



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

EFFECTO TERATOGENICO DE LA CASIOPEINA II

T E S I S

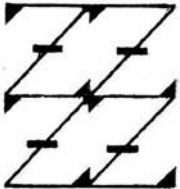
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

MA. ESTELA GONZALEZ VARELA

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO HUMANO EJE
DE NUESTRA REFLEXIÓN

DIRECTOR: DR. MARIO A. ALTAMIRANO LOZANO

MEXICO, D. F.

ENERO, 2004



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.

AGRADECIMIENTOS

Con mucho cariño a mí Papá Jorge González y a mí Mamá Alicia Varela por toda su comprensión y amor durante todos los años de mí vida...

Muy especialmente a mí hermana Fabiola por su apoyo y por ser una gran amiga.

A mí hermana Guadalupe y a mí hermano Jorge por su amistad y comprensión.

Al Dr. Mario Altamirano. Por su tiempo y conocimientos que compartió conmigo.

A todos mis Compañeros, Maestros y Doctores que forman parte del equipo de trabajo de la Unidad de Investigación de Genética y Toxicología Ambiental de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM

Al Dr. Armando Cervantes Sandoval por su asesoría en el análisis estadístico de los resultados.

Esta tesis fue realizada en la Unidad de Investigación de Genética y Toxicología Ambiental de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y contó con el apoyo de CONACYT proyecto G35012-N y de la DGAPA proyecto IN-212701.

DEDICATORIA

En memoria de María Esther Martínez González.

Por nuestra historia...

INDICE

I.	RESUMEN	3
II.	INTRODUCCIÓN	
	1. Agentes Antineoplásicos	5
	2. Producción de Medicamentos	6
	3. Fármacos de Centro Metálico y Casiopeínas	7
	3.1 Casiopeína Ilgly	10
	4. Toxicología Reproductiva	12
	4.1 Pruebas en Toxicología Reproductiva	15
	5. Ciclo Reproductivo en Mamíferos	16
	6. El ratón como modelo experimental	19
	7. Teratología	
	7.1 Historia	20
	7.2 Definición	22
	7.3 Susceptibilidad a teratógenos en relación con la etapa del desarrollo fetal	23
	7.4 Principios de Teratogenesis	24
III.	JUSTIFICACIÓN	28
IV.	HIPÓTESIS	29
V.	OBJETIVOS	30
	1 Objetivo General	
	2 Objetivos Particulares	
VI.	MATERIAL Y MÉTODO	31
VII.	RESULTADOS	34

VIII.	DISCUSIÓN	46
IX.	CONCLUSIONES	51
X.	COMENTARIOS FINALES	52
XI.	REFERENCIAS	53

I. RESUMEN

En México y desde los años 80, dentro de la Facultad de Química de la UNAM, se han desarrollado una serie de compuestos de coordinación de Cobre (II), con una promisorio actividad biológica en contra del cáncer. Así, si el fin de tal fármaco es llegar a ser aplicado en los humanos, se deben seguir una serie secuencial de estudios dentro de los cuales deben realizarse los de Toxicología del Desarrollo en animales de laboratorio.

En el presente trabajo se estudió el efecto de la Casiopeína IIgly Acua(4;7 –dimetil-1,10 fenantrolina) (glicina) cobre (II) Nitrato, sobre el desarrollo embrionario y fetal utilizando como sistema de prueba a ratones de la cepa CD-1 al ser administrada por vía intraperitoneal del día 6 al día15 de gestación.

Tres grupos de animales fueron tratados con 2.2, 3.3 o 4.4 mg/kg de peso corporal de Casiopeína IIgly, incluyendo dos grupos control; uno tratado con agua destilada inyectable (testigo negativo) y el otro con 5 mg de cloruro de cadmio por kg de peso corporal (testigo positivo).

Los resultados mostraron que el compuesto químico utilizado causó una disminución en la ganancia de peso corporal de las hembras gestantes tratadas con 4.4 mg/kg de Cas IIgly (0.54 g por día, $P < 0.05$), disminución del número de sitios de implantación, de la media del número total de fetos obtenidos por camada, mientras que el número de reabsorciones se incremento.

El porcentaje de fetos muertos (término) para los grupos tratados con 2.2 o 3.3 mg/kg fue del 1-3%, mientras que para el grupo tratado con la mayor dosis de Cas IIgly no hubo presencia de fetos muertos, sin embargo en la dosis más alta el número de camadas obtenidas fue menor, esto es hubo hembras que perdieron el 100% de la camada.

Los fetos observados se evaluaron bajo los criterios del glosario internacional de términos para el desarrollo de anomalías estructurales en animales de laboratorio (1° versión) (Wise *et al.*, 1997).

En el grupo tratado con 2.2 mg/kg Cas IIgly se encontró que; 6 fetos machos (11.53%) y 1 feto hembra (1.53%) presentaron micromelia, extremidad desproporcionalmente corta o pequeña, mientras que en el grupo tratado con 3.3

mg/kg; 5 fetos machos (7.93%) y 3 fetos hembra (6.38%) presentaron la misma anomalía.

