar los espermatozoides que en ese momento se encontraban en el epidídimo. La tabla 3.4 muestra los datos obtenidos al evaluar la viabilidad, la motilidad y las malformaciones espermáticas. Como se puede observar en casi todos los tratamientos, la viabilidad y la motilidad disminuyeron significativamente (excepto para la viabilidad en la dosis de 10 mg/kg). En cuanto a las malformaciones espermáticas estas se incrementaron en todas las dosis y fueron estadísticamente significativas en las concentraciones de 5.0, 15.0 y 20 mg/kg.

**Tabla 3.4: Efecto del tratamiento con CF durante 60 días (cada tercer día) en los espermatozoides de los ratones macho.**

Dosis (mg/kg)	N	Viabilidad espermática (%) X± de	Motilidad (%) X± de	Malformaciones espermáticas (%)
0.0	5	87.4±3.1	82.0±2.5	1.1±0.5
2.5	5	57.0±9.9*	30.4±4.5*	3.1±0.7
5.0	5	72.0±2.0*	29.4±1.8 *	3.7±0.8 *
7.5	4	69.5±3.7*	35.7±2.9*	5.8±2.6
10.0	5	84.0±2.5	66.6±4.0 *	2.5±0.9
15.0	5	29.8±3.3*	33.8±2.54 *	4.5±0.6*
20.0	2	19.7±0.3*	24.2±2.1*	12.5±0.8*

de= desviación estándar

\* P<0.05 con t de student, respecto a la dosis de 0 mg/kg

Con base a los resultados anteriores se eligió para la siguiente fase del experimento la dosis de 2.5 mg/kg de ciclofosfamida aplicada a ratones macho durante 2 meses cada tercer día.

### 7.5.3 Resultados de la dosis seleccionada.

#### 7.5.3.1 Efecto reprotóxico, embriotóxico y malformaciones macroscópicas:

Los resultados obtenidos del tratamiento crónico a ratones macho, con la dosis seleccionada (2.5 mg/kg), se muestran en la tabla 3.5. Se realizó un experimento (A) y su repetición (B) y se comparan con los resultados obtenidos en el experimento preliminar.

Como se puede observar, el índice de fertilidad, la media de implantes por camada y las reabsorciones presentaron una disminución, comparados con los resultados del experimento preliminar (3.1), para esta misma dosis. La media del peso embrionario por camada y el índice de dominantes letales también presentó ligeras variaciones, pero ninguna de las diferencias mencionadas en este párrafo fue estadísticamente significativa.

**Tabla 3.5: Efecto de la aplicación de 2.5 mg/kg de ciclofosfamida a ratones macho durante 60 días.**

	Índice de fertilidad	Implantes/camada (X±de)	Reabsorciones/camada (X±de)	Índice de letales dominantes	Peso(g)/camada (X±de)
Testigo	0.9	12.7±3.2	0.7±1.2	12/204 (0.06)	3.4±1.0
2.5 (tabla 3.1)	0.8	12.2±2.7	4.0±6.5	53/158 (0.34)	2.7±0.7
A	0.61	11.7±2.2	0.27±0.7	3/129 (0.02)	2.9 ±0.6
B	0.64	10.8 ±3.3	0.54±0.7	4/63 (0.06)	2.47±0.5

de= desviación estándar. ( ) valor en %

Se revisaron un total de 19 camadas del experimento y de su repetición (tabla 3.6: A y B), y un total de 185 embriones, en 180 de ellos no se encontraron malformaciones externas, mientras que 5 tenían alteraciones: uno presentó afalanga y 4 presentaron hematomas.

**Tabla 3.6: Anormalidades producidas en los embriones descendientes de ratones machos tratados con 2.5 mg/kg ciclofosfamida durante 60 días y cruzados con hembras sin tratamiento.**

	Camadas revisadas	Número de embriones examinados	Número de embriones con malformación	Número de embriones con alguna anomalía
Testigo	17	193	5(2.6)	7(3.6)
2.5 (tabla 3.2)	10	106	32(30)	32(30)
A	12	126	1(0.8) afalancia	2 (1.6) hematomas
B	7	59	0	2 (3.4) hematomas

( ) valor en %

### 7.5.3.2 Índice mitótico, frecuencia y tipo de aberraciones cromosómicas de los embriones obtenidos de ratones macho testigos y tratados con CF durante 60 días.

Aunque no se obtuvieron embriones con anomalías, se procedió a obtener las células del hígado y a cuantificar el número y el tipo de AC presentes en los descendientes de ratones macho tratados con 2.5 mg/kg de CF (tabla 3.7).

**Tabla 3.7: Fenotipo y número de células de hígado con aberraciones cromosómicas en los embriones obtenidos de ratones macho testigos y tratados con 2.5 mg/kg de ciclofosfamida.**

	Embriones con fenotipo Normal			Embriones con fenotipo anormal	Embriones con poco material
	Total	Con AC	Sin AC		
Testigo	48	28 (58.3)	20 (41.6)	0	0
Tratado	41	13 (31.7)	28 (68.3)	0	7

( ) valor en %.

El total de embriones analizados en ambos grupos (testigo y tratado) fue de 48, aunque en 7 organismos del grupo tratado no fue posible evaluar el número de células con AC, ya que tenían muy poco material. En la tabla 3.7 se muestra el porcentaje de embriones que presentaron células con AC, cabe mencionar aquí, que en el grupo tratado, los embriones tenían pocas metafases para revisar (65% de los embriones tenían menos de 50), además de que algunas de las metafases revisadas mostraban una apariencia diferente a las analizadas en el grupo testigo, ya que parecían encontrarse en anafase tardía y en otros casos se presentaban metafases muy cerradas, a pesar de tener los mismos tiempos y concentraciones de colchicina e hipotónica que el grupo testigo.

En la tabla 3.8 se muestran los valores del IM y AC de los embriones obtenidos de los machos tratados y testigos. El IM presentó una disminución con el tratamiento, mientras que el porcentaje de células con AC se incrementó, aunque no fue estadísticamente significativo. Los fragmentos y los rompimientos cromatídicos fueron los tipos de AC más frecuentes en ambos grupos.

**Tabla 3.8: Índice mitótico y porcentaje de células de hígado con AC, de los embriones descendientes de ratones macho testigos y tratados con 2.5 mg/kg de ciclofosfamida.**

	IM ( $X \pm de$ )	Número de células revisadas para AC	Células con AC		Núm total de AC	Tipo de aberración cromosómica				
			Número	% ( $X \pm de$ )		rct	rsc	frag	pulv	poliplo
Testigo n=48	2.8 $\pm$ 0.7	4846	45	0.89 $\pm$ 1.1	48	25	6	15	0	2
Tratado n=41	2.3 $\pm$ 1.0*	2347	30	1.41 $\pm$ 3.9	38	7	0	27	0	4

N=4000 cél por ratón para IM

Abreviaturas: de= desviación estándar; rct: rompimiento cromatídico; rcs: rompimiento cromosómico; frag: fragmentos; pulv: pulverización; poliplo: poliploidía

\*P< 0.05 con Z prueba de diferencia de proporciones comparado con el testigo

Tomando en cuenta a los embriones que sí presentaron células con AC en ambos grupos, se calculó el porcentaje de células con AC y el IM (tabla 3.9). No se observó diferencia en el IM, pero el porcentaje de células con AC en el grupo tratado fue mayor (no significativa estadísticamente).

**Tabla 3.9: Índice mitótico, número y porcentaje de células embrionarias con AC; de los embriones que sí tuvieron células con AC descendientes de ratones macho testigos y tratados con 2.5 mg/kg de ciclofosfamida.**

	IM ( $X \pm de$ )	Número células revisadas para AC	Células con AC		Número total de AC	Tipo de aberración cromosómica				
			Número	% ( $X \pm d.e$ )		rct	rsc	frag	pulv	Poliplo
Testigo N=28	2.9 $\pm$ 0.7	2926	45	1.5 $\pm$ 1.0	48	25	6	15	0	2
Tratado n=13	2.8 $\pm$ 1.1	846	30	4.4 $\pm$ 6.1	38	7	0	27	0	4

N=4000 cél por ratón para IM

Abreviaturas: de= desviación estándar; rct: rompimiento cromatídico; rcs: rompimiento cromosómico; frag: fragmentos; pulv: pulverización; poliplo: poliploidía

\*P< 0.05 con Z prueba de diferencia de proporciones comparado con el testigo

En la tabla 3.10 se muestran los datos individuales de los embriones descendientes de los machos tratados que sí presentaron células con AC. Como se puede observar solamente en cuatro embriones se revisaron 100 células y en el 38.4% de estos embriones se revisaron menos de 50 células.

Tabla 3.10: Datos individuales de los embriones descendientes de ratones macho tratados 60 días con 2.5 mg/kg de CF.

Embrión	I M	Número de células examinadas para AC	Células con AC		Número total de AC	Tipo de aberración		
			Numero	%		rct	frag	poliplo
1	2.6	28	1	3.6	1	0	1	0
2	2.8	40	1	2.5	1	0	1	0
3	3.8	46	11	23.9	16	1	15	0
4	2.6	100	2	2	2	1	1	0
5	4.1	75	1	1.3	1	1	0	0
6	4.0	82	3	3.6	3	2	1	0
7	3.0	100	3	3	4	0	3	1
8	4.3	100	1	1	1	0	0	1
9	3.2	100	2	2	2	0	0	2
10	3.2	63	1	1.5	1	0	1	0
11	1.2	48	1	2	2	0	2	0
12	1.9	70	2	2.8	3	1	2	0
13	0.7	12	1	8.3	1	1	0	0
n=13 X±de	2.8±1.1	Σ=846 66.5±29.9	Σ=30 2.3±2.7	4.4±6.1	38	7	27	4

abreviaturas: de= desviación estándar; rct: rompimiento cromatídico; frag: fragmentos; poliplo: poliploidía

Por otra parte en la tabla 3 11 se muestran los datos individuales de los embriones testigo que sí presentaron células con AC

**Tabla 3.11: Datos individuales de los embriones descendientes de ratones macho testigos.**

Embrión	I.M	Número de células examinadas para AC	Células con A C		Número total de AC	Tipo de aberración			
			Numero	%		rct	rsc	frag	poliplo
1	2.2	100	1	1	1	1	0	0	0
2	2.8	100	2	2	2	0	0	2	0
3	3.2	100	1	1	1	0	0	1	0
4	3.6	100	1	1	1	0	0	1	0
5	4.0	100	2	2	2	0	1	1	0
6	3.0	100	1	1	1	1	0	0	0
7	2.5	100	1	1	1	1	0	0	0
8	3.5	100	3	3	3	1	0	2	0
9	4.4	100	1	1	1	0	0	1	0
10	2.0	111	3	2.7	3	2	0	1	0
11	2.2	107	3	2.8	3	2	0	1	0
12	2.5	100	1	1	1	1	0	0	0
13	2.2	108	1	0.9	1	1	0	0	0
14	3.9	106	3	2.8	3	2	0	0	1
15	3.8	103	1	0.9	1	1	0	0	0
16	2.8	108	1	0.9	2	0	0	2	0
17	3.2	107	1	0.9	1	0	0	1	0
18	1.6	102	1	0.9	1	1	0	0	0
19	3.0	104	1	0.9	1	1	0	0	0
20	1.9	112	6	5.4	6	3	3	0	0
21	2.5	108	2	1.8	2	2	0	0	0
22	3.4	108	1	0.9	1	1	0	0	0
23	2.3	104	1	0.9	1	0	0	0	1
24	1.7	108	1	0.9	1	1	0	0	0
25	2.7	108	2	1.8	3	2	1	0	0
26	3.6	107	1	0.9	1	0	0	1	0
27	4.0	107	1	0.9	2	0	1	1	0
28	2.8	108	1	0.9	1	1	0	0	0
N=28 X±d e	2.9±0.8	Σ= 2926 104.5±3.9	45	1.5±1	Σ=48 1.7±1.1	25	6	15	2

abreviaturas: d e: desviación estándar; rct: rompimiento cromatídico; rcs: rompimiento cromosómico; frag; fragmentos; poliplo: poliploidía



## 7.6. DISCUSIÓN DEL PROTOCOLO 3.

### 7.6.1. Selección de la dosis.

#### 7.6.1.1 Efecto tóxico, reprotóxico y embriotóxico.

El efecto tóxico observado al administrar de manera crónica 15 ó 20 mg/kg de ciclofosfamida (tabla 3.1), concuerda con lo reportado en 1981 por Moreland y colaboradores quienes describen que la aplicación de 20 mg/kg a ratas macho por 10 semanas produce toxicidad. El efecto tóxico de la ciclofosfamida es mayor en este tipo de tratamientos, ya que se ha reportado que la administración de una sola dosis alta, produce menos efectos que repetidas aplicaciones de dosis bajas. Se han llegado a aplicar dosis de 75, 100 mg/kg (Jenkinson y col., 1987) ó 210 (Datta y col., 1970; Jenkinson y Anderson 1990) y hasta de 350 mg/kg (Sotomayor y Cumming, 1975) y no producen efectos tóxicos en ratón.

Aunque estadísticamente, el tratamiento con CF no produjo efecto sobre el índice de fertilidad, excepto para dosis de 10 mg/kg, en todas las dosis se observó una ligera disminución de este parámetro. En términos de fertilidad en trabajos previos, no se reportan efectos negativos (Botta y col., 1974; Trasler y col., 1986), esto posiblemente se debe a que en el ratón basta con una pequeña proporción de espermatozoides en buenas condiciones para que se pueda llevar a cabo la fertilización de manera óptima (Francis y col., 1990).

La disminución del número de implantes por camada observada en las dosis de 5, 15 y 20 mg/kg (tabla 3.1) y el aumento del número de reabsorciones en las dosis más altas, son el resultado de algún tipo de daño producido en las células germinales de los machos por el tratamiento con CF. Se sabe que este compuesto produce mutaciones en el ADN de las células germinales (Watanabe y Kamiguchi, 2001) y tales cambios pueden ser letales y afectar el desarrollo de las crías (Brinkworth y Nieschlag, 2000; Cumming y Walton, 1971; Hales y Robaire, 1997; Harrouk y col., 2000 a; 2000 b; Qiu y col., 1995)

Por otro lado, al analizar los resultados del índice de dominantes letales, se observó un incremento en todas las dosis, aunque solo fue estadísticamente diferente, para las dosis de 2.5, 15 y 20 mg/kg. Estos resultados concuerdan con lo descrito por otros autores, quienes observaron un incremento en el porcentaje de mutaciones letales dominantes, al administrar diferentes dosis de CF a ratas macho. En algunos casos los valores son menores a los encontrados en el presente trabajo, como por ejemplo los de Srám en 1976, quien al aplicar 5 inyecciones intraperitoneales de una dosis de 20 mg/kg produjo un 41% de letales dominantes y con 20 aplicaciones de 2.5 mg/kg encontró aproximadamente 9% de estas alteraciones.

También existen trabajos donde se encuentran porcentajes de dominantes letales más elevados que los descritos aquí: Botta y col., 1974, reportan un 63% de dominantes letales en ratas macho tratados con 4.5 mg/kg/día de ciclofosfamida.