Por otro lado se observó la presencia de extremidades mal rotadas, extremidad rotada hacia el centro o la periferia. En el grupo tratado con 3.3 mg/kg; 3 machos (4.61%) y 4 hembras (6.34%) presentaron esta alteración, mientras que en el grupo tratado con 2.2 mg/kg de Cas Ilgly hubo un feto macho (1.92 %) y 3 fetos hembra (4.61%) con la extremidad mal rotada.

Otra anomalía observada fue la extremidad hiperextendida, extensión excesiva de la pata. En la dosis de 2.2 mg/kg hubo un feto macho (1.92%) y 3 fetos hembra (4.61%) mientras que en la dosis de 3.3 mg/kg se observaron 3 fetos macho (4.61%) y un feto hembra (1.58%).

En la dosis de 3.3 mg/kg, 5 fetos hembra (7.93%) y 1 feto macho (1.53%) tuvieron cola enroscada.

Las siguientes malformaciones se encontraron en un solo feto del total de fetos revisados por grupo, para el grupo tratado con 2.2 mg/kg se observó; macho con exencefalia, protuberancias del cerebro fuera del cráneo, macho con criptoftalmia, no hay formación del párpado, macho con hiperflexión de una extremidad, doblamiento excesivo de una extremidad o unión, hembra con braquidactilia (dígito acortado), hembra con cola enroscada, macho con cola doblada. En el grupo tratado con 3.3 mg/kg se observó; macho con amelia, ausencia total de uno o más miembros, macho con braquidactilia, hembra con sindactilia, fusión del tejido entre los dígitos, hembra con cola doblada, hembra con cola en forma de gancho.

En el grupo que recibió la dosis más alta (4.4 mg/kg) no se observaron malformaciones gruesas. El grupo testigo tratado con agua destilada inyectable, no presentó ningún tipo de efecto, mientras que el grupo tratado con Cadmio mostró un alto porcentaje de malformaciones macroscópicas ya que el 100% de las camadas obtenidas se vieron afectadas por el compuesto.

Al analizar los datos de las malformaciones por sexo, se encontró que el grupo tratado con 2.2 mg/kg obtuvo el mismo número de hembras y machos afectados y el 80% de las camadas fueron afectadas por el compuesto, mientras que el grupo tratado con 3.3 mg/kg se observó que los fetos machos fueron más susceptibles de daño que

los fetos hembra y el 70% de sus camadas fueron afectadas.

Cuando se realizó el análisis de los fetos para evaluar las alteraciones esqueléticas se encontró que en todos los grupos analizados se observaron variaciones esqueléticas, encontrando que a mayor dosis mayor porcentaje de fetos malformados y mayor frecuencia de camadas alteradas.

En el grupo tratado con 2.2 mg/kg de la Cas IIgly, se observaron por lo menos una malformación en el 36.84% del total de fetos observados de las cuales; el 13.55% correspondió a la presencia de costillas supernumerarias, el 7.89% a costillas rudimentarias, el 5.26% a costillas cortas, el 10.52% a esternebras rudimentarias, el 15.78% a esternebras asimétricas y el 5.26% a esternebras divididas asimétricamente.

Cuando se analizó el grupo tratado con 3.3 mg/kg de Cas IIgly, en el 65% del total de fetos se registró algún tipo de malformación esquelética. En este caso el 36.92% presentaban costillas supernumerarias, el 18.46% costillas rudimentarias, el 15.38% costillas cortas, el 4.61% esternebras supernumerarias, el 3.07% esternebras en forma de pesa, el 12.30% esternebras rudimentarias, el 23.07% esternebras asimétricas, el 3.07% esternebras divididas asimétricamente y el 1.53% tenían vértebras lumbares revueltas.

Para el grupo tratado con 4.4 mg/kg de Cas IIgly, se observó que el 90% del total de fetos revisados presentaron, al menos, un tipo de malformación esquelética. En este caso el 80% presentó costillas supernumerarias, el 50% costillas rudimentarias y cortas, el 10% esternebras supernumerarias, el 20% esternebras en forma de pesa, el 3% esternebras rudimentarias y el 50% con esternebras divididas asimétricamente.

El grupo testigo positivo tratado con cadmio presentó el 75% del total de fetos observados con alguna malformación esquelética y en el grupo testigo negativo el 22.5% del total de fetos observados presentaron al menos una malformación esquelética.

Los resultados obtenidos muestran que las tres dosis de casiopeína IIgly administradas en este trabajo provocan efectos embriotóxicos y teratogénicos.

II. INTRODUCCIÓN

1. Agentes Antineoplásicos.

Una gran proporción de la investigación clínica sobre el cáncer se centra en el problema de cómo matar selectivamente las células cancerosas. En su mayoría, los métodos actuales aprovechan diferencias relativamente sutiles existentes entre las células normales y las neoplásicas con respecto a su velocidad de proliferación, a su metabolismo y a la sensibilidad a la radiación; estos métodos tienen efectos tóxicos locales desagradables. Algunos tipos de células cancerosas son especialmente vulnerables al ataque selectivo porque dependen de hormonas específicas o porque sus superficies tienen características químicas no usuales que pueden ser reconocidas por anticuerpos (Alberts *et al.*, 1989).