Moreland en 1981 encuentra un 8% de dominantes letales para su grupo testigo y un incremento para las rata machos tratados con diferentes dosis de ciclofosfamida: 70% para la dosis de 5 mg/kg, 86% para la dosis de 10.0 y 20 mg/kg, con una elevada toxicidad del compuesto. Por otro lado, los datos de Jenkinson y Anderson en 1990, también son más elevados que los nuestros, 63% y 77.2%, para la dosis de 3.5 y 5.1 mg/kg de CF respectivamente.

La prueba de dominantes letales, es un indicador de que el agente químico o sus metabolitos causó daño al ADN de las células germinales, por lo que el índice de dominantes letales permite el registro indirecto de alguna lesión genética que produce la muerte de los descendientes en la etapa temprana del desarrollo, (Bentley y Working, 1988; Generoso y col., 1980; Green y col., 1985; Russell y col., 1981). Todo lo anterior muestra que la aplicación crónica de la CF a ratones macho, es capaz de inducir mutaciones letales en el ADN de las células germinales de los machos provocando que los descendientes portadores de estas mutaciones mueran durante su desarrollo uterino. Esto también concuerda con la disminución del número de implantes y el incremento en el número de reabsorciones que produjo la administración del compuesto.

Por otra parte, la administración de la CF a ratones macho antes del apareamiento produjo, en las dosis de 5.0, 7.5 y 10 mg/kg, una disminución del peso promedio de los embriones por camada. Esto concuerda con varios trabajos realizados con animales de laboratorio, en donde se describe que la exposición paterna a compuestos químicos, puede producir efectos como: disminución del tamaño de la camada y del peso fetal, muerte y defectos al nacimiento, inducción de tumores y anomalías en la conducta, e incluso se menciona que algunos de estos defectos pueden ser transmitidos a la segunda y a la tercera generación (Adams y col., 1984; Auroux y col., 1988; Colie 1993; Davis y col., 1992; Friedler, 1992; Joffe., 1979; Joffe y Soyka 1981; Olshan y Faustman 1993; Nelson y col., 1996; Robaire y Hales., 1993; Trasler y col., 1987). Además se ha reportado una relación entre la presencia de monosomías autosómicas y trisomías con el retardo en el desarrollo fetal y de malformaciones congénitas (Baranov, 1983; Groop y col., 1976; Jenkinson y Anderson, 1990).

#### **7.6.1.2 Anormalidades y malformaciones gruesas**

El porcentaje de embriones malformados se incrementó de forma estadísticamente significativa en las dosis de 2.5 y 15 mg/kg, aunque se puede apreciar que este parámetro se elevó en cinco de las dosis aplicadas, en la dosis más alta aparentemente no se afectó y esto pudo ser debido al incremento de la muerte embrionaria temprana.

En la dosis más baja (2.5 mg/kg), se registró el mayor porcentaje de embriones malformados. Trasler y col., 1986, describen que los efectos de un tratamiento crónico con dosis bajas de CF a ratas macho, era capaz de producir un porcentaje más alto de fetos anormales comparado con la administración aguda de una sola dosis alta. Por otra parte Jenkinson y Anderson en 1990,

aplicaron CF a ratas macho en dosis de 3.5 y 5.1 mg/kg, con lo cual obtuvieron aproximadamente 11% de fetos con anomalías

La sindactilia y la micrognatia fueron las principales malformaciones, observadas en los descendientes de los ratones machos tratados, aunque también se registraron algunas otras anomalías, como: talla pequeña (enano) (dosis de 15 mg/kg) y la presencia de hematomas en el cuerpo (dosis de 20 mg/kg). Estos resultados concuerdan con lo encontrado en ratas macho tratadas con CF, tanto en esquemas agudos como en crónicos, donde se describe un retardo en el crecimiento fetal (enanos), la presencia de edemas (anasarca), de hidrocefalia y de micrognatia (Trasler y col., 1986).

Jenkinson y Anderson en 1990, al tratar ratas macho con 3.5 ó 5.1 mg/kg de CF obtuvieron fetos con retardo en el crecimiento (enanos), la cual fue la anomalía con mayor porcentaje y el segundo tipo fue la anasarca. Las anomalías esqueléticas incluyendo anomalías craneofaciales e hidrocefálicas también fueron descritas

#### **7.6.2. Efecto del tratamiento con diferentes dosis de CF cada tercer día durante 60 días en los espermatozoides de los ratones macho.**

Al revisar los datos obtenidos de los espermatozoides que se encontraban en el epidídimo, se observó una disminución en la viabilidad y en la movilidad, con un incremento del porcentaje de malformaciones espermáticas.

En un trabajo realizado en 1980 por Topham, donde aplicaron 10 mg/kg de CF (como testigo positivo), encontraron que del 2 al 3% de espermatozoides tenían algún tipo de anomalía en cabeza, lo cual concuerda con lo obtenido en este trabajo.

Estudios en ratón indican que la exposición a agentes mutagénicos, incrementa la frecuencia de anomalías en la forma del espermatozoide (Wyrobek y col., 1983). Por otro lado también se ha encontrado una correlación entre la inducción de anomalías espermáticas y un incremento en las mutaciones en las células germinales evaluadas como dominantes letales o como translocaciones heredables, lo cual sugiere que, en el ratón al menos, la morfología anormal puede predecir daño al ADN en las células germinales (Wyrobek y col., 1983).

Sin embargo, algunos autores argumentan que la forma del espermatozoide no necesariamente predice el daño cromosómico o al ADN en su interior, ya que el daño a las células del Sertoli puede originar anomalías morfológicas secundarias (Russell y Shelby, 1985; Working, 1989). Aunque los modos de acción de algunos agentes químicos han sido descritos, muchos de los mecanismos de acción que afectan uno o más aspectos de la reproducción de los machos no se conocen, ya que pueden involucrar múltiples sitios de acción (Ratcliffe y col., 1993).

Cabe mencionar que, a pesar de que se observaron efectos a nivel de viabilidad y movilidad espermática, no se afectó drásticamente la fertilidad. En un trabajo realizado por Francis y col., en 1990, observaron que para que la fertilidad sea afectada por estos dos factores, estos tendrían que reducirse aproximadamente un 70%.

### **7.6.3 Dosis seleccionada.**

#### **7.6.3.1: Efecto reprotóxico, embriotóxico y malformaciones macroscópicas.**

Al realizar el experimento con la dosis seleccionada (2.5 mg/kg), los parámetros medidos presentaron ligeras variaciones, pero no fueron estadísticamente diferentes a los obtenidos en la primera parte de este protocolo, sin embargo el porcentaje de embriones con anomalías morfológicas no fue el esperado.

La dosis empleada en esta parte del experimento es un poco más baja que la reportada en la literatura, por ejemplo, en 1990, Jenkinson y Anderson administraron dosis de 3.5 y 5.1 mg/kg de CF, a ratas macho durante varias semanas y obtuvieron fetos con anomalías, aunque en este trabajo se utilizó una especie diferente; al ratón como modelo biológico. La sensibilidad de estas dos especies a los efectos teratogénicos de la ciclofosfamida se reporta, como similar (Anderson y col., 1995), lo cual permitió suponer que la dosis de 2.5 era adecuada.

La razón por la cual no se obtuvo el porcentaje esperado de embriones malformados, pudo deberse a varios factores como por ejemplo: que la "actividad" de la ciclofosfamida se modificara con el tiempo y que esto produjera un efecto diferente en los embriones, aunque es oportuno recordar que la CF incrementó el porcentaje de células con aberraciones cromosómicas en los embriones descendientes de los machos tratados, lo cual demuestra que la sustancia sí fue activa y logró alterar a los descendientes, aunque tal vez en menor grado.

Otra posibilidad es que, los ratones utilizados en los experimentos, presentaran diferente sensibilidad al compuesto, ya sea por razones fisiológicas o sanitarias. Aunque no debería de ser porque son de la misma cepa y del mismo bioterio o tal vez el tamaño de la muestra empleada no fue el adecuado.

#### **7.6.3.2 Índice Mitótico y frecuencia y tipo de aberraciones cromosómicas de los embriones obtenidos de ratones macho tratados con CF durante 60 días.**

Como ya se había mencionado en los resultados, aunque no se obtuvieron embriones con malformaciones, se procedió a obtener las células del hígado para determinar el índice mitótico y el porcentaje de células con AC.

El hecho de que en el grupo testigo un mayor porcentaje de embriones presentaran células con AC, comparado con el tratado (tabla 3.7), pudo deberse a que en el grupo tratado se revisaron pocas metafases, ya que en el 65% de los embriones se revisaron menos de 50 células, mientras que en el grupo testigo sí se logro evaluar 100 metafases por individuo. Otro hecho importante de resaltar es la calidad del material obtenido de los embriones del grupo tratado, en donde las metafases revisadas presentaban una apariencia diferente a las analizadas en el grupo testigo, ya que algunas parecían encontrarse en anafase tardía y en otros casos se presentaban metafases muy cerradas, a pesar de tener los mismos tiempos y concentraciones de colchicina e hipotónica que las muestras del grupo testigo

Los resultados obtenidos muestran que el IM del grupo de los embriones tratados fue estadísticamente menor al encontrado en el grupo testigo y el porcentaje de células con AC presentó un incremento, aunque no fue estadísticamente significativo. La disminución de la actividad mitótica ya ha sido reportada como un efecto de la exposición paterna a compuestos químicos (Jenkinson y Anderson, 1990), al igual que el daño genotóxico, por ejemplo Titenko y Holland (1998) reportaron un incremento en la frecuencia de células con micronucleos en embriones preimplantados descendientes de ratones macho expuestos a acrilamida.

Respecto a la calidad del material obtenido de los embriones descendientes de los machos tratados, algunos autores informan que es difícil obtener material de buena calidad de embriones, para ser revisado al microscopio, Jenkinson y Anderson en 1990 reportaron que de 107 fetos; en 37 no se pudieron revisar metafases, porque el material obtenido no tenía la suficiente calidad. Por otra parte Kelly y col., en 1994 analizaron células de embriones de 3 a 4 días de gestación, descendientes de ratas macho tratados con 6 mg/kg de CF y encontraron pocas metafases, por lo que postularon que esto podía deberse a una disminución en la actividad mitótica, lo cual concuerda con los resultados de este trabajo.

En trabajos donde utilizaron compuestos diferentes a la CF los resultados obtenidos son similares. Titenko-Holland y colaboradores en 1998, observaron que en el grupo de embriones obtenidos de ratas macho tratados con acrilamida presentaron menor número de metafases, que el grupo control, lo cual sugiere una reducción en la actividad de proliferación celular.

Los embriones testigos y tratados, se dividieron en dos grupos, con y sin células con AC. En el grupo tratado los embriones que sí presentaron AC, promediaron 4.4% de células con AC, lo cual fue mayor al testigo, predominando los fragmentos y los rompimientos cromatídicos (tabla 3.9)

De los 13 embriones descendientes de machos tratados (tabla 3.11), en los que se encontraron células con AC, solamente en 4 de estos se pudieron revisar 100 células. En cuanto al porcentaje de células con aberraciones, este es muy

variable desde 1 hasta 24%. Mientras que en el grupo testigo (tabla 3.12), en los 28 fetos se revisaron 100 ó más células, y el porcentaje de células con AC en el 68% de los fetos fue de 1% ó menor. Lo anterior muestra que existe diferencias entre el grupo de embriones obtenidos de machos tratados y los del grupo testigo en relación a la calidad y cantidad del material obtenido, además de que hay una gran variabilidad en el porcentaje de células con AC en el grupo tratado lo cual puede reflejar las diferencias en las sensibilidades individuales de los embriones.

El hecho de que no se encontraran embriones con malformaciones y que si se presentaran un ligero incremento en el porcentaje de células con aberraciones cromosómicas, puede estar indicando que tal vez la dosis empleada no es la apropiada para generar los dos efectos en el mismo organismo, o que tal vez el tamaño de la muestra empleada debe ser más grande.

Aunque tampoco debemos descartar la posibilidad de que la presencia de células con AC, en los embriones, puede deberse a la llegada directa de la ciclofosfamida a estos, ya que se sabe que este compuesto y sus metabolitos pueden entrar a todos los tejidos del aparato reproductivo de los machos, así como al fluido de la vesícula seminal el cual durante la cruce puede ser transmitido a la hembra, donde es absorbida a través de la vagina y distribuida a varios tejidos (Hales y col , 1986; Hales y Robaire, 1997; Robaire y Hales, 1994).

## 8.0 DISCUSIÓN GENERAL.

La Teratogénesis es parte de la Toxicología del Desarrollo, la cual además de las malformaciones, también abarca la muerte embrionaria, retardo en el crecimiento y anomalías en el funcionamiento del organismo. La teratogénesis y la mutagénesis son procesos que pueden estar relacionados ó tener los mismos blancos celulares (Bishop y col., 1997).

Varios autores han propuesto la existencia de una posible relación entre el efecto genotóxico y teratogénico de los compuestos químicos, reconociendo la importancia que tienen las alteraciones genéticas en la producción de las anomalías morfológicas externas, ya que se sabe que algunas mutaciones somáticas inducidas directamente en los embriones al exponer a la madre a algún agente, pueden afectar una gran cantidad de células, en un número suficiente, como para producir un defecto estructural o funcional (Ferguson y Ford, 1997), también se sabe que cuando algún daño genético es producido por agentes xenobióticos en las células germinales tanto maternas como paternas, este puede ser transmitido a la siguiente generación y la descendencia portadora de este daño también puede llegar a manifestar alguna malformación (Brinkworth 2000; Tiveron y col., 1997).

Tratando de encontrar la posible relación, entre los efectos genotóxicos y teratogénicos, algunos investigadores han analizado ambos procesos usando el mismo modelo biológico. Por ejemplo en 1988 Porter y Singh determinaron la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas y la presencia de malformaciones en dos grupos de fetos obtenidos de ratas hembra tratadas, sin embargo las evaluaciones se realizaron en diferentes individuos ya que para el análisis citogenético se maceraba el embrión completo, con lo cual se perdía la oportunidad de evaluar en el mismo organismo la presencia de malformaciones estructurales, además de que el parámetro de las ICH no implica necesariamente daño genético.

En este trabajo se emplearon embriones descendientes de ratones hembras y de machos de la cepa CD-1 tratados *in vivo* con un compuesto químico que tiene la capacidad de producir tanto efectos mutagénicos como teratogénicos, la ciclofosfamida, con la finalidad de evaluar la presencia de anomalías morfológicas externas así como el índice mitótico y la frecuencia y tipo de aberraciones cromosómicas en el mismo organismo y su posible relación.

Los embriones obtenidos del tratamiento transplacentario, presentaron una disminución del índice mitótico, lo cual muestra que este compuesto alteró la capacidad de división de las células fetales. Como ya se mencionó la CF es una sustancia citostática y citotóxica que tiene la capacidad de interferir con la síntesis del ADN (Kola y col., 1986), deteniendo a las células en la fase S, esto debido tal vez al daño originado en el ADN por su efecto alquilante (Heringová y col., 1998).

Existen amplias evidencias experimentales de que la pérdida de una alta proporción de células durante el desarrollo de un individuo, en este caso por la disminución en la proliferación celular, puede interferir con el curso normal de la organogénesis o provocar la falta del material necesario para el crecimiento del organismo Torchinsky y colaboradores en 1999, postularon que las alteraciones del ciclo celular, incluyendo la muerte, son uno de los primeros pasos en la producción de las anomalías morfológicas, originadas por la CF Algunos estudios revelan que la muerte celular producida por bajas dosis de CF puede ser compensada en ciertas poblaciones celulares y que esto evita la formación de anomalías estructurales, pero si el daño es muy grande, la muerte celular no puede ser compensada originando una malformación o la muerte del embrión (Faustman y Ribeiro, 1989; Torchinsky y col., 1999; Zakeri y Ahuja, 1997)

Aunque en el presente trabajo, se analizó el IM solo en el hígado, es probable que en diferentes órganos del embrión también se pudiera estar presentando una disminución de este parámetro, incluyendo aquellas estructuras que presentaron malformaciones Lo anterior se basa en evidencias que muestran que la aplicación de la CF a embriones de pollo, produce alteraciones en el ciclo celular en varias regiones de este organismo como son las extremidades, la región facial, el cerebro y el corazón (Heringová y col., 1998).

En este trabajo el tratamiento transplacentario con CF, incrementó el porcentaje de los embriones que presentaban malformaciones morfológicas externas y una mayor frecuencia de células hepáticas con aberraciones cromosómicas. Las consecuencias de la presencia de células con aberraciones cromosómicas en los embriones en desarrollo no se conocen, sin embargo, algunos autores postulan que estas pueden iniciar malformaciones embrionarias, defectos en el nacimiento o producir cáncer postnatal (Adler 1981; Xing, 1992)

Se sabe que algunos efectos mutagénicos están acompañados por un retardo en el ciclo celular y que pueden manifestarse como muerte cuando un gran número de estas células mutantes son incapaces de sobrevivir. De lo anterior se propone que la ciclofosfamida llega al embrión y daña al ADN originando aberraciones cromosómicas, además de producir disturbios en el ciclo celular y esto puede originar una anomalía morfológica, ya que se sabe que los disturbios en el ciclo celular así como la citotoxicidad reducen el número de células, muchas de las cuales son necesarias para llevar a cabo un proceso morfogenético a buen término. La proliferación y la muerte celular son básicos para el proceso morfogenético y es evidente que su alteración durante la organogénesis puede producir efectos teratogénicos (Bishop y col., 1997; Ferguson y Ford, 1997).

En este trabajo solo se evaluó el IM y AC en el hígado de los embriones, pero, ¿qué podría estar pasando en las regiones del embrión que presentaban malformaciones?, como por ejemplo en las extremidades Dado que Torchinsky y colaboradores (1999) reportaron que el hígado es significativamente menos sensible que las extremidades o la cabeza al daño teratogénico producido por la



CF y que Rafferty y colaboradores (1996), describieron que la actividad de las enzimas de reparación es mayor en el hígado que en el pulmón, el cerebro o el riñón, lo que podríamos especular es que la frecuencia de aberraciones cromosómicas encontrada en las células del hígado de los fetos que presentaban malformaciones, sea semejante ó menor al daño que se esta produciendo en las extremidades, aunque tampoco debemos olvidar que existen diferencias en la sensibilidad entre tejidos u órganos.

La metodología empleada en este trabajo permitió evaluar la frecuencia de células con aberraciones cromosómicas en los embriones que presentaban malformaciones, lo que nos permite afirmar que la dosis de CF aplicada a las hembras preñadas, produce ambos efectos en el mismo individuo, aunque esto no implica que uno sea consecuencia del otro. Con base en los datos obtenidos podemos concluir que no existe una relación directa entre el tipo de malformación externa que presenta el embrión y el tipo de aberración cromosómica encontrada en las células hepáticas. Aunque es importante remarcar que, los embriones que presentaron malformaciones morfológicas externas también presentaron un porcentaje mayor de células con aberraciones cromosómicas y una disminución del índice mitótico, comparados con aquellos embriones que presentaban un fenotipo normal dentro del mismo grupo tratado.

Por otro lado, cuando se administró una dosis baja de CF a ratones macho de la cepa CD-1, durante 60 días, los embriones obtenidos después de la cruce de estos animales con hembras sin tratamiento no presentaron malformaciones externas, aunque sí se observó un incremento en la proporción de embriones de menor tamaño. El retardo en el desarrollo de los organismos descendientes de machos tratados, ha sido reportado anteriormente como consecuencia de mutaciones puntuales y trisomías (Jenkinson y Anderson, 1990). Lo anterior indica que al parecer la CF fue capaz de causar algún tipo de daño a las células germinales paternas y que éste se manifestó en los embriones.

Ésta documentado que la CF produce malformaciones morfológicas externas, sin embargo la dosis utilizada en este trabajo no incremento la proporción de embriones con malformaciones, pero si se encontró un aumento en la frecuencia de células hepáticas con aberraciones cromosómicas (no estadísticamente significativo), lo que indica que, de cierta forma, el tratamiento con CF si produjo daño, ya sea de manera directa ó indirecta.

Aunque en este caso la dosis seleccionada no incremento el porcentaje de embriones con malformaciones externas después del tratamiento crónico con CF, los reportes de otras investigaciones siguen apoyando la idea de que el tratamiento de los machos con agentes químicos, por periodos largos de tiempo, antes de la cruce, puede producir tanto daño teratogénico como genotóxico en la descendencia. Por ejemplo Harrouk y colaboradores (2000b), informaron que los embriones de dos a ocho células obtenidos a partir de hembras cruzadas con ratas macho tratadas con 6mg/kg de ciclofosfamida durante 6 semanas presentaban daño al ADN. Además también se ha comprobado daño en otros

parámetros, como por ejemplo, la expresión de genes de la reparación (Harrouk y col., 2000a) y en la apoptosis (Brinkworth, 2000) También existen reportes de los diferentes efectos que se originan en las células germinales de los machos tratados con ciclofosfamida y que se postula pueden llegar a afectar el desarrollo embrionario de sus descendientes (Sawyer y Brown; 2000; Aguilar-Mahecha y col., 2001; Watanabe y Kimiguchi; 2001)

Todo lo anterior apoya la idea de que la exposición paterna a algunos *agentes químicos puede modificar el desarrollo embrionario de un nuevo organismo*, por lo que es necesario plantear más estudios para analizar como se originan estas anomalías

## 9. CONCLUSIONES.

1) Los resultados obtenidos en el primer protocolo concuerdan con los datos publicados anteriormente por varios autores en los cuales se reporta que la CF produce un incremento en la frecuencia de AC en las células de la médula ósea de ratón. Además de que basados en los datos del presente trabajo se puede concluir que existe una clara diferencia en la respuesta (inducción de AC) entre ratones macho y hembra, siendo más sensibles los ratones macho. También se encontraron diferencias en la sensibilidad entre ratones hembra preñadas y no preñadas.

2) El modelo biológico empleado en este trabajo, protocolo 2, permitió evaluar el índice mitótico y los parámetros citogenético y teratogénico (aberraciones cromosómicas y anomalías morfológicas externas) en el mismo individuo, por lo que se considera como un buen modelo para estos estudios, además de que también se pueden evaluar otros parámetros

3) El incremento en el porcentaje de células con aberraciones cromosómicas, en los hígados de los embriones obtenidos de ratonas tratadas con 10 mg/kg de CF, confirman la genotoxicidad transplacentaria de la ciclofosfamida

4) Dentro del grupo de los embriones obtenidos del tratamiento transplacentario, los organismos con fenotipo **anormal** presentaron un porcentaje mayor de células con AC y un menor I.M, lo que muestra una cierta relación entre el daño citogenético, el efecto citostático y la presencia de malformaciones

5) No se encontró una relación directa entre el tipo de malformación que presentaron los fetos y la frecuencia ó tipo de aberración que presentaban las células hepáticas.

6) Aunque la dosis de CF empleada con ratones machos en el tratamiento crónico no incremento el porcentaje de fetos con malformaciones, la presencia de células con aberraciones cromosómicas en los hígados de los embriones descendientes, puede estar indicando que tal vez la dosis empleada de ciclofosfamida no es la adecuada para producir ambos efectos en el mismo individuo, por lo que sería necesario realizar más experimentos.

7) los resultados encontrados en las células espermáticas de los ratones macho tratados con diferentes dosis de CF, confirma lo reportado en la literatura de que la CF es capaz de dañar a las células germinales (movilidad, motilidad y malformaciones espermáticas) de los machos tratados.

## 10. COMENTARIOS.

1) Las diferencias observadas en las frecuencias de AC en relación al sexo y a la preñez después del tratamiento con CF, protocolo 1, pueden estar relacionadas con el metabolismo del agente y con factores hormonales y su interacción con los citocromos P-450, ya que se ha descrito que varios citocromos están regulados hormonalmente ó son sexo-específicos; por lo que es recomendable medir la concentración de citocromos P-450 en ratón hembra y macho y si es posible identificar cual es el citocromo que participa en el metabolismo de la ciclofosfamida en esta especie.

2) El incremento en la frecuencia de células embrionarias hepáticas con aberraciones cromosómicas está reflejando la susceptibilidad del producto durante la gestación, al daño producido por la CF, ya sea por vía directa o indirecta. Aunque no se cuantifico el daño en cada miembro u órgano del embrión es posible pensar que todo el organismo es susceptible a la acción de este compuesto y que de una manera u otra el efecto mutagénico de la CF puede contribuir a su efecto teratogénico. En este caso dado que se esta utilizando un modelo biológico que permite evaluar tanto el efecto teratogénico como el genotóxico en el mismo individuo, sería posible evaluar diferentes parámetros en todos y cada uno de los tejidos u órganos de los embriones que presenten malformaciones.

3) Con base a los resultados obtenidos en el tratamiento transplacentario, podemos decir que tal vez múltiples mecanismos; como el retardo o disminución de las células en proliferación, muerte celular y daño citogenético (aberraciones cromosómicas), pueden estar involucrados en la producción de anomalías en el desarrollo, generados por la administración de la ciclofosfamida. Por todo lo anterior es necesario plantear más estudios para establecer cual es la contribución de cada uno de estos mecanismos en los defectos del desarrollo producido por la ciclofosfamida.

4) La presencia de células con aberraciones cromosómicas en los hígados de los embriones del protocolo 3, puede ser el resultado de la llegada directa de la ciclofosfamida a los productos a través de la hembra, Ya que se sabe que esta sustancia y sus metabolitos pueden entrar a todos los tejidos del aparato reproductivo de los machos, así como al fluido de la vesícula seminal, por lo que durante la cruce puede ser transmitido a la hembra.

5) Aunque en este trabajo, protocolo 3, la dosis seleccionada no incremento el porcentaje de embriones con malformaciones externas después del tratamiento crónico con CF, los reportes de otras investigaciones siguen apoyando la idea de

que el tratamiento de los machos con agentes químicos, por periodos largos de tiempo, antes de la cruce, puede producir tanto daño teratogénico como genotóxico en la descendencia. Todo lo anterior apoya la idea de que la exposición paterna a algunos agentes químicos puede modificar el desarrollo embrionario de un nuevo organismo por lo que es necesario plantear más estudios para analizar como se originan estas anomalías.

## 11. REFERENCIAS.

- Abraham K S** 1995. Inhibitory effects of coffee on transplacental genotoxicity in mice *Mutat. Res.* 347:45-52
- Adler I D** 1981. Transplacental cytogenetic effects by TEM, mitomycin C and benzo-a-pyrene *Mutat. Res.* 85:299-300
- Adler I D** 1983. New approaches to mutagenicity studies in animals for carcinogenic and mutagenic agents II Clastogenic effects determined in transplacentally treated mouse embryos *Teratogen Carcinog. Mutagen.* 3:321-334
- Adler I D** 1990. Clastogenic effects of acrylamide in different germ-cell stages of male mice In: *Biology of Mammalian Germ Cell Mutagenesis*. Banbury report 34 Cold Spring Harbor pp 115-131
- Adams P M**, Fabricant J D y Legator M S. 1984. Male-transmitted developmental and neurobehavioral deficits *Teratogen Carcinog. Mutagen.* 4:149-169.
- Aguilar-Mahecha A**, Hales F B y Robaire B 2001. Acute cyclophosphamide exposure has germ cell specific effects on the expression of stress response genes during rat spermatogenesis *Mol. Reprod. Dev.* 60:302-311
- Al-Bekairi A. M**, Qureshi S, Chaudhry M. A. y Shah A. H 1991. Uric acid as an inhibitor of cyclophosphamide-induced micronuclei in mice. *Mutat. Res.* 262:115-118
- Albanese R** 1987. Mammalian male germ cell cytogenetics *Mutagenesis*, 2:79-85.
- Allen J W**, El-Nahass E, Sanyal M K, Dunn R L, Gladin B. y Dixon R L 1981. Sister chromatid exchange analyses in rodent maternal, embryonic and extraembryonic tissues: Transplacental and direct mutagen exposures *Mutat. Res.* 80:297-311
- Allen J W**, DeWeesw G K, Gibson J B, Poorman P A y Moses M. J 1987. Synaptonemal complex damage as a measure of chemical mutagen effects on mammalian germ cells *Mutat. Res.* 190:19-24
- Ammenheuser M M**, Ward J B, Whorton E. B, Killian J. M. y Legator M. S. 1988. Elevated frequencies of 6-thioguanine-resistant lymphocytes in multiple sclerosis patients treated with cyclophosphamide: a prospective study *Mutat. Res.* 204:509-520
- Anderson D** 1993. Cytogenetics. In: Ballantyne B, Marrs T and Turner P (eds). General & Applied Toxicology, Vol. 2. Stockton Press, New York, USA. pp 937-955
- Andress M. J**, Frith H C, Goodman G. D., Boysen G B., y Cook S. C. 1992. The Mouse. In: Gad C. S and Chengelis P C (eds). Animal Models in Toxicology. Marcel Dekker, INC New York pp 165-294.
- Anderson D**, Bishop B J, Colin Garner R, Ostrosky-Wegman P. y Selby B P. 1995. Cyclophosphamide: Review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks *Mutat. Res.* 330:115-181