La mayor parte de los antineoplásicos actúan en diferentes fases de la división celular, las células más susceptibles son aquellas que tienen una alta capacidad de proliferación, aunque también se afectan las células normales que suelen tener un alto recambio. Ello explica muchos de los efectos indeseables, es decir, pueden destruirse folículos pilosos, médula ósea, epitelio intestinal y pulmonar (Rotemberg *et al.*, 1999). En general son tres los efectos adversos que tienen los anticancerígenos; Teratogénesis, Mutagénesis y Carcinogénesis (Pratt y Ruddon, 1979)

Los fármacos antineoplásicos se clasifican en distintas familias según su: actividad bioquímica y origen (Rotemberg *et al.*, 1999). Estas familias incluyen: Agentes sintéticos análogos a las drogas conocidas que son utilizadas por su eficacia, productos naturales o antibióticos, derivados de las plantas, antimetabolitos y algunos agentes misceláneos.

El uso apropiado de un agente contra el cáncer; finalmente depende del entendimiento de su mecanismo de acción en todos los niveles, es decir, a nivel molecular, celular, de tejidos, y órganos, así como dentro del animal como un todo. Sin este conocimiento solo se pueden tomar decisiones intuitivas para la elección de agentes anticancerígenos y esperar que el resultado clínico sea útil (Sporn y Suh, 2000).

2. Producción de Medicamentos.

Muchas de los fármacos que se usan actualmente como la Efedrina, la Resepina, y la Cafeína han sido usadas por cientos o miles de años. Las propiedades terapéuticas de estas drogas se descubrieron empíricamente por el folklore y la medicina tradicional o revisando su actividad en plantas, animales o microorganismos. En la actualidad, el descubrimiento de algunas drogas, aún sigue siendo empírico (Chi-Jen, 2000).

Muchas de las más recientes drogas, son sintetizadas por tecnología de la química orgánica. La síntesis química produce agentes con una alta pureza a bajo precio. La gran ventaja de las drogas sintéticas es que se pueden hacer cambios en la estructura del fármaco durante el proceso de síntesis y estos cambios pueden realzar la actividad farmacológica o reducir sus efectos (Burgen, 1986; Sarel *et al.*, 1992).

En las últimas dos décadas, cuando las bases moleculares y la bioquímica de acción de un fármaco fue mejor entendida, se pudieron desarrollar nuevas drogas por modificación molecular sistemática, con el objeto de cuantificar la relación estructura-actividad, resultando en el mejoramiento de la farmacocinética (absorción, distribución y eliminación) o la farmacodinámica (mecanismos de acción del fármaco, sitios de unión en la célula) y el comportamiento molecular (Chi-Jen, 2000).

Hasta el día de hoy el sueño de conquistar una enfermedad es casi siempre alentada por el descubrimiento y uso apropiado de un fármaco. Este interés hace posible que la investigación en quimioterapia siga progresando.

El proceso en el desarrollo de un fármaco es complicado, consume tiempo y es costoso. Finalmente, el resultado es impredecible y desconocido. Cientos y a veces miles de compuestos químicos deben ser aislados o sintetizados y probados para encontrar el compuesto óptimo que logra una actividad farmacológica específica sin serios efectos colaterales (Chi-Jen, 2000).

La complejidad en el desarrollo de un fármaco involucra una multitud de disciplinas científicas comprometidas en la evaluación de fármacos y productos biológicos. La química orgánica tradicional sintetiza y purifica un nuevo compuesto. La bioquímica estudia el metabolismo de los procesos vivos. La toxicología investiga los

efectos dañinos potenciales del químico. La farmacología examina las actividades farmacológicas específicas y su relación estructura-actividad. Por su lado, la ciencia de la computación utiliza maquinas sofisticadas para analizar y evaluar los nuevos fármacos. Cada una de estas disciplinas contribuyen con el desarrollo de nuevos fármacos (Chi-Jen, 2000).

La Pharmaceutical Manufactures Association (PMA) actualmente estima que el tiempo en la investigación de un nuevo fármaco es de aproximadamente de 10 años, o más, antes de que la Food and Drugs Administration (FDA) pueda aprobarla para su uso en el tratamiento de enfermedades, incluyendo, en promedio, 125 millones de dólares para desarrollar una nueva droga (Chi-Jen, 2000).

Actualmente existen 44 fármacos antineoplásicos tanto de origen orgánico como inorgánico, aprobados para su uso, de ellos sólo dos, el cisplatino y el carboplatino son fármacos inorgánicos obtenidos a partir de platino y ninguno de los 44 son de tecnología nacional (Bravo *et al.*, 2002).

3. Fármacos de Centro Metálico y Casiopeinas.

El compuesto $\text{cis}-(\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2)$ nombrado cis-diclorodiaminoplatino(II), también comúnmente conocido como cisplatino o cis-DDP, es una molécula conocida desde el siglo XIX. Su actividad biológica fue conocida por accidente cuando, el biofísico Barnett Rosenberg estudiaba los efectos de los campos eléctricos en crecimiento de células de *Escherichia coli* (Mendiola *et al.*, 2003). Rosenberg en 1969 citado por Mendiola *et al.*, 2003, reportó la actividad citostática de un compuesto sintético de origen inorgánico que marcó la pauta de una nueva serie de compuestos con las siguientes características (Ruiz-Azuara, 2000):

- Un espectro más amplio de actividad
- Mayor efectividad clínica antitumoral
- Disminución de efectos eméticos y renales
- Sinergismo en terapias combinadas.

Una nueva familia de compuestos del tipo quelatos mixtos de cobre(II), denominados Casiopeinas[®] (Su nombre proviene de la constelación Casiopea, formada por seis estrellas, ordenadas con el mismo arreglo molecular de estos compuestos)

patentados y registrados a nombre de la UNAM (Ruiz-Azuara, 1992) comenzó en 1976 con la idea de que los metales en compuestos de coordinación con moléculas orgánicas pudieran llegar a interactuar con el ADN de las células cancerosas, interrumpiendo así su reproducción incontrolada, dentro de la fase de tratamiento. Aunque en ese tiempo surgió el cisplatino, compuesto anticancerígeno metálico que revolucionó la quimioterapia por su capacidad para atacar cánceres que eran resistentes a otro tipo de compuestos, su alta toxicidad provoca la caída del cabello, vómitos y secuelas secundarias graves, como daños en los riñones. Ante tal circunstancia, Ruiz-Azuara trabajó con elementos metálicos esenciales, presentes en los humanos, por ser fundamentales para alguna función biológica. Si por alguna causa ajena al organismo se adquieren excesos de ese tipo de metales, se activan procesos homeostáticos para eliminarlos (Alex, 2002).

Para el diseño de estos nuevos fármacos, como compuestos de coordinación se consideraron las siguientes premisas (Ruiz-Azuara, 2000):

- Utilizar metales de transición que son esenciales para los procesos vitales (Mn, Fe, Co, Ni, Cu y Zn), de estos el cobre (II) presenta la geometría más cercana a los compuestos de platino (II).
- El uso de elementos esenciales disminuiría de manera importante la toxicidad de los posibles fármacos, ya que los organismos tienen procesos homeostáticos para regular los excesos de elementos esenciales.
- Contener ligandos quelatos que aumenten la estabilidad de los sistemas y mantengan la geometría *cis*, que ya había demostrado Rosenberg, ser la más activa.
- Que estos ligandos presentaran propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas, por lo que debían ser quelatos mixtos.
- La variabilidad de sustituyentes químicos en los quelatos podrá generar selectividad preferencial sobre algunos tipos de tejidos tumorales.

Las fórmulas generales de las Casiopeínas® son:

$\{\text{Cu}(\text{N-N})(\text{N-O})\}\text{NO}_3$ o $\{\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})\}\text{NO}_3$ donde, (N-N) = fenantrolinas o bipyridinas substituidas, (N-O) = aminoácidos o péptidos y (O-O) = acetilacetato o salicilaldehído.

La hipótesis del proyecto de Casiopeínas, fue diseñar moléculas con metales

esenciales, cuyas características químicas y estructurales les permitieran atravesar membranas, interactuar con el ADN y ser solubles en agua para difundirse en el organismo (Alex, 2002).

De los compuestos metálicos se comenzaron a probar los de cobre porque formaban estructuras planas (sus átomos principales están en un mismo plano), parecidas a las del cisplatino. Otra de sus ventajas, es su abundancia relativa en la naturaleza y de allí su menor costo comparado con el platino. Debido a que el cáncer no es uno solo, sino que produce diversos tipos de tumores, con causas diferentes, se creó una matriz de compuestos ternarios (de tres unidades) de cobre, donde se modifican los sustituyentes, de tal manera que la estructura básica de los compuestos es la misma. La obtención de la familia de fármacos en su totalidad implicó mucho trabajo: el diseño del compuesto, su síntesis, optimización y caracterización, además de la determinación de las propiedades físico-químicas, como estabilidad ante disolventes, estabilidad al pH, propiedades magnéticas, etc. También fue necesario montar las pruebas de cernimiento y actividad biológica *in vitro* e *in vivo*, donde se determinó que los compuestos tenían actividades citotóxicas, genotóxicas y antineoplásicas. Sin embargo, aún no se sabe como actúa el metabolismo sobre estos fármacos. Los compuestos con mayor actividad pasaron a los estudios de farmacología y toxicología, donde se desecharon los más tóxicos y los menos activos. Los seleccionados fueron analizados determinándose su farmacocinética y farmacodinámica (modo y tiempo de absorción, distribución y eliminación del organismo) en varias especies animales y sangre humana (Alex, 2002).

Estos resultados indican de manera preliminar que la sustitución en las diiminas modifica el grado de actividad y la modificación del ligante iónico es responsable de la selectividad del fármaco, hacia el tipo de tumor (Bravo *et al.*, 2002).