- Angley M T**, Sansom L N y Stupans I. 1995 Cyclophosphamide administered repeatedly to the male rat and as a single dose to the female rat. Its effects on hepatic and pulmonary P450 and associated enzymes. *Xenobiotica*, 25:1051-1062
- Ashby R**, Davis L, Dewhurst B B, Espinal R, Penn R N. y Upshall D. G. 1976 Aspects of the teratology of cyclophosphamide. *Cancer Treat. Rep.*, 60:477-482.
- Au W W**, Obergoemer N, Goldenthal P, Corry M. y Willingham W. 1982 Sister chromatid exchanges in mouse embryos after exposure to ultrasound in utero. *Mutat Res.*, 103:315-320
- Auroux M**, Dulioust E J, Nawar N N Y, Yacoub S G, Mayaux M J, Schawartz, D., y David G. 1988 Antimitotic drugs in male rat. Behavioral abnormalities in the second generation. *J. Androl*, 9:153-159.
- Auroux M**, Dulioust E, Selva J y Rince P. 1990 Cyclophosphamide in the Fo male rat: physical and behavioral changes in three successive adult generations. *Mutat Res.*, 229:189-200
- Autrup H**. 1993 Transplacental transfer of genotoxins and transplacental carcinogenesis. *Environ Hlth Perspect*, 101:33-38.
- Backer L C**, Gibson J. B, Moses M. J y Allen J. W. 1988 Synaptonemal complex damage in relation to meiotic chromosome aberrations after exposure of male mice to cyclophosphamide. *Mutat Res*, 203:317-330.
- Baranov V S**. 1983 Chromosomal control of early embryonic development in mice. II. Experiments on embryos with structural aberrations of autosomes 7, 9,14 and 17. *Genetic Res.*, 41:227-239
- Basler A**. 1979 Sister chromatid exchanges in vivo in Chinese hamster embryonic liver cells exposed transplacentally to BrdU. *Cytog Cell Genet*, 24:193-196
- Beaudoin R. A.** 1980. Embryology and Teratology. In: Baker J. H., Lindsey J. R. y Weisbroth H. S. (ed) The laboratory rat vol. II: Research Applications. Academic Press Inc
- Beliles R P**. 1972 Influence of pregnancy on the acute toxicity of various compounds in mice. *Toxicol. Applied. Pharmacol.*, 23:537-540
- Benson A J**, Martín C. N y Garner R. C. 1988. N-(2-Hydroxyethyl)-N-[2-(7-guaninyl)ethyl], the putative major DNA adduct of cyclophosphamide in vitro and in vivo in the rat. *Biochem Pharmacol.*, 37:2979-2985.
- Bentley S K** y Working K.P., 1988, Activity of germ-cell mutagens and non mutagens in the rat spermatocyte UDS assay. *Mutat Res.*, 203:135-142

- Bigbee W L**, Wyrobek A J, Langlois R G, Jensen y Everson R B 1990. The effect of chemotherapy on the in vivo frequency of glycophorin A "null" variant erythrocytes. *Mutat. Res*, 240:165-175.
- Bishop B J**, Witt L. K., y Sloane A. R. 1997 Genetic toxicities of human teratogens. *Mutat. Res*, 396:9-43.
- Botta J A**, Hawkins H. C. y Weikel J. H. 1974. Effects of cyclophosphamide on fertility and general reproductive performance of rat. *Toxicol Appl Pharmacol*, 27:602-611.
- Bochert G**, Platzek R., Rahm U y Webb J. 1978. Some new aspects in the study of DNA alkylation in embryonic and fetal tissues. In: Neubert D., Merker H J., Nau H. and Langman J (eds). Role of Pharmacokinetics in Prenatal and perinatal Toxicology Georg Thieme Verlag.
- Bournias-Vardiabasis N**, Buzin C y Flores J. 1990 Differential expression of heat shock proteins in Drosophila embryonic cells following metal ion exposure. *Exp Cell Res*, 189:177-182
- Braun R**, Hüttner E y Schöneich J. 1986 Transplacental genetic and cytogenetic effects of alkylating agents in the mouse. II: Induction of chromosomal aberrations. *Teratogen Carcinog Mutagen*, 6:69-80
- Brierly C. H** y Burchell B. 1993 Human UDP-glucuronosyl transferases: Chemical defense, jaundice and gene therapy. *Bioessays*, 15:749-754
- Brinkworth H. M.** 2000 Paternal transmission of genetic damage: findings in animals and humans. *Int J Androl*, 23:123-135
- Brinkworth H. M** y Nieschlag E. 2000 Association of cyclophosphamide-induced male-mediated, foetal abnormalities with reduced paternal germ-cell apoptosis. *Mutat Res*, 447:149-154.
- Brock N**, Gross R., Horost H. H. J., Klein H. O. y Schneider B. 1971. Activation of cyclophosphamide in man and animals. *Cancer*, 27: 1521-1529.
- Burchell B** y Coughtrie M. W. H. 1989 UDP-glucuronosyltransferase. *Pharmacol Ther*, 43:261-289.
- Burrell R**, Flaherty K. D y Sauers J. L. 1992. Toxicology of the Immune System: A Human Approach, Van Nostrand Reinhold, New York, USA pp 33-48
- Campbell R. M**, Fell B. F. y Mackie W. S. 1974. Ornithine decarboxylase activity, nuclei acids, and cell turnover in the livers of pregnant rats. *J Physiol London*, 241:699
- Chang T.K** y Bellward G. D. 1996 Peripubertal androgen imprinting of rat hepatic cytochrome P450 2C11 and steroid 5 alpha-reductase; pretranslational regulation and impact on microsomal drug activation. *J. Pharmacol. Exp Ther*, 278:1383-1391.



**Chang T K**, Chen H. y Waxman D. J 1994 1-(2chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea (CCNU) modulates rat liver microsomal cyclophosphamide and ifosfamide activation by suppressing cytochrome P450 2C11 messenger RNA levels. *Drug. Metab. Dispos.*, 22:673-679

**Chang H H.**, Tse Y y Kaufman M.H 1998. Analysis of interdigital spaces during mouse limb development at intervals following amniotic sac puncture *J Anat*, 192:59-72

**Chen B** Cyr D G y Hales B. F 1994. Role of apoptosis in mediating phosphoramidate mustard-induced rat embryo malformations in vitro *Teratology*, 50:1-12

**Chernoff N**, Roger J M, Alles A J, Zuker R. M, Elstein K. H., Massaro E J. y Sulik K K. 1989. Cell Cycle alteration and cell death in cyclophosphamide teratogenesis. *Teratogen Carcinog. Mutagen.*, 9:199-209.

**Cholerton S.**, Daly A K y Idle J R. 1992 The role of individual cytochrome P450 in drug metabolism and clinical response. *Trends Pharmacol. Sci.*, 13:434-439

**Chorvatovicova D** y Ujházy 1995. Transplacental effect of stobadine on cyclophosphamide induced micronucleus frequency in mice *Mutagenesis*, 10:531-534

**Chung F L**, Young R y Hecht S S. 1984 Formation of cyclic 1, N2-propanodeoxyguanosine adducts in DNA upon reaction with acrolein or crotonaldehyde *Cancer Res.*, 44:990-995

**Cohen M M**, 1990, Syndromology: an updated conceptual overview VII Aspects of Teratogenesis *Int J Oral Maxillofac Surg*, 19:26-32

**Cole R J**, Taylor N A, Cole J y Arlett C F 1979. Transplacental effects of chemical mutagens detected by the micronucleus test *Nature*, 277:317-318

**Cole R J**, Taylor N., Cole J. y Arlett C. F 1981. Short-term tests for transplacentally active carcinogens I Micronucleus formation in fetal and maternal mouse erythroblasts *Mutat Res*, 80:141-157

**Cole R J**, Taylor N., Cole J., Henderson L y Arlett C F. 1982 Sensitivity of the transplacental micronucleus test to diethylnitrosamine. *Mutat Res*, 104:165-171

**Cole R. J**, Cole J, Henderson L, Taylor N. A, Arlet C F y Regan T. 1983 Short-term tests for transplacentally active carcinogens. A comparison of sister-chromatid exchange and the micronucleus test in mouse foetal liver erythroblasts *Mutat Res*, 113:61-75.

**Colie C F** 1993 Male mediated teratogenesis *Reprod Toxicol*, 7:3-9.

**Colvin M** 1983 The alkylating agents. In: Saunders W. B (ed) Pharmacologic Principles of Cancer Treatment. Philadelphia pp 276-308.

**Counis M F**, Chaudun E, Simonneau L y Courtois Y 1979 DNA repair in lens cells during chick embryo development *Biochim Biophys Acta*, 26:85-98

**Crook T R**, Souhami R. L. y McLean A. E. M 1986 Cytotoxicity, DNA crosslinking and single strand breaks induced by activated cyclophosphamide and acrolein in human leukemia cells *Cancer Res* , 46:5029-5034

**Cumming R B**. y Walton M. F. 1971. Genetic effects of cyclophosphamide in the germ cells of m male mice. *Genetics*, 68:14-20

**Curry P T**, Ziemer T, Waller T, Waller D P, Zaneveld L J. y Kitchin R M 1990 The lack of mutagenicity of aryl 4-guanidinobenzoates in the transplacental micronucleus assay in mice *Reproduct. Toxicol.*, 4:153-156.

**Cusido L**, Pujol J. R., Egoscue J y García M 1995 Cyclophosphamide-induced synaptonemal complex damage during meiotic prophase of female *Rattus norvegicus* *Mutat. Res* , 329:131-141

**Datta P K**, Frigger H y Scheleiermacher. 1970 The effect of chemical mutagens on the mitotic chromosomes of the mouse, *in vivo*. In: Vogel and Röhrborn (Eds). Chemical Mutagenesis in Mammals and Man Springer-Verlag Berlin pp:194-213

**Davis D L**, Friedler G., Mattison D y Morris R 1992 Male-mediated Teratogenesis and other reproductive effects: Biologic and epidemiologic findings and a plea for clinical research *Reproductive Toxicology*, 6:289-292

**Dean M E**. y Stock B. H 1975. Hepatic microsomal metabolism of drugs during pregnancy in the rat. *Drug Metab Dispos* , 3:325-328.

**Dirven H A**, Venekamp J C, Van Ommen B y Van Bladeren P. J 1994. The interaction of glutathione with 4-hydroxy-cyclophosphamide and phosphoramidate mustard, studied by P nuclear magnetic resonance spectroscopy *Chem Biol Interact* , 93:185-196

**Dobos M**, Schule D y Feteke G 1974 Cyclophosphamide-induced chromosomal aberrations in non tumors patients *Human genetic* , 22:221-227

**Düker D** 1981. Investigations into sister chromatid exchanges in patients under cytostatic therapy. *Human Genetic* , 58:198-203

**Eibs H G** y Spielmann H 1977 Differential sensitivity of preimplantation stage mouse embryos to UV irradiation *in vitro* and evidence for postreplication repair *Radiat. Res* , 71:367-372.

**El-Nahas S M**, Samad A M F. y de-Hondt H. A. 1997: Mutagenicity of cidial (Phenthoate) I: Effect on maternal and fetal somatic cells *Environ. Mol. Mutagen* , 29:53-57.

**Erickson L C**, Ramones L M, Zaharko D. S y Kohn K. W. 1980 Cytotoxicity and DNA cross-linking activity of 4-sulphido-cyclophosphamide derivatives *in vitro* *Cancer Res* , 40: 4216-4220

**Fabricant J D**, Lagator M S y Adams P M 1983 Post-meiotic cell mediation of behavior in progeny of male rats treated with cyclophosphamide *Mutat Res* , 119:185-193

- Fantel G A** 1996. Reactive oxygen species in developmental toxicity review and hypothesis *Teratology*, 53:193-217.
- Faustman M E y Ribeiro P.** 1989 Pharmacokinetic considerations in developmental toxicity In: Hood D P. (ed). Developmental toxicology: Risk assessment and the future. Van Nostrand Reinhold, New York pp 109-136
- Ferguson R L y Ford H J.** 1997 Overlap between mutagens and teratogens. *Mutat Res* , 39:1-8
- Feuer G** 1979 Action of pregnancy and various progesterones on hepatic microsomal activities *Drug Metab. Rev* , 9:147
- Feuer G y Kardish R.** 1975. Hormonal regulation of drug metabolism during pregnancy *Int J Clin. Pharmacol* , 11:366-369
- Filler R y Lew K. J** 1981. Developmental onset of mixed-function oxidase activity in preimplantation mouse embryos *Proc Natl. Acad. Sci. U S A.* , 78:6991-6995.
- Foley G E , Friedman O M y Drolet B P** 1961 Studies on the mechanisms of action of cytoxan: Evidences of activation in vivo and vitro *Cancer Res* , 21:57-63
- Francis B M , Rogers J M., Sulik K K., Alles A. J., Elstein K H , Zucker R M., Massaro E J , Rosen M. B. y Chernoff N.** 1990 Cyclophosphamide teratogenesis: Evidence for compensatory responses to induced cellular toxicity *Teratology*, 42:473-482
- Fränz J** 1978 Mutagenicity of isoniazid: Testing for somatic chromosome aberrations in mouse embryos *Hum Genet* , 42:28-30
- Friedler G** 1992. Developmental toxicology: Male-mediated effects In Paul M (ed) Occupational and environmental reproductive hazards: A guide to clinicians Williams & Wilkins. Baltimore , pp. 52-59.
- Galloway S M , Perry P. E., Meneses J., Nebert D W y Pederson R. A** 1980. Cultured mouse embryos metabolize benzo(a)pyrene during early gestation: Genetic differences detectable by sister chromatid exchange *Proc Natl Acad. Sci USA* 7:3524-3528
- Gebhardt D E** 1970 The embryo-lethal and teratogenic effects of cyclophosphamide on mouse embryos *Teratology*, 3:273-278
- Generoso W. W , Bishop J B , Gosslee D G , Newell G W , Sheu C y Von Halle E.** 1980. Heritable translocation test in mice *Mutat Res* , 76:191-215
- Germán J** 1984 Embryonic stress hypothesis of teratogenesis. *Am. J. Med* , 76:293-301.
- Ghaskadbi S S., Rajmachikar S Agate C , Kapadi A H y Vaidya V. G** 1992 Modulation of cyclophosphamide mutagenicity by vitamin C in the in vivo rodent micronucleus assay. *Teratogen Carcinog. Mutagen.* , 12:11-17

**Gibson J. E y Becker B. A** 1971 Teratogenicity of structural truncates of cyclophosphamide in mice *Teratology* , 4:141-150.

**Goetz P. Scram R. J y Donnalova J.** 1975 Relationship between experimental results in mammals and man I. Cytogenetic analysis of bone marrow injury induced by a single dose of cyclophosphamide *Mutat. Res* , 31:247-254

**Green S , Auletta A., Fabricant J , Kapp R , Manadhar M , Shev C , Springer J y Whitfield B** 1985 Current status of bioassays in genetic toxicology: The dominant lethal assay, *Mutat. Res* , 154: 49-67.

**Groop A , Puts B. y Zimmerman** 1976. Autosomal monosomy and trisomy causing developmental failure *Current Topics Pathol* , 62:177-192

**Guarino A. M , Gram T. E , Schroeder D. H , Call J. B y Gillett J. R** 1969 Alteration in kinetic constants for hepatic microsomal hydroxylase and ethylmorphine N-demethylase associated with pregnancy in rats *J Pharmacol Exp Ther* , 168:224-227.