De los 100 compuestos patentados de la familia de las Casiopeínas® (todos con cobre) se han seleccionado los más activos y menos tóxicos para realizar pruebas preclínicas en animales, como gatos con leucemia viral felina y en ratones "desnudos" o sin respuesta inmune a los cuales se les introdujo un tumor humano. Los resultados han sido exitosos. Del total de compuestos se eligieron 24, de los cuales se seleccionaron cinco y, finalmente, dos, los más prometedores por su solubilidad y

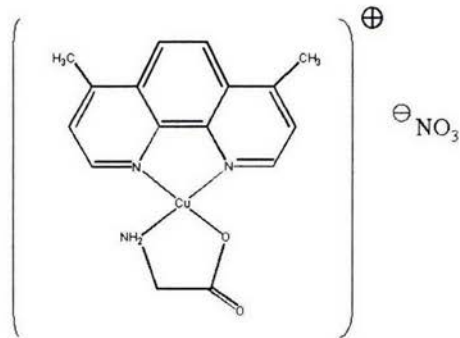
selectivos para leucemia y carcinomas. Esas dos moléculas llevan el nombre de Casiopeínas® II y III, de las cuales hasta el momento se tienen nueve subfamilias, unas más activas que otras ya sea *in vitro* o *in vivo* (Alex, 2002).

3.1 Casiopeína IIgly

La Casiopeína II gly -Acua(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) (glicina) cobre (II) Nitrato; (Cas IIgly) Figura 1. Tiene las siguientes propiedades:

- La Cas IIgly tiene un Peso Molecular de 423 gr/mol y un pKa de 5.4 (Reyes *et al.*, 2002).
- Es estable en agua y en estado sólido (Ruiz-Azuara *et al.* 1995).
- Es estable en condiciones de luz-obscuridad y refrigeración, por lo menos durante 21 días y se degrada muy fácilmente cuando se expone a la luz.
- Debido a que el pH del estómago es de 1 aproximadamente y la molécula se disocia a ese pH, esta casiopeína no se puede administrar por vía oral (Ferrer *et al.*,1995).
- Inhibe en mayor proporción el índice mitótico en comparación con el Cisplatino o la Mitomicina-C (Morales *et al.*, 1995).
- La LD₅₀ por vía intraperitoneal, es de 8.8 mg/kg en ratones de la cepa CD1 (García *et al.*, 1995).
- La Casiopeína IIgly ha mostrado tener actividad antineoplásica en tumores sólidos (De Vizcaya, *et al.*, 1996).
- La Cas IIgly fue desarrollada como un fármaco anticancerígeno activo específico contra líneas celulares HeLa, L1210, y Calo. También para tipos de cáncer S180, B16 y LW1 (Ruiz-Azuara, *et al.*, 1991 citado por Rivero-Muller *et al.*, 1998).
- Es potencialmente citotóxica y también mata células por apoptosis (De Vizcaya-Ruiz *et al.*, 1998).
- Se ha reportado que tiene gran habilidad para degradar al ADN (Huber, *et al.*, 1987 citado por Rivero-Müller, *et al.*, 1998)
- La Casiopeína IIgly administrada del día 6-15 de gestación en una dosis de 4.4 mg/kg a ratones hembra preñadas induce micronúcleos (García *et al.*, 2002).

- Interacciona con la Adenina (Tovar *et al.*, 2002).
- El producto de la reacción entre todas las Casiopeínas II y la adenina es el dimero $[\text{Cu}_2(4,7\text{-dimetil-1,10-fen})_2 \text{adenina}_2] (\text{NO}_3)_2$ (Cirigo *et al.*, 2002).
- Se une a un alto grado (> 97%) de proteínas plasmáticas, principalmente la albúmina.



CASIOPEÍNA II

Figura 1. Estructura química de la Casiopeína IIgly. Acua(4,7-di-metil-1,10-fenantrolina, glicina cobre II) nitrato (Reyes *et al.*, 2003).

4. Toxicología Reproductiva.

La Toxicología Reproductiva es la parte de la Toxicología general que estudia los efectos adversos producidos por agentes exógenos en la reproducción. Esta es una definición muy amplia que incluye varios tipos de toxicidad que con frecuencia se manejan de forma separada. Por ejemplo, la teratogenicidad; capacidad de causar grandes malformaciones estructurales en el feto en desarrollo, y la toxicología del desarrollo, que estudia las alteraciones producidas en la descendencia como resultado de la exposición de hembras gestantes o lactantes a xenobióticos (Bonilla *et al.*, 2001).

Dentro de los xenobióticos se incluyen agentes químicos naturales o sintéticos, biológicos (virus) y físicos (radiaciones). Estos pueden afectar cualquiera de las etapas del ciclo reproductivo e interferir con la fertilidad o el desarrollo prenatal o postnatal de los individuos (ECETOC, 1983; Bonilla *et al.*, 2001).

La identificación de agentes con efectos deletéreos sobre la reproducción se basa tanto en estudios en humanos como en animales de laboratorio. En el primer caso, la información es obtenida de personas laboralmente expuestas de manera rutinaria o accidental a los agentes potencialmente tóxicos. En el caso de los animales de laboratorio, la información es obtenida a partir de exposiciones experimentales controladas. Evidentemente, lo mejor para la identificación de reprotóxicos es seguir esta última vía. Para hacer esta evaluación, se parte de los siguientes supuestos (Bonilla *et al.*, 2001).

1. Un agente que produce un efecto reproductivo adverso en animales de laboratorio puede tener ese efecto en humanos. Este punto se basa en comparaciones de los datos obtenidos del efecto de los agentes potencialmente tóxicos en humanos y en animales de laboratorio (Kimmel *et al.*, 1990).
2. Se asume que un agente que afecta la función reproductiva en un sexo, afectará también la función reproductiva en el otro sexo. Los mecanismos de daño causados por este agente, además, serán similares en los sistemas reproductores masculinos y femeninos, dada la similitud en los procesos biológicos que se llevan a cabo en machos y hembras (Bonilla *et al.*, 2001).
3. En ausencia de información para determinar cuál es la especie animal más apropiada para evaluar el riesgo reproductivo, se deben usar los datos obtenidos de la

especie animal más sensible, ya que se ha observado que los humanos son más sensibles que la mayoría de las especies animales empleadas en los estudios de toxicidad reproductiva (Working, 1989).

4. En un análisis cuantitativo para evaluar toxicidad reproductiva, la curva dosis-respuesta será lineal a partir de un cierto umbral. Esto se basa en el hecho de que las células y órganos del sistema reproductivo tienen cierta capacidad para evitar o reparar el daño producido. Frecuentemente se presenta un umbral en las dosis utilizadas, a partir del cual se produce el daño.

Los efectos adversos en la reproducción humana son múltiples y no han sido completamente entendidos. Los factores hereditarios por sí solos son difícilmente responsables de una gran proporción de estos efectos, ya que la otra causa de estas alteraciones es debida a la exposición de químicos sintéticos y naturales, drogas, radiación, consumo de alcohol e infecciones. Sin embargo, la magnitud de cada uno de ellos es desconocida. Más aún la limitación y el control de la exposición a químicos sintéticos pueden reducir el riesgo de los efectos adversos en la reproducción (Scialli, 1992).

Compuestos químicos, los cuales, pueden afectar la reproducción tienen que ser primeramente identificados por pruebas biológicas y poner en marcha la tarea de hacer una valoración crítica de los químicos considerando (ECETOC, 1983);

- a) Tener la información sobre Toxicología Reproductiva requerida que permita evaluar el riesgo y en que orden deben estos aspectos ser tratados
- b) Cual es el estado de evaluación de estos aspectos.
- c) Cual es la relevancia del hallazgo para el hombre.
- d) Existe alguna dosis que no afecte la reproducción.
- e) Que recomendaciones pueden hacerse para mejorar la evaluación de los riesgos.

Con el fin de identificar y caracterizar el potencial tóxico reproductivo de los compuestos químicos, se debe tener en cuenta su estructura química, su modo de acción y la relación dosis-efecto (ECETOC, 1983);

1. Relación estructura-actividad.

Deben revisarse las similitudes de la estructura química de la sustancia bajo consideración, con respecto a los compuestos conocidos o estar libre de efectos tóxicos reproductivos.

2. Modo de acción.

Los agentes exógenos pueden tener una acción directa o indirecta sobre los procesos reproductivos. Los agentes que afectan directamente pueden alterar el desarrollo normal de las células, tejidos y órganos por la modificación o inhibición de la proliferación celular. Interferencias indirectas causan desordenes metabólicos u hormonales por una intoxicación general de la madre o afectando la actividad sexual de los padres. También la función de la placenta, puede afectar seriamente la reproducción, especialmente el desarrollo embrionario o fetal.

Los efectos más dañinos son las mutaciones causadas en las células germinales, las cuales son heredadas y éstas causan la muerte o anomalías en las generaciones subsecuentes.

3. Relación dosis-efecto.

Para establecer la relación entre un agente y los efectos observados es esencial demostrar que hay una correlación entre la dosis y estos. Al incrementar la concentración o el nivel de dosis de la sustancia a prueba generalmente se observa un aumento en la severidad de los efectos y en la incidencia en los efectos, así como una amplia variedad de alteraciones (ECETOC, 1983).

En algunos casos puede ser imposible establecer una clara relación dosis-efecto porque esta es enmascarada por otros eventos tóxicos. Un motivo importante para establecer la relación dosis-efecto es determinar la dosis en la cual no hay efecto, es decir, la dosis en la cual no hay cambios fisiológicos, morfológicos y funcionales en ningún momento de la reproducción (ECETOC, 1983).

4.1 Pruebas en Toxicología Reproductiva.

El propósito del desarrollo de estudios toxicológicos es evaluar el efecto de las sustancias problema en el desarrollo de los fetos que resulta desde la exposición de los progenitores antes de la concepción o la exposición de la madre durante el

desarrollo prenatal. Los efectos adversos son las conclusiones que pueden ser utilizadas para evaluar el potencial tóxico de la sustancia problema. Las cuatro mayores manifestaciones de los efectos de la sustancia en el desarrollo del organismo son; muerte, anomalías estructurales, alteración o retardo del crecimiento y deficiencias funcionales. Para muchas sustancias, estas manifestaciones están relacionadas con la dosis y la duración de la exposición y el momento del desarrollo. (Redbook, 2000).