**Gut I , Becker B. A y Gutova M** 1976. Effect of pregnancy on hepatic microsomal drug metabolism in rabbits and rats *Arch Toxicol* , 35:41-46

**Hadidi A. F. A , Coulter C. E. A , y Idle J. R** 1988. Phenotypically deficient elimination of carboxyphosphamide after cyclophosphamide administration to cancer patients *Cancer Res* , 48:5167-5173

**Hales B. F** 1981. Modification of the teratogenicity and mutagenicity of cyclophosphamide with thiol compounds. *Teratology*, 23:373-381

**Hales B. F.** 1982. Comparison of the Mutagenicity and teratogenicity of cyclophosphamide and its active metabolites, 4-hydroxycyclophosphamide, phosphoramidate mustard and acrolein *Cancer Res* , 42:3016-3121

**Hales F. B y Robaire B.** 1997. Paternally mediated effects on development, In: Hood D. R. (ed), Handbook of Developmental Toxicology, CRC press, New York, USA pp 91-107.

**Hales F. B , Smith S y Robaire B** 1986 Cyclophosphamide in the seminal fluid of treated males: Transmission to females by mating and effect on pregnancy outcome. *Toxicol Appl. Pharmacol.* , 84:423-430.

**Hales B. F , Crosman K y Robaire B** 1992 Increased postimplantation loss and malformations among the F2 progeny of male rats chronically treated with cyclophosphamide. *Teratology* , 45:671-672

**Hansmann I.** 1974. Chromosome aberrations in metaphase II oocytes: stage sensitivity in the mouse oogenesis to amethopterin and cyclophosphamide *Mutat. Res* , 22:175-191

**Harper B. L , Sadagopa-Ramanujan V. M. y Legator M. S.** 1989. Micronucleus formation by benzene, cyclophosphamide, benzo(a)pyrene, and benzidine in male, female, pregnant female and fetal mice *Teratogen Carcinog Mutagen* . 9:239-252.

**Harrouk W**, Khatabaksh S, Robaire B y Hales B. 2000a Paternal Exposure to Cyclophosphamide Dysregulates the Gene Activation Program in Rat Preimplantation Embryos. *Mol Reprod Dev*, 57:214-223

**Harrouk W**, Codrington A; Vinson R, Robaire B y Hales B 2000b Paternal exposure to cyclophosphamide induces DNA damage and alters the expression of DNA repair genes in the rat preimplantation embryo *Mutat Res*. 461:229-241

**Henderson L** 1986. Transplacental genotoxic agents: Cytogenetic methods for their detection. In: De Serres F (ed) Chemical Mutagens: Principles and methods for their detection. Plenum Press. N Y. pp. 329-355

**Henderson L**, Cole R, Aghanohammadi Z y Regan T. 1984 Sister-chromatid exchange and micronucleus induction as indicators of genetic damage in maternal and foetal cells *Mutat Res*, 16:47-52

**Heringová L**, Dostal M y Jelínek R 1998 Cell-cycle alterations within chick embryonic anlagen after cyclophosphamide treatment. *Teratogen. Carcinog. Mutagen.*, 18:63-72

**Hogan B**, Constantini F y Lacy E 1986. Manipulating the mouse embryo, a laboratory manual. Cold Spring harbor laboratory U S A pp. 323

**Holmstrom M** 1990 Induction of micronuclei in bone marrow of mice exposed to 1, 2 or 3 daily doses of urethane. *Mutat Res*, 234:147-154

**Honkakoski P**, Kojo A y Lang M A 1992 Regulation of mouse liver cytochrome P450 2B subfamily by sex hormones and phenobarbital. *Biochem. J*, 285:979-983

**Hsu L Y F** y Hirschhorn K 1977 Numerical and structural chromosome abnormalities. In: Wilson J. G y Fraser C (eds) "Handbook of Teratology", Vol. 2 New York Plenum Press pp. 41-79

**Hulla J E** y Juchau M. R 1989 Occurrence and inducibility of cytochrome P450IIIA in maternal and fetal rats during prenatal development. *Biochemistry*, 28:4871-4873

**Huttner E** 1992 Analysis of HPRT-deficient lymphocytes in mouse (spleen) and man (peripheral blood) *Mutagenesis*, 7:160-163

**IARC** 1987 Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Vol. 26: Some Antineoplastic and immunosuppressive agents. International Agency for research on cancer Lyon pp. 165-202.

**Ingalls T H**, Ingenito E. F y Curle F J 1963. Acquired chromosomal anomalies induced in mice by injection of a teratogen in pregnancy. *Science*, 141:810-812

**Inui N**, Nishi Y y Taketomi M 1978 Mutagenic effect of orally given AF-2 on embryonic cells in pregnant Syrian hamsters *Mutat Res*, 57:69-75

- Jannetti R A y Anderson L M** 1981 Dimethylnitrosamine demethylase activity in fetal, suckling, and maternal mouse liver and its transplacental and transmammary induction by polychlorinated biophenyls. *J. Natl. Cancer Inst.*, 67:461-466
- Jao J Y, Jusko W J y Cohen J L** 1972 Phenobarbital effects on cyclophosphamide pharmacokinetics in man. *Cancer Res*, 32:2761-2764
- Jenkinson P. C y Anderson D** 1990 Malformed fetuses and karyotype abnormalities in the offspring of cyclophosphamide and allyl alcohol-treated male rats. *Mutat. Res.*, 229:173-184
- Jenkinson P. C, Anderson D y Gangolli S D** 1987 Increased incidence of abnormal fetuses in the offspring of cyclophosphamide-treated male mice. *Mutat. Res.*, 188:57-62.
- Joffe J M** 1979 Influence of drug exposure of the father on perinatal outcome. *Clin. Perinatol.*, 6:21-36
- Joffe J M y Soyka L F** 1981. Effects of drug exposure on male reproductive process and progeny. *Peridicum Biologorum* 83:351-362.
- Johannisson R y Ocker H** 1997 Cyclophosphamide-induced aberrations of chromosome pairing in pachytene oocytes. *Mutat. Res.*, 374:185-192
- Kachel L. D. y Martin II W J** 1994. Cyclophosphamide-induced lung toxicity: Mechanism of endothelial cell injury. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 268: 42-46.
- Kanekal S y Kehrer J. P** 1993 Metabolism of cyclophosphamide by lipoxygenases. *Drug Metab Dispos.*, 22:74-78
- Kato R y Yamazoe Y** 1992 Sex-specific cytochrome P450 as a cause of sex and species-related differences in drug toxicity. *Toxicol. Lett.*, 65:661-667
- Kelly M. S., Robaire B. y Hales F. B** 1994. Paternal Cyclophosphamide exposure Causes Decreased cell proliferation in cleavage-stage embryos. *Biol. Reprod.*, 50:55-64
- King M. T. y Wild D** 1979 Transplacental mutagenesis: The micronucleus test on fetal mouse blood. *Hum. Genet.*, 51:183-194
- Kola I y Folb P. I** 1985. The effects of cyclophosphamide on alkaline phosphatase activity and in vitro post-implantation murine blastocysts development. *Dev. Growth. Differ.*, 27:645-651
- Kola I, Folb P y Parker I M** 1986. Maternal administration of cyclophosphamide induces chromosomal aberrations and inhibits cell number, histone synthesis, and DNA synthesis in preimplantation mouse embryos. *Teratogen. Carcinog. Mutagen.*, 6:115-127
- Kola I, Vogel R y Spielman H** 1989 Co-administration of ascorbic acid with cyclophosphamide (CPA) to pregnant mice inhibits the Clastogenic activity of CPA in preimplantation murine blastocysts. *Mutagenesis*, 4:297-301

- Kram D , Bynum G D , Senula G. C. y Scheneider E L. 1979 In utero sister chromatid exchange analysis for detection of transplacental mutagens. *Nature*, 279:531-535.
- Kram D , Bynum G D., Senula G. C. , Bickings C K y Schneider E L. 1980. In utero analysis of sister chromatid exchange: Alterations in susceptibility to mutagenic damage as a function of fetal cell type and gestational age. *Proc Natl. Acade Sci. USA.*, 77:4784-4787
- Kraner J.C., Morgan E T., Poet T S., Born S.L., Burnett V L y Halpert J.R. 1996 Suppression of Rat Hepatic Microsomal Cytochromes P450 by Cyclophosphamide is Correlated with Plasma Thyroid Hormone Levels and Displays Differential Strain Sensitivity. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* , 276: 258-264.
- Krishna G , Nath J., Petersen M. y Ong T. 1986 A Comparison of Baseline and Cyclophosphamide-Induce Sister Chromatid Exchanges in Bone Marrow and Spleen Cells of Mouse and Chinese Hamster. *Environmental Mutagenesis* , 8:449-459
- Krishna G , Kropko L. M., Ciaravino V y Theiss C. J. 1991 Simultaneous micronucleus and chromosome aberration assessment in the rat. *Mutat. Res* , 264:29-35
- Krishna G , Urda G y Theis J C. 1994 Comparative mouse micronucleus evaluation in bone marrow and spleen using immunofluorescence and Wright's Giemsa. *Mutat. Res* , 323:11-20
- Ku R H y Billings R. E. 1986 The role of mitochondrial glutathione and cellular protein sulfhydryls in formaldehyde toxicity in glutathione depleted rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* , 247:183-189.
- Kulkarni P A. 1997 Role of Xenobiotic metabolism in developmental toxicity. In: Hood D R. (ed) Handbook of Developmental Toxicology. CRC Press New York, U S A. pp 383-421
- Lähdtie J. 1988. Induction and survival of micronuclei in rat spermatids. Comparison of two meiotic micronucleus techniques using cyclophosphamide. *Mutat. Res* , 203:47-53
- Lambert G. H. Lietz H W. y Kotake A N. 1987 Effects of pregnancy on the cytochrome P450 system in mice. *Biochem. Pharmacol.* , 36:1965-1972
- Laposa R R y Wells P G. 1995. Preliminary evaluation of phenytoin teratogenicity in transgenic mice deficient in the p53 tumor suppressor gene. *Toxicologist* , 15:161-163
- Laposa R L., Chan K. C., Willey M J. y Wells P. G. 1996. Enhanced phenytoin embryopathy in p53-deficient mice: characterization of embryonic p53 genotype and the p53 genotype and the p53, p21 and Bax DNA damage response proteins. *Toxicologist*, 16:997-999
- Lear L. Nation R. L. y Stupans I. 1992 Effects of cyclophosphamide and adriamycin on rat hepatic microsomal glucuronidation and lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol.* , 44:747-753.

**Little S. A.** y **Mirkes P. E.** 1987 DNA crosslinking and single-strand breaks induced by teratogenic concentrations of 4-hydroperoxycyclophosphamide and phosphoramidate mustard in postimplantation rat embryos *Cancer Res* , 47: 5421-5426

**Little A. S.** y **Mirkes E. P.** 1990 Relationship of DNA damage and embryotoxicity induced by 4-hydroperoxydechlorocyclophosphamide in postimplantation rat embryos *Teratology* , 41:223-231.

**Little A. S.** y **Mirkes E. P.** 1992 Effects of 4-hydroperoxycyclophosphamide (4-OOH-CP) and 4-hydroperoxydechlorocyclophosphamide (4-OOH-deCICP) o the cell cycle of post implantation rat embryos. *Teratology* , 45:63-173

**Liu L.** y **Wells P. G.** 1995 DNA oxidation as a potential molecular mechanism mediating drug-induced birth defects: phenytoin and structurally related teratogens initiate the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in vitro and in vivo in murine maternal hepatic and embryonic tissues *Free Rad Bio Med* , 19:639-648

**Lois P.** e **Izquierdo L.** 1984 Cell membrane regionalization and cytoplasm polarization in the rat early embryos *Roux's Arch Dev Biol* , 193:205-210

**Lucier G. W.** **Sonawane B. R.** **McDaniel O. S.** y **Hook G. E. R.** 1975 Postnatal stimulation of hepatic microsomal enzymes following administration of TCDD to pregnant rats. *Chem Biol Interact.* , 11:15-18

**Lu L. J.** **Anderson L. M.** , **Jones A. B.** , **Moskal T. J.** , **Salazar J. J.** , **Hokanson J. A.** y **Rice J. M.** 1993 Persistence, gestation stage-dependent formation and interrelationship of benzo[a]pyrene-induced DNA adducts in mother's placentae and fetuses of erythrocebus patas monkeys *Carcinogenesis* , 14:1805-1813

**Lutz D.** , **Eder E.** **Neudecker T.** y **Henschler D.** 1982 Structure-mutagenicity relationship in  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonylic compounds and their corresponding allylic alcohols. *Mutat Res* , 93:305-315.

**Manson J. M.** 1981. Developmental toxicity of alkylating agents: mechanism of action. In: **Jachau M. R.** (ed) The Biochemical Basis of Chemical Teratogens. Amsterdam: Elsevier, pp 95-135

**Manson J. M.** , **Papa L.** , **Miller M. L.** , y **Boyd** 1982 Studies of DNA damage and cell death in embryonic limb buds induced by teratogenic exposure to cyclophosphamide *Teratogen Carcinog Mutagen* , 2:47-60.

**Matsuda Y.** , **Yamada T.** , **Tobari I.** y **Ohkawa A.** 1983. Preliminary study on chromosomal aberrations in eggs of mice fertilized in vitro after X-irradiation. *Mutat. Res.* , 121:125-130

**Mathews M. S.** y **Devi K. S.** 1994 Effect of chronic exposure of pregnant rats to malathion and or estrogen and or progesterone on xenobiotic metabolizing enzymes *Pestic. Biochem Physiol* , 48:110-122



**McClure M T y Stupans I** 1995. Hormonal perturbation as a possible mechanism for the alteration of cytochrome P450 by cyclophosphamide. *Biochem Pharmacol*, 49:1827-1836.

**Meyne J y Legator M S** 1983. Clastogenic effects of transplacental exposure of mouse embryos to nitrogen mustard or cyclophosphamide. *Teratogen. Carcinog. Mutagen*, 3:281-287

**Miller M S, Warner S P, Jorquera R, castonguay A y Schuller H M** 1992. Expression of the cytochrome P-450E and 2B gene families in the lungs and livers of nonpregnant, pregnant and fetal hamsters. *Biochem Pharmacol*, 44:797-799.

**Mirkes P E** 1985. Cyclophosphamide teratogenesis: A review. *Teratogen. Carcinog. Mutagen*, 5:75-88

**Mirkes P E, Fantel A G, Greenaway J C y Shepard T. H.** 1981. Teratogenicity of cyclophosphamide metabolites: phosphoramidate mustard, acrolein and 4-ketocyclophosphamide in rat embryos culture in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol*, 58:322-330.

**Mirkes E P, Doggett B y Cornel L** 1994. Induction of a Heat Shock Response (HSP 72) in rat embryos exposed to selected chemical teratogens. *Teratology*, 49:135-142

**Mirkes E P, Wilson L K y Cornel M L** 2000. Teratogen-Induced Activation of ERK, JNK, and p38 MAP Kinases in Early Postimplantation Murine Embryos. *Teratology*, 62:14-25

**Moore K. L.** 1982. Causes of congenital malformations: Human teratology in the developing human. B Saunders Company 3er ed Toronto pp 140-162

**Moore M J.** 1991. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. *Clin Pharmacokinet*, 20:194-208.

**Moreland F M, Sheu C W, Springer J A y Green S** 1981. Effects of prolonged chemical treatment with cyclophosphamide and 6-mercaptopurine in the dominant lethal test system. *Mutat Res*, 90:193-199.