Desde el contratiempo, que se tuvo, hace 40 años con la Talidomida se ha hecho evidente que fármacos y químicos pueden afectar adversamente el desarrollo del feto (Saunders y Saunders, 1990). Como resultado, hay un gran control en la medicación de mujeres preñadas (Hall y Solehdin, 1998). Durante las últimas cuatro décadas, se han introducido muy pocos medicamentos por la industria farmacéutica después de haber sido probados en mujeres embarazadas.

Más de la mitad de todos los embarazos no son planeados, causando que miles de mujeres, en todo el mundo, expongan inadvertidamente a sus productos a medicamentos que han consumido sin saber que han concebido (Koren *et al.*, 1998). Esta realidad resalta la urgente necesidad de información para la seguridad de los fetos (Rodríguez y Rodríguez, 2000).

No es ético, seleccionar un número de mujeres azarosamente para recibir medicamentos que no se tenga la certeza de que son seguros para el feto, la recopilación y el seguimiento de los datos producto de la observación es la única manera ética de cerrar la brecha del conocimiento entre; el valor limitado de los estudios en animales y la exposición de mujeres embarazadas (Koren, 2002). Por lo tanto, se deben seguir las siguientes recomendaciones para realizar estudios de toxicidad reproductiva valiosos y confiables. Las siguientes recomendaciones son aplicadas en todos los estudios de toxicidad reproductiva de la FDA (Redbook, 2000).

- Los estudios deben de realizarse de acuerdo al *Good Laboratory Practice Regulations (GLPs)*, (FDA, 1982).
- Los animales deben ser cuidados para mantenerlos y hospedarlos de acuerdo a las recomendaciones contenidas en la *Guide for the Care and use of Laboratory Animals*
- Se deben de emplear animales saludables que no han sido sometidos a

procesos experimentales. Generalmente, no es posible trabajar con animales infectados durante el curso de un estudio sin el riesgo de la interacción entre la droga del tratamiento y la sustancia problema. Las hembras no deben estar preñadas y deben ser *nulliparas* (Institute of Laboratory Animal Resources, 1996).

- Los animales de laboratorio deben ser caracterizados por referencias de su especie, cepa, sexo y peso o edad.
- Los animales deben ser asignados a un grupo control y a un grupo experimental de manera fortuita para minimizar las tendencias y asegurar la compatibilidad a través del grupo control y del grupo experimental con fines estadísticos. A cada animal se le debe asignar un número único.

Para encontrar el rango de dosis en el estudio se recomienda determinar la dosis más apropiada, a menos que se tengan datos de farmacocinética y metabólicos de la sustancia problema antes de empezar el estudio. El estudio del rango de la dosis encontrado, debe ser pero no necesariamente, hechos en animales preñados. Comparando los resultados desde un estudio prueba en animales no preñados y un estudio principal en animales preñados debiendo establecer si la sustancia problema es más o menos tóxica en animales preñados que en los no preñados (Redbook, 2000).

5. Ciclo Reproductivo en Mamíferos.

El ciclo reproductivo en mamíferos consiste de una secuencia de eventos interrelacionados los cuales son ilustrados en la figura 2.

Los diferentes eventos y períodos pueden ser definidos de la siguiente manera (ECETOC, 1983):

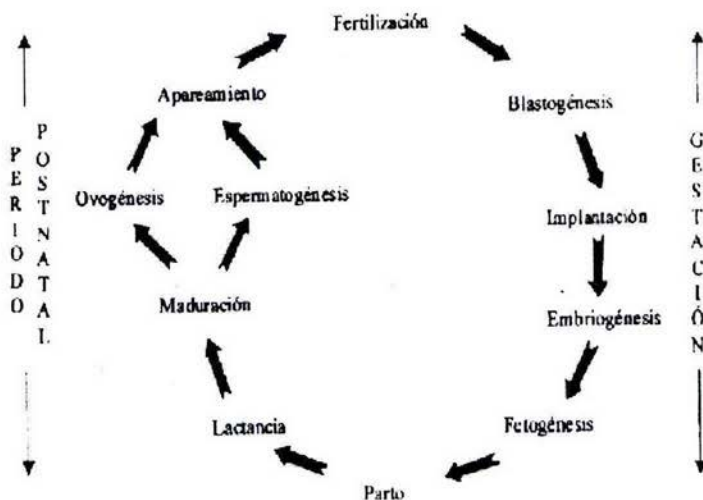


Figura 2. Ciclo reproductivo en mamíferos (Bonilla *et al.*, 2001).

- **Fertilización** es la fusión del espermatozoide y el óvulo resultando un cigoto.
- **Blastogénesis** es el proceso de formación del blastocisto por divisiones seriales del cigoto.
- **Implantación** es la adhesión del blastocisto al endometrio del útero, esta penetración a través del epitelio dentro de la pared del útero es el principio de una interacción mayor con la madre.
- **Embriogénesis** es el período en el cual las células embrionarias se diferencian en varios sistemas y órganos.
- **Fetogénesis** es el período del crecimiento general, diferenciación de órganos y formación de los genitales externos y la histogénesis del sistema nervioso central.
- **Parto** es el nacimiento de la cría y marca el final de la gestación.
- **Período prenatal** es el periodo entre la fertilización y el parto.
- **Período perinatal** es el corto período antes y después del parto.