**Müller L.** 1988. Micronucleus induction in mouse and rat fetuses treated transplacentally during histogénesis with mitomycin C and 7, 12- dimethylbenz(a)anthracene. *Teratogen Carcinog Mutagen*, 8:303-313.

**Mulnard J. G. y Huygens R** 1978. Ultrastructural localization of non-specific alkaline phosphatase during cleavage and blastocysts formation in the mouse. *J. Embryol. Exp Morphol*, 44:121-131

**Murthy V V, Becker B A y Steele W J** 1973. Effects of dosage, phenobarbital and 2-diethylaminoethyl-2, 2-diphenylvalerate on the binding of cyclophosphamide and/or its metabolites to the DNA, RNA and protein of the embryo and liver in pregnant mice. *Cancer Res*, 33:664-670

Musilova J, Michalova K y Urban J 1979. Sister-chromatid exchanges and chromosomal breakage in patients treated with cytostatics. *Mutat Res*, 67:289-294.

Narod S. A., Douglas G. R., Nestmann E. R y Blakey D. H. 1988. Human mutagens: Evidence from paternal exposure. *Environ. Mol. Mutagen.*, 11:401-415.

Neale M y Parke D. V. 1973. Effect of pregnancy on metabolism of drugs in the rat and rabbit. *Biochem Pharmacol.*, 22:1451-1455.

Nelson B. K., Moorman W. J. y Schrader S. M. 1996. Review of experimental male-mediated behavioral and neurochemical disorders. *Neurotoxicol. Teratol.*, 18:611-616.

Nicholson H. O. 1968. Cytotoxic drugs in pregnancy. *J. Obstet. Gynecol. Br. Com.*, 75:307-312.

Nicol C. J., Harrison M. L., Laposa R. R., Gimelshtein I. L. y Wells P. G. 1995. A Teratologic suppressor role for p53 in benzo[a]pyrene-treated transgenic p53-deficient mice. *Nature Genet.*, 10:181-187.

Ning H., Kado N. Y., Kuzmicky P. A. y Hsieh D. P. H. 1991. Benzene-induced micronuclei formation in mouse fetal liver blood, peripheral blood and maternal bone marrow cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 18:1-5.

Nomura T., Tanaka S., Kurokawa N., Shibata K., Nakajima H., Kurishita A., Hongyo T. y Ishii Y. 1996. Cytogenotoxicities of sublimed urethane gas to the mouse embryo. *Mutat Res*, 368:59-64.

Nordberg, G. F., Parizek J., Pershagen G. y Gerhardsson L. 1986. Factors influencing effects and dose-response relationships of metals. In: Friberg L., Nordberg G. F. y Vouk V. B. (eds) Handbook on the Toxicology of Metals Vol. 1, Elsevier Science Publishers, New York., pp. 175-205.

Novotná B. y Jelínek R. 1986. A comparison of mutagenic and embryotoxic effects of cyclophosphamide on the Chick embryo. *Environ. Mutagen.*, 8:241-252.

Novotná B. y Jelínek R. 1990. Mutagenic and teratogenic effects of cyclophosphamide on the chick embryo: Chromosomal aberrations and cell proliferation in affected and unaffected tissues. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, 10:341-350.

Odagiri Y., Takemoto K. y Fenech M. 1994. Micronucleus Induction in Cytokinesis-Blocked Mouse Bone Marrow Cells In Vitro Following In Vivo Exposure to X-Irradiation and Cyclophosphamide. *Environ. Mol. Mutagen.*, 24:61-67.

Ohno Y., Ormstad K., Ross D. y Orrenius S. 1985. Mechanism of allyl alcohol toxicity and protective effects of low molecular weight thiols studied with isolated rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 78:169-179.

Olshan A. F. y Faustman E. M. 1993. Male-mediated developmental toxicity. *Reprod. Toxicol.*, 7:191-202.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

Ornaghi F, Ferrini S, Pratt M y Giavini E. 1993. The protective effects of N-acetyl-L-cysteine against methyl mercury embryotoxicity in mice. *Fundam Appl. Toxicol.*, 20:437-445.

O'Rahilly R y Müller F. 1992 Human Embryology and Teratology. Wiley-liss, Inc. USA. pp. 319

Osimitz T G y Kulkarni A P. 1985. Hepatic microsomal oxidative metabolism of pesticides and other xenobiotics in pregnant CD-1 mice. *Pestic. Biochem Physiol.*, 23:328-330.

Pak R C K y Ecobichon D. J. 1981. The effects of pregnancy and lactation on the elimination of methadone in guinea pigs. *Drug Metab Dispos.*, 13:197-199

Pacchierotti F, Bellincampi D y Civitareale D. 1983. Cytogenetic observations, in mouse secondary spermatocytes, on numerical and structural chromosome aberrations induced by cyclophosphamide in various stages of spermatogenesis. *Mutat. Res.*, 119:177-183

Patel J M. 1987. Stimulation of cyclophosphamide-induced pulmonary microsomal lipid peroxidation by oxygen. *Toxicology*, 45:79-91.

Petkova-Bocharova T., Stoichev I I, Chernozemsky I N, Castegnaro M. y Pfohl-Leszkowicz. 1998. Formation of DNA adducts in tissues of mouse progeny through transplacental contamination and/or lactation after administration of single dose of Ochratoxin A to the pregnant mother. *Environ Mol. Mutagen.*, 32:155-162

Piersma A H, van Aerts L. A. G J M, Verhoef A, Garbis-Berkvens J. M, Robinson J E, Copius Peereboom-Stegeman J. H J y Peter P W J. 1991. Biotransformation of cyclophosphamide in post-implantation rat embryo culture using maternal hepatocytes in co-culture. *Pharmacology & Toxicology*, 69:47-51

Pillans P I, Ponzi S F y Parker M I. 1989. Cyclophosphamide induced ADN strand breaks in mouse embryo cephalic tissue in vivo. *Carcinogenesis.*, 10: 83-85.

Platzek T, Bochert G y Rahm U. 1994. Embryotoxicity induced by alkylating agents: 8 DNA adduct formation induced by ethylmethanesulfonate in mouse embryos. *Teratogen Carcinog Mutagen.*, 14:65-73.

Porter J. A. y Singh M. S. 1988. Transplacental teratogenesis and mutagenesis in mouse fetuses treated with cyclophosphamide. *Teratogen. Carcinog Mutagen.*, 8:191-203.

Qiu J, Hales F B, and Robaire B. 1995. Damage to rat spermatozoa DNA after chronic cyclophosphamide exposure. *Biol. Reprod.*, 53:1465-1473

Qumsiyeh M. B, Kim R. K, Ahmed M. N y Bradford W. 2000. Cytogenetics and mechanisms of spontaneous abortions: increased apoptosis and decreased cell proliferation in chromosomally abnormal villi. *Cytogenet Cell Genet.* 88: 230-235

Rabello-Gay M N, Carvalho M I O, Otto P A y Targa H J. 1985 The effects of age, sex and diet on the clastogenic action of cyclophosphamide in mouse bone marrow. *Mutat. Res.* 158:181-188

Rafferty J A, Clarke A R, Sellappan D, Koref M S, Frayling F M y Margison G P. 1996. Induction of murine O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase in response to ionizing radiation is p53 gene dose dependent. *Oncogene*, 12:693-697.

Raposa T. 1978. Sister chromatid exchange studies for monitoring DNA damage and repair capacity after cytostatics in vitro and in lymphocytes of leukemic patients under cytostatic therapy. *Mutat Res* , 57:241-251

Ratcliffe J M, McElhatton P R y Sullivan M Frank. 1993 Reproductive Toxicity. In: Ballantyne B, Marrs T y Turner P. (eds) General and Applied Toxicology, Stockton press pp. 994-1000.

Robaire B y Hales B F. 1993. Paternal exposure to chemical before conceptions: some children may be at risk. *Br. Med. J* , 307:341-342.

Robaire B y Hales B F. 1994. Post-testicular mechanisms of male-mediated developmental toxicity. In: Olshan A F and Mattison D R (eds) Male-Mediated developmental toxicity. Plenum Press, New York

Robertson R G, Farrell C G y Liddle C. 1998 Sexually Dimorphic expression of rat CYP3A9 and CYP3A18 genes is regulated by growth hormone. *Biochem. Biophys Res Commun* 242:57-60

Röhrborn G y Bucker U. 1976. Investigations on the frequency of chromosome aberrations in bone marrow cells of Chinese hamsters after simultaneous application of caffeine and cyclophosphamide. *Hum Genet* , 33:113-119

Röhrborn G y Basler A. 1977. Cytogenetic investigations of mammals, comparison of the genetic activity of cytostatics in mammals. *Arch Toxicol.*, 38:35-43

Ruckpaul K. y Rein H. 1990. Frontiers of biotransformation. Principles, Mechanisms and Biological Consequences of induction Vol II Londres

Russell L B y Shelby M. D. 1985. Tests for heritable genetic damage and for evidence of gonadal exposure in mammals. *Mutat Res* 154:69-84

Russell L B, Shelby P. B, Von Halle E, Sheridan W y Valcovic L. 1981. The mouse specific-locus test with agents other than radiations: Interpretation of data and recommendations for future work. *Mutat Res* 86:329-354.

Saillenfait A. M, Payan J P, Langonne I, Beydon, D, Grandelaude M. C, Sabate J P y Ceaurriz J. 1993. Modulation of acrylonitrile-induced embryotoxicity in vitro by glutathione depletion. *Arch Toxicol* , 67:164-172.

Savitz D. A y Chen J. 1990. Paternal occupational and childhood cancer: Review of epidemiologic studies. *Environ Health Perspect* , 88:325-337

Sawyer E D y Brown B. D 2000. Diminished decondensation and DNA synthesis in activated sperm from rats treated with cyclophosphamide. *Toxicol Lett* 114:19-26.

Semler E. D., Gad C. S. y Chengelis P C 1992 The rat In: Gad C. S y Chengelis (eds) Animal Models in Toxicology. Marcell Dekker inc New York U:S:A pg: 21-103.

Sessink P.J. M, Vaes W H J , Van den Broek P H H., de Roos J H C., Noordhoek J , y Bos R.P. 1996. Influence of Aroclor 1254, phenobarbital, (b-naphthoflavone, and ethanol pretreatment on the biotransformation of cyclophosphamide in male and female rats. *Toxicology*, 112:141-150

Schlede E y Borowski R 1974. Decreased effect of phenobarbital treatment on microsomal drug metabolizing enzyme activity during gestation *Arch Pharmacol* 281:341-347

Schleiermacher E 1968 Chemical mutagenesis in mammals and man II. Cytological effects of radiomimetic drugs in meiosis in the male mouse *Jap J Genet.* 44:80-81.

Schuler D , Dobos M, Fkete G , Kiltenyi y Kalmar L 1979. Chromosome mutations and chromosome stability in children treated with different regimes of immunospressive drugs. *Human. Hered* 29:100-105

Scialli R A 1992 A clinical guide to reproductive and developmental toxicology, CRC Press Inc., U S.A. pp. 284

Shelby M. D 1996 Selecting chemicals and assays for assessing mammalian germ cells mutagenicity. *Mutat. Res.*, 352: 159-167

Shimada M, Murayama N, Nagata K, Hashimoto H., Ishikawa H y Yamazoe Y. 1997. A specific loss of growth hormone abolished sex-dependent expression of hepatic cytochrome P450 in dwarf rats: reversal of the profiles by growth hormone-treatment., *Arch Biochem Biophys* 337: 34-42

Short R. D y Gibson J. E. 1974 Alkylation of embryonic molecules *Proc. Soc Exp Biol Med.* 145:620-624

Sieber S M, Whan-Peng J , y Adamson R. H 1974 Teratogenic and cytogenetic effects of hycanthone in mice and rabbits *Teratology*, 10:227-236.

Skare J. A y Schrotel K R 1984. Alkaline elution of rat testicular DNA: Detection of DNA cross-links after in vivo treatment with chemical mutagens. *Mutat Res* , 130:295-303

Slott V. L y Hales B F. 1987 Enhancement of the embryotoxicity of acrolein, but not phosphoramidate mustard by glutathione depletion in rat embryos in vitro. *Biochem. Pharmacol*, 36: 2019-2025

Sokal J E y Lessmann E M. 1960 Effects of cancer chemotherapeutic agents on the human fetus *J A M A* 172(16):1765-1772

Sorsa M, Pyv L, Salomaa S, Nylund L y Yager J W. 1988. Biological and environmental monitoring of occupational exposure to cyclophosphamide in industry and hospitals. *Mutat Res*, 204:465-479

Sotomayor R. E y Cumming R. B 1975 Induction of translocations by cyclophosphamide in different germ cell stages of male mice: Cytological characterization and transmission. *Mutat. Res.*, 27:375:388.

Sotomayor R E., Sega G A. y Cumming R B. 1978 Unscheduled DNA synthesis in spermatogenic cells of mice treated in vivo with the indirect alkylating agents cyclophosphamide and mitomen. *Mutat. Res*, 50:229-240

Soukup S. V, Takacs E. y Warkany J 1965. Chromosome changes in rat embryos following X-irradiation *Cytogenetics*, 4:130-144

Soukup S V, Takacs E. y Warkany J 1967. Chromosome changes in embryos treated with various teratogens *J Embryol Exp. Morphol*, 18:215-226.

Soyka L F y Joffe J. M. 1980. Male mediated drug effects on offspring In: Schwarz R H and Yaffe S J. (eds) Progress in Clinical Risk to the Fetus and Newborn Alan R. Liss New York. Pp 49-66

Spielmann H y Vogel R. 1987 Transfer of drugs into the embryo before and during implantation. In: Nau H and Scott J W (eds) Pharmacokinetics in Teratogenesis Vol 1: Interspecies comparison and maternal/embryonic fetal drug transfer. CRC Press. Inc pp 45-53.

Srám R J. 1976 Relationship between acute and chronic exposures in mutagenicity studies in mice *Mutat Res*. 41:25-42.

Srám R J., Zhurkov V. S., Novakova J. y Kovytkova I 1981 Change in the frequency of chromosome aberrations in the bone marrow of mice examined at various intervals after a single dose or continuous exposure to cyclophosphamide. *Folia Biol*, 27:58-64.

Struck R. F., Dykes D J., Corbett T. H., Suling J W y Trader M. W 1983. Isophosphamide mustard, a metabolite of ifosfamide with activity against murine tumors comparable to cyclophosphamide *Br J Cancer*, 47:15-26

Struck F R., Schmid M S y Waud R W. 1994. Antitumor activity of halogen analogs of phosphoramidate, isophosphoramidate, and triphosphoramidate mustards, the cytotoxic metabolites of cyclophosphamide, ifosfamide, and trofosfamide. *Cancer Chemother Pharmacol.*, 34:191-196

Symons A M, Turcan R. C. y Parke D V. 1982 Hepatic drug metabolism in pregnant rat *Xenobiotica*, 12: 365.

Szabo T K 1989. Congenital malformations in laboratory and farm animals. Academic press inc p 313

**Tabei T.** y **Heinrichs W L** 1976 Hepatic steroid hydroxylase and aminopyrine N-demethylase activities in pregnant rats and rabbits, and the effect of phenobarbital. *Biochem. Pharmacol.* 25:2099

**Takehara Y**, **Yoshioka T** y **Sasaki J** 1990. Changes in the levels of lipoperoxide and antioxidante factors in human placenta during gestation *Acta Med Okayama.*, 44:103-111

**Tasso M. J.**, **Boddy A. V.**, **Wylie R. A.**, **Pearson A. D. J.** y **Idle J. R.** 1992 Pharmacokinetics and metabolism of cyclophosphamide in pediatric patients. *Cancer Chemother Pharmacol.* 30: 207-211.

**Theiss I**, **Basler A** y **Röhrborn G** 1983. Transplacental and direct exposure of mouse and marmoset to ethylnitrosourea: Analysis of chromosome aberrations *Teratogen Carcinog Mutagen*, 3:219-230

**Timbrell A J** 1993 Biotransformation of Xenobiotics, In **Ballantyne B.**, **Marrs T** and **Turner P.** (eds) General & Applied Toxicology, Vol. 1. Stockton Press, New York, USA pp 89-119

**Titenko-Holland N**, **Ahlborn T.**, **Lowe X.**, **Shang N.**, **Smith T M** y **Wyrobek J** 1998 Micronuclei and developmental abnormalities in 4-day mouse embryos after paternal treatment with acrylamide *Environ Mol Mutagen*, 31:206-217

**Tiveron C**, **Ranaldi R**, **Bassani B** y **Pacchierotti F** 1997. Induction and transmission of chromosome aberrations in mouse oocytes after treatment with butadiene diepoxide. *Environ. Mol Mutagen*, 30:403-409.

**Toledo T M.**, **Harper R C.** y **Moses R. H.** 1971 Fetal effects during cyclophosphamide and irradiation therapy *Ann Intern Med.* 74:87-91

**Topham J C.** 1980 The detection of carcinogen-induced sperm head abnormalities in mice *Mutat Res*, 69:149-155

**Torchinsky A**, **Savion S**, **Gorivodsky M.**, **Shepshelovich J**, **Zaslavsky Z**, **Fein A.** y **Toder V** 1995. Cyclophosphamide-Induced teratogenesis in ICR mice: The role of apoptosis. *Teratogen Carcinog Mutagen*, 15:179-190.

**Torchinsky A.**, **Ivnitsky I**, **Savion S.**, **Shepshelovich J.**, **Gorivodsky M.**, **Fein A.**, **Carp H.**, **Schwartz D.**, **Frankel J.**, **Rotter V.** y **Toder V** 1999 Cellular events and the pattern of p53 protein expression following cyclophosphamide-initiated cell death in various organs of developing embryo *Teratogen Carcinog Mutagen*, 19: 353-367

**Trasler J M.**, **Hales B F.** y **Robaire.** 1986 Chronic low dose cyclophosphamide treatment of adult male rats: effects on fertility, pregnancy outcome and progeny *Biol. Reprod*, 34:275-283

**Trasler J M.**, **Hales B F.** y **Robaire B** 1987 A time-course study of chronic paternal cyclophosphamide treatment of rats: Effects on pregnancy outcome and the male reproductive and hematology systems. *Biol Reprod*, 37:317-326

**Turcan R G** , Tumburini P P , Gibson G G , Parke D V y Symons A M. 1981 Drug metabolism, cytochrome P-450 spin state, and phospholipid changes during pregnancy in the rat *Biochem Pharmacol* , 30:1223-1229

**Tyl W R** 1993 *Developmental Toxicology* In: Ballantyne B , Marrs T and Turner P. (eds) General and Applied Toxicology. Vol 2, Stockton Press New York. USA Pp 1021-1046

**Umpierre C C** , Little A S y Mirkes E P. 2001. Co-localization of active Caspase-3 and DNA Fragmentation (TUNEL) in normal and hyperthermia-Induced Abnormal Mouse development *Teratology*, 63:134-143

**Vinson K R** y Hales B F 2001. Nucleotide excision repair gene expression in the rat conceptus during organogenesis , *Mutat Res* , 486: 113-123

**Vodicnik M J** , Elcombe C R y Lech J J. 1980 The transfer of 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl to fetuses and nursing offspring II. Induction of hepatic microsomal monooxygenase activity in pregnant and lactating mice and their young. *Toxicol Appl Pharmacol* 54:301.

**Vogel R** y Spielmann H 1986. Increased chromatid exchange frequency in preimplantation mouse embryos after maternal cyclophosphamide treatment before implantation *Toxicol Lett* , 32:81-88

**Vogel R** Kruger C , Granata I y Spielmann H. 1985. Development and sister chromatid exchange of mouse morulae and blastocysts cultured in rat serum containing active metabolites of cyclophosphamide *Toxicol Lett* , 28:23-28

**Warner M** , Stromstedt M , Wyss A y Gustafsson J A 1993 Regulation of cytochrome P450 in the central nervous system *J Steroid Biochem Mol Biol* , 47:191-194

**Watanabe S** y Kamiguchi Y 2001 Chromosome analysis of human spermatozoa following in vitro exposure to cyclophosphamide, benzo(a)pyrene and N-nitrosodimethylamine in the presence of rat liver S9 *Mutat Res* , 491:57-63

**Waters D. M** y Nolan C 1995 EC/US workshop report: assessment of genetic risks associates with exposure to ethylene oxide, acrylamide, 1,3-butadiene and cyclophosphamide. *Mutat Res* , 330:1-11.

**Weber G. F** y Waxman D J 1993 Activation of the anti-cancer drug ifosfamide by rat liver microsomal P450 enzymes *Biochem Pharmacol* , 45:1685-1694

**Wei M X** , Tamiya T , Chase M , Boviatsis E J , Chang T. K , Kowali N. W , Hochberg F H , Waxman D. J , Breakefield X O y Chiocca E A. 1994. Experimental tumor therapy in mice using the cyclophosphamide-activating cytochrome P450 2B1 gene *Hum. Gene Ther* , 5:969:978

**Weibe V J** y Sipila P E 1994 Pharmacology of antineoplastic agents in pregnancy *Crit Rev Oncol Hematol* , 16:75-112



**Wells G. P** y **Winn M. L.** 1996. Biochemical toxicology of chemical Teratogenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 31(1):1-40

**Wells P. G.**, **Kim P. M.**, **Laposa R. R.**, **Nicol C. J.**, **Parman T.** y **Winn L. M.** 1997. Oxidative damage in chemical teratogenesis. *Mutat Res*, 396:65-78.

**Williams D. E.**, **Hale S. E.**, **Okita R. T.** y **Master B. S.** 1984. A prostaglandin w-hydroxylase cytochrome P450 (P-450 PG-w) purified from lungs of pregnant rabbits. *J. Bio Chem*, 259:1460-1465

**Wilson G. J.** 1977. Current status of teratology. General principles and mechanisms derived from animal studies. In: **Wilson G. J.** and **Fraser C. F.** (eds). Handbook of teratology. Vol 1. General principles and etiology. Plenum Press. New York U. S. A.

**Working P. K.** 1989. Germ Cell genotoxicity: Methods for assessment of DNA damage and mutagenesis. In **Working P. K.** (ed) Toxicology of male and female reproductive systems. Hemisphere Publishing Corp. New York. pp 231-255.

**Wubah J. A.**, **Ibrahim M. M.**, **Gao X.**, **Nguyen D.**, **Pisano M. M.** y **Knudsen T. B.** 1996. Teratogen-induced eye defects mediated by p53-dependent apoptosis. *Curr Biol*, 6:60-69

**Wyrobek A. J.** 1993. Methods and concepts in detecting abnormal reproductive outcomes of paternal origin. *Reprod Toxicol*, 7:3-16

**Wyrobek A. J.**, **Gordon L. A.**, **Burkhart J. G.**, **Francis M. C.**, **Kapp R. W.**, **Letz G.**, **Malling H. V.**, **Topham J. C.** y **Whorton M. D.** 1983. An evaluation of the mouse sperm morphology test and other sperm tests in non-human mammals: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene Tox Program. *Mutat. Res*, 115:1-72

**Xing G. S.**, **Shi X.**, **Wu Z. L.**, **Chen K. J.**, **Wallaow W.**, **Whong W. Z.** y **Ong T.** 1992. Transplacental genotoxicity of triethylenemelamine, benzene, and vinblastine in mice. *Teratogen Carcinog Mutagen*, 12:223-230.

**Zakeri F. Z.** y **Ahuja S. H.** 1997. Cell death/apoptosis: normal, chemically induced, and teratogenic effect. *Mutat. Res*, 396:149-161

**Zakrzewski F. S.** 1991. Principles of Environmental Toxicology. ACS Professional Reference Book, Washington, D.C. USA, pp. 56-65

**Zemlickis D.**, **Lishner M.**, **Erllich R.** y **Koren G.** 1993. Teratogenicity and Carcinogenicity in a Twin Exposed in Utero to Cyclophosphamide. *Teratogen. Carcinog Mutagen*. 13:139-143

La siguiente publicación fue obtenida durante el desarrollo de este trabajo.

# Differential response to induction of chromosomal aberrations between female and male mice treated with a low dose of cyclophosphamide

L. Alvarez-Barrera and M. Altamirano-Lozano

*Laboratorio de Citogenética, Mutagénesis y Toxicología Reproductiva, Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, Bioterio-Campo II, Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 9-020, CP 15000 México DF, México*

Requests for reprints to Lucila Alvarez-Barrera, Laboratorio de Citogenética, Mutagénesis y Toxicología Reproductiva, Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, Bioterio-Campo II, Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 9-020, CP 15000 México DF, México. Tel: +525 623-07-06; fax: +525 745-82-46. E-mail: maal@servidor.unam.mx

Received 10 November 1998; revised 18 December 1998  
accepted 25 January 1999

**Abstract:** We have assessed the mitotic index and induction of chromosomal aberrations produced by the administration of a single low dose of cyclophosphamide (CP) to male, non-pregnant female and pregnant female of CD-1 strain mice. The aim of the study was to evaluate the differences in response between sexes of the same species (mice) and between individuals of the same sex (females) treated with this compound. CP administration increased the frequency of chromosomal aberrations significantly in both sexes. However, there was a clear difference in sensitivity between the sexes, since the effects of CP were more pronounced in males than in females, while pregnant mice showed fewer chromosomal aberrations than those not pregnant. The differences found in this study were probably due to differences in the enzyme system responsible for the metabolism of CP and its interaction with the hormonal environment of each sex.

Med Sci Res 27:193-196 © 1999 Lippincott Williams & Wilkins

**Keywords:** chromosomal aberrations, cyclophosphamide, *in vivo* mutagenicity, sex differences

**Introduction:** One of the most important characteristics in assessing the toxicological and genotoxic effects of environmental chemical compounds is the great diversity of responses that may be found between exposed individuals of different species, both *in vivo* as well as *in vitro*, to a single agent [1]. However, in some cases there are differences in responses between individuals of the same species and even between sexes. This type of response is known as individual sensitivity [2].

There are few reports on differences in sensitivity in the response to a single mutagenic agent between females and males of the same species. For example, the clastogenic effect of 2-acetylaminofluorene (2-AAF) and of benzene was greater in the male mouse than in females [3,4]. On the other hand, when the micronuclei (MN) test was used

female mice were more sensitive than males [5,6] to ethylmethanesulfonate (EMS) and hycanthone methanesulfonate. On the other hand for 2-AAF, benzene, benzo(a)pyrene (B(a)P), aflatoxin B1 (AFB1) and 7,12 dimethylbenzanthracene (DMBA), there was a greater increase in MN in male in comparison to female mice [7]. Only one chemical compound, bis(tri-n-butyltin)oxide, has produced positive results in one sex and negative results in the other [8].

Cyclophosphamide (CP) is a bifunctional alkylating agent used in chemotherapy. It is a known mutagenic and carcinogenic compound in humans and rodents [9], which produces different effects depending on the sensitivity of the exposed species. For example, the rat was more sensitive than the mouse when the frequencies of sister chromatid exchanges (SCE), MN and sperm abnormalities were assessed [10-12].

With respect to differences in the response to CP between females and males of one same species, reports are few and in some instances, contradictory. Among rodent species, the male rat is more sensitive than the female [13,14]. However, in different strains of mice, when MN induction was assessed with 20 clastogens, among them CP, this compound induced the same response in both sexes [7]. Yet Krishna and Urda [15] reported clear differences between mouse sexes when treated with CP. On the other hand, no differences have been reported with respect to the frequency of chromosomal aberrations (CA) between mouse sexes treated with CP.

In the majority of the cases, the observed variations have been related to differences in the physiological conditions that may alter agent responses [16]. An example is pregnancy, which can cause changes in sensitivity to diverse factors. Beliles [17] showed that intravenous exposure to colchicine, chlorpromazine or iron dextrin was much more toxic for pregnant mice than for non-pregnant mice, while oral exposure to aspirin was correspondingly less toxic.

In many cases, evidence on the differential response of male and female mice treated with CP (with respect to CA), is weak and contradictory. Additionally these differences can be caused by changes in physiological differences. We conducted the current study to assess the clastogenic effect of a single low dose of CP intraperitoneally (ip) administered to male and pregnant and non-pregnant female CD-1 strain mice.

**Materials and methods:** 2- to 3-month old, 25-30 g CD-1 male and female mice were obtained from our own stock. They were housed and kept under controlled conditions in groups of four in polypropylene cages with a wire lid and

wood shaving bedding and fed rat chow and water *ad libitum*. One group of four female mice were paired (1:1) with mature males of the same strain. Successful copulation was presumed to have occurred if a copulation plug and/or sperm was present at the end of the mating period (day 0 of gestation).

Cyclophosphamide (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA; CAS No. 50-18-0) was prepared in distilled water and immediately injected ip in four male and non-pregnant female mice in an appropriate volume containing 10 mg/kg body weight. On the other hand, four pregnant females were injected ip with a single dose of CP (10 mg/kg b.wt.) on day 10 of pregnancy. Negative control animals (four males, four non-pregnant females and four pregnant females) received an equal volume of distilled water.

22 hours after treatment, males and non-pregnant females were injected ip with colchicine (Fisher Scientific Company, Fair Lawn, NJ, USA, 1.0 µg/g b.wt) and killed 2 h later by cervical dislocation. At autopsy, bone marrow cells from femurs were flushed with 5 ml of 0.057M KCl, pre-warmed at 37°C and fixed in methanol-acetic acid (3:1). The cell suspension was transferred onto slides and stained with Giemsa.

In order to accumulate enough metaphases for cytogenetic analysis, 24 h after treatment, pregnant females were killed by cervical dislocation and bone marrow cells from femurs were flushed with 5 ml of Hank's balanced salt solution (HBSS) pre-warmed to 37°C, containing 0.15 µg/ml of colchicine, and incubated at 37°C. 2 h later, cells were

treated with 5 ml of 0.057M KCl, pre-warmed at 37°C, and fixed in methanol acetic acid (3:1). The cell suspension was placed on slides and stained with Giemsa for analysis.

All slides were blind-coded and scored under oil immersion at 1,000×. For determining the mitotic index (MI), the ratio of the number of cells seen in mitosis to the total number present. 4,000 cells per animal were counted and 100 metaphases per animal analysed for structural chromosomal aberrations. For the assessment of chromosomal aberrations, analysis was carried out on aberrations excluding chromatid and chromosome gaps.

The MI was analysed using the 'Z' test, while the percentage of cells with aberrations and the number of aberrations per cell were analysed using ANOVA and Student's *t*-test.

**Results:** Table 1 shows the mitotic index and frequency of chromosomal aberrations in male, non-pregnant and pregnant females treated with CP. In all cases, the agent significantly decreased the MI ( $P < 0.05$ ). There were no differences in sensitivity between females and males treated with CP or between the groups of pregnant and non-pregnant female mice treated with the agent.

As shown in Table 1, CP clearly increased the frequency of cells with aberrations in both sexes. However, the percentage of cells with aberrations in treated males (26.0 ± 6.48) was higher than in the treated females (12.25 ± 3.2).

Table 1. Effects of cyclophosphamide on frequency of chromosome aberrations and mitotic index in bone marrow cells from males and females of CD-1 strain mice (means ± SD; n = 4)

Mouse no	Mitotic index (%)	No. of aberrations/100 cells							
		Total	ChmB	ChtB	ChtF	PvsC			
Control males									
1	2.8	1	0	1	0	0	0	0	0
2	2.475	0	0	0	0	0	0	0	0
3	1.75	1	0	1	0	0	0	0	0
4	2.85	1	0	1	0	0	0	0	0
	2.47 ± 0.5	0.75 ± 0.5	3	0	3	0	0	0	0
Treated males									
1	1.47	32	50	2	15	25	8	0	0
2	1.52	29	64	0	6	44	14	0	0
3	1.50	26	36	0	10	18	8	0	0
4	1.15	17	24	0	2	15	7	0	0
	1.41 ± 0.2 <sup>a</sup>	26.0 ± 6.48 <sup>de</sup>	174	2	33	102	37	0	0
Control females									
1	2.15	0	0	0	0	0	0	0	0
2	2.30	0	0	0	0	0	0	0	0
3	2.60	1	1	0	0	1	0	0	0
4	2.50	1	1	0	1	0	0	0	0
	2.38 ± 0.2	0.5 ± 0.57	2	0	1	1	0	0	0
Treated females									
1	1.50	10	19	1	14	4	0	0	0
2	1.15	15	18	0	11	5	0	2	0
3	1.45	9.0	15	0	8	7	0	0	0
4	2.60	15	28	0	6	20	1	1	1
	1.68 ± 0.6 <sup>b</sup>	12.25 ± 3.2 <sup>ch</sup>	80	1	39	36	1	3	3
Pregnant control females									
1	2.15	0	0	0	0	0	0	0	0
2	2.50	0	0	0	0	0	0	0	0
3	3.00	2	2	0	2	0	0	0	0
4	1.65	1	1	0	1	0	0	0	0
	2.32 ± 0.57	0.75 ± 0.96	3	0	3	0	0	0	0
Pregnant treated females									
1	0.97	5	5	0	5	0	0	0	0
2	1.37	5	6	0	6	0	0	0	0
3	1.20	6	8	0	4	4	0	0	0
4	1.85	3	3	0	2	1	0	0	0
	1.35 ± 0.37 <sup>c</sup>	4.75 ± 1.26 <sup>gh</sup>	22	0	17	5	0	0	0

ChmB = chromosome breaks; ChtB = chromatid breaks; ChtF = chromatid fragments; PvsC = pulverized cells; PpIC = polyploid cells  
<sup>a</sup>As compared with control males group  $P < 0.05$  (Z test); <sup>b</sup>As compared with control females group  $P < 0.005$  (Z test); <sup>c</sup>As compared with control pregnant females group  $P < 0.005$  (Z test); <sup>d</sup>As compared with control males group  $P < 0.05$  (ANOVA and Student's *t*-test); <sup>e</sup>As compared with control females group  $P < 0.005$  (ANOVA and Student's *t*-test); <sup>f</sup>As compared with pregnant females control group  $P < 0.05$  (ANOVA and Student's *t*-test); <sup>g</sup>As compared with females treated group  $P < 0.05$  (ANOVA and Student's *t*-test); <sup>h</sup>As compared with pregnant females treated group  $P < 0.01$  (ANOVA and Student's *t*-test).

This difference in sensitivity between the sexes was statistically significant. Non-pregnant mice treated with CP showed significantly more cells with aberrations than the pregnant females treated group ( $12.25 \pm 3.2$  vs  $4.75 \pm 1.26$ ). In all cases, the types of aberrations more frequently found were breaks and chromatid-type fragments.

**Discussion:** Many studies have shown no significant differences between individuals of different sexes in parameters such as chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges [18]. In the present study we evaluated the induction of chromosomal aberrations in male mice and pregnant and non-pregnant females of CD-1 strain mice treated with a low dose of CP.

The results show a clear difference in the induction of chromosomal aberrations between male and female mice treated with CP. In the males there was an increase of more than 100% in cells with CA in comparison with females (Table 1). In previous studies, CP has been described as capable of differentially inducing MN among individuals of different sex, males being more sensitive than females. However, no differences were found with respect to the induction of chromosomal aberrations [14,15].

On the other hand, Rabello-Gay *et al.* [19], reporting an analysis of the frequency of chromosomal aberrations caused by CP in malnourished mice (fed with a protein-deficient diet), found that adult males were twice as sensitive as young or adult females. This result is in agreement with our data.

Variations in responses between males and females can be due to genetic differences in metabolism, as well as to the presence of different isoenzymes [20]. In rat livers the activities of enzymes responsible for the activation of cyclophosphamide (cytochromes P-450) are three times higher in adult males than females [21,22]. However, sex differences in mice are not consistently observed. There was no sex difference in the contents of cytochrome P-450, NADPH-cytochrome C reductase or NADPH oxidase [23,24]. Nevertheless, it is possible that our results are due to sexual differences in the enzymatic system responsible for the metabolism of CP.

In this study, we observed that CP primarily caused chromatid breaks, but in male mice it also induced a slight increase of pulverization of chromosomes. In a previous study in Wistar rats Krishna *et al.* [14] observed pulverization of chromosomes with a single dose of CP at 20 or 40 mg/kg. However, Rabello-Gay *et al.* [19] report pulverization of chromosomes of mice treated with 0.5–10 mg/kg of CP.

When we compared chromosomal aberrations induced by CP in non-pregnant females with those in pregnant females, we found significant differences. Pregnancy can influence the toxicity that a xenobiotic will induce [25]. The reason for the different toxicity is unknown, but may be hormonally based or related to altered compartmentalization of the xenobiotic [26,27]. In our case, the pregnant treated mice showed a lower frequency of cells with chromosomal aberrations than non-pregnant mice.

In laboratory animals, an increase in maternal liver weight has been reported during pregnancy, accompanied by an increase in the total production of microsomes [28]. On the other hand, several reports have described changes in the rates of hepatic microsomal cytochrome P-450-mediated xenobiotic oxidations during pregnancy [29].

Another important factor in the different response of male, female and pregnant female mice, is hormonal. Some studies indicate a relation between hormonal factors and their interaction with the P-450 cytochromes [21,30–32] since several cytochromes are hormonally regulated or are sex-specific [22,33–35]. However, it is possible that the compartmentalization of xenobiotics is modified in pregnant mice.

**Acknowledgement:** This study was supported in part by PADEP-UNAM grant no. 500301

1. Kligerman DA, Bryant FM, Doerr LC, Halperin CE, Kwanyuen P, Sontag MR *et al.* Interspecies cytogenetic comparisons: Studies with X-radiation and bleomycin sulfate. *Environ Mol Mutagen* 1992; 19: 235–243
2. National Research Council. *Environmental Epidemiology: Public Health and Hazardous Wastes*. Washington DC: National Academy Press; 1991 pp. 281.
3. Hayashi M, Sofuni T, Ishidate M. A pilot experiment for the micronucleus test. The multi-sampling at multi-dose levels method. *Mutat Res* 1984; 141:165–169.
4. Gad-El-Karim MM, Harper BL, Legator MS. Modifications in the myeloclastogenic effect of benzene in mice with toluene, phenobarbital, 3-methylcholanthrene, Aroclor 1254 and SKF-525A. *Mutat Res* 1984; 135:225–243
5. Uriando C, Heddle AJ. On the differential responsiveness of males and females in the micronucleus assay. *Mutat Res* 1990; 234:199–204
6. Kleisch U, Adler I-D. Sex differences in micronucleus induction with hycanthone methanesulfonate in bone marrow cells of mice. *Mutat Res* 1992; 283:249–253.
7. The collaborative study group for micronucleus test. Sex difference in the micronucleus test. *Mutat Res* 1986; 172:151–163.
8. Davis A, Barale R, Brun G, Forster R, Günther T, Hautefeuille CA *et al.* Evaluation of the genetic and embryotoxic effects of bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO), a broad spectrum pesticide, in multiple *in vivo* and *in vitro* short term tests. *Mutat Res* 1987; 188:65–95
9. International Agency for Research on Cancer. *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*. Vol 26. Some antineoplastic and immunosuppressive agents. Lyon: IARC; 1981.
10. Simula PA, Priestly GB. Species differences in the genotoxicity of cyclophosphamide and styrene in three *in vivo* assays. *Mutat Res* 1992; 271:49–58.
11. Krishna GN, Petersen M, Ong I. A comparison of baseline and cyclophosphamide-induced sister chromatid exchanges in bone marrow and spleen cells of mouse and Chinese hamster. *Environ Mutagen* 1986; 8:449–459
12. Andress MJ, Frith HC, Goodman GD, Boysen GB, Cook SC. The mouse. In: Gad CS, Chencelis PC. *Animal Models in Toxicology*. New York: Marcel Dekker Inc; 1992 pp 165–294.
13. Auroux M, Dulioust E, Selva J, Rince P. Cyclophosphamide in the female rat: physical and behavioural changes in three successive adult generations. *Mutat Res* 1990; 229:189–200.
14. Krishna G, Kropko LM, Ciaravino V, Theiss CJ. Simultaneous micronucleus and chromosome aberration assessment in the rat. *Mutat Res* 1991; 264:29–35.
15. Krishna G, Urda G, Theiss CJ. Comparative mouse micronucleus evaluation in bone marrow and spleen using immunofluorescence and Wright's giemsa. *Mutat Res* 1994; 323:11–20.
16. Zakrzewski SF. Factors that influence toxicity. In: Zakrzewski. *Principles of Environmental Toxicology*. Washington DC: ACS Professional Reference Book; 1991 pp. 56–65
17. Beilles RP. Influence of pregnancy on the acute toxicity of various compounds in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1972; 23:537–540.
18. Anderson D, Bishop BJ, Colin GR, Ostrosky-Wegman P, Selby BP. Cyclophosphamide: Review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. *Mutat Res* 1995; 330:115–181.
19. Rabello-Gay MN, De O Isabel, Carvalho M, Otto PA, Targa HJ. The effects of age, sex and diet on the clastogenic action of cyclophosphamide in mouse bone marrow. *Mutat Res* 1985; 158:181–188.
20. Timbrell AJ. Biotransformation of xenobiotics. In: Ballantyne B, Marrs T, Turner P. *General and Applied Toxicology*. Vol 1. New York: Stockton Press; 1993 pp 89–119

21. Kraner JC, Morgan ET, Poet TS, Born SL, Burnett VL, Halpert JR. Suppression of rat hepatic microsomal cytochromes P-450 by cyclophosphamide is correlated with plasma thyroid hormone levels and displays differential strain sensitivity. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 276:258-264.
22. Sessink PJM, Vaes HJ, Van den Broek PHH, de Roos JHC, Noordhoek J, Bos RP. Influence of Aroclor 1254, phenobarbital,  $\beta$ -naphthoflavone, and ethanol pre-treatment on the biotransformation of cyclophosphamide in male and female rats. *Toxicology* 1996; 112:141-150.
23. Cook SC. The mouse: Metabolism. In: Gad CS, Chencelis PC. *Animal Models in Toxicology*. New York: Marcel Dekker Inc; 1992. pp. 165-294.
24. Kato R. Sex-related differences in drug metabolism. *Drug Metab Rev* 1974; 3:1-32.
25. Nordberg GF, Parizek J, Pershagen G, Gerhardsson L. Factors influencing effects and dose-response relationships of metals. In: Friberg L, Nordberg F, Vouk VB. *Handbook on the Toxicology of Metals*. Vol 1. New York: Elsevier Science Publishers; 1990. pp. 175-205.
26. Burrel R, Flaherty KD, Sauer JI. *Toxicology of the Immune System: A Human Approach*. New York: Van Nostrand Reinhold; 1992. pp. 33-48.
27. Mathews MS, Devi KS. Effect of chronic exposure of pregnant rats to malathion and/or estrogen and/or progesterone on xenobiotic metabolizing enzymes. *Pestic Biochem Physiol* 1994; 48:110-122.
28. Osimitz TG, Kulkarni AP. Polyamine effects on cytochrome P-450 and flavin-containing monooxygenase-mediate oxidation of xenobiotics. *Drug Metab Dispos* 1985; 13:197-199.
29. Osimitz TG, Kulkarni AP. Hepatic microsomal oxidative metabolism of pesticides and other xenobiotics in pregnant CD-1 mice. *Pest Biochem Physiol* 1985; 23:328-332.
30. McClure MT, Stupans I. Hormonal perturbation as a possible mechanism for the alteration of cytochrome P450 by cyclophosphamide. *Biochem Pharmacol* 1995; 49:1827-1836.
31. Chang TK, Chen H, Waxman DJ. 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea (CCNU) modulates rat liver microsomal cyclophosphamide and ifosfamide activation by suppressing cytochrome P450 2C11 messenger RNA levels. *Drug Metab Dispos* 1994; 22:673-679.
32. Angley MT, Sansom LN, Stupans I. Cyclophosphamide administered repeatedly to the male rat and as a single dose to the female rat. Its effects on hepatic and pulmonary P450 and associated enzymes. *Xenobiotica* 1995; 25:1051-1062.
33. Shimada M, Murayama N, Nagata K, Hashimoto H, Ishikawa H, Yamazoe Y. A specific loss of growth hormone abolished sex-dependent expression of hepatic cytochrome P450 in dwarf rats: reversal of the profiles by growth hormone-treatment. *Arch Biochem Biophys* 1997; 337:34-42.
34. Gonzales FI, Lee HY. Constitutive expression of hepatic cytochrome P450 genes. *FASEB J* 1996; 10:1112-1117.
35. Chang TK, Bellward GD. Peripubertal androgen imprinting of rat hepatic cytochrome P-450 2C11 and steroid 5  $\alpha$ -reductase: pretranslational regulation and impact on microsomal drug activation. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 278:1383-1391.