- **Período postnatal** es el que sigue al parto.
- **Período de lactación** es la primera parte de la vida postnatal desde el parto hasta el destete del descendiente.
- **Maduración** es el período del desarrollo físico y funcional desde el destete hasta la madurez sexual.
- **Gametogénesis** es el desarrollo de las células germinales en el macho y la hembra.
- **Apareamiento o Unión** involucra un comportamiento complejo entre el macho y la hembra con el objetivo de transferir el espermatozoide del macho a la hembra.

Todos los agentes exógenos pueden modificar el proceso reproductivo. Pero un mismo agente puede tener varios efectos, dependiendo del período del ciclo reproductivo, en el cual la exposición tuvo lugar. Para facilitar la descripción de los procesos adversos el ciclo reproductivo se divide en tres períodos (ECETOC, 1983):

1. Período de formación de gametos

Los efectos adversos sobre la gametogénesis pueden reducir la fertilidad o causar la esterilidad, debido a cambios morfológicos, bioquímicos o fisiológicos (ECETOC, 1983).

2. Período de gestación.

Este período se puede prolongar, acortar o interrumpir provocando abortos o recién nacidos muertos. El blastocisto puede ser destruido, aunque un daño menos severo puede ser compatible con el desarrollo de un feto normal o puede provocar su muerte en el período de post-implantación. La implantación del blastocisto puede ser impedida o retardada (ECETOC, 1983).

Las malformaciones estructurales o funcionales más obvias son inducidas principalmente durante la embriogénesis, el cual es el período más sensible durante el desarrollo. El embrión puede morir durante este período (ECETOC, 1983).

Interferir durante el período de fetogénesis puede provocar cambios morfológicos. Las consecuencias más frecuentes son; retardos en el crecimiento y desórdenes funcionales. Los genitales externos y el sistema nervioso central (SNC) también son susceptibles de daño durante este período (ECETOC, 1983).

El proceso de nacimiento puede ser afectado, resultando en un parto difícil, retardándolo o prolongándolo, lo cual, puede afectar al recién nacido y a la madre

(ECETOC, 1983).

3. Período postnatal.

Agentes exógenos pueden influenciar el comportamiento materno, el balance hormonal o la nutrición lo cual puede afectar la sobrevivencia y el desarrollo físico y funcional del recién nacido. La exposición a agentes exógenos durante este período puede causar también daños, más adelante en el desarrollo y la conducta reproductiva (ECETOC, 1983).

6. El Ratón como Modelo Experimental.

En el campo de la investigación científica es habitual el uso de animales para la experimentación. Como investigadores, surge la necesidad de encontrar modelos animales que satisfagan los requerimientos en este tipo de trabajos y brinden resultados certeros, que redunden en beneficio de esas mismas especies, y del hombre. Aunque ambas cosas parezcan contradictorias, no lo son.

Cuando se refiere a un animal como modelo, se debe pensar ¿modelo para qué?. Se sabe que toda especie animal puede ser tomada como modelo, dependiendo del objetivo de nuestra investigación. Pero cada una de ellas necesitará parámetros distintos para su mantenimiento en bioterios y su uso en el campo de la investigación biomédica (Fernández, 2001), y es así como se debe seleccionar nuestro modelo biológico.

Para realizar con criterio esa selección, es necesario conocer profundamente nuestro objeto animal, su vida silvestre, su biología y sus hábitos, su genética y su nutrición, su forma de aparearse, cuidar a sus crías, sus enfermedades y todo cuanto se pueda acerca de él (Fernández, 2001).

El ratón utilizado actualmente en la investigación es un roedor cuyo ancestro es el ratón común o ratón casero. Su nombre científico es *Mus musculus* y su taxonomía es la siguiente (Altamirano, 1994):

Clase: Mamífera

Orden: Rodentia

Suborden: Miomorfa

Familia: Muridae

Subfamilia: Muridae

Género: *Mus*

Especie: *musculus*

A principios del siglo XVIII, el ratón fue utilizado en estudios de anatomía comparada, pero la aceleración de la investigación biológica en el siglo XIX, el renovado interés en la genética y las necesidades de un mamífero pequeño, económico, de fácil alojamiento y alimentación fueron los instrumentos para desarrollar el moderno ratón de laboratorio (Altamirano, 1994).

Todas las cepas de ratón de laboratorio se han desarrollado a través de cruzamientos selectivos. La mayoría de las cepas de ratones de laboratorio son albinas. Los ratones de laboratorio constituyen entre el 60 y 80% de los mamíferos usados en la investigación, esto es debido a su gran prolificidad, a su capacidad de adaptación, a los conocimientos que se tienen acerca de su fisiología y anatomía y a su fácil manejo (Andres *et al.*, 1992).

Otro atributo del ratón para la investigación, es su ciclo corto de vida (1-3 años), lo que permite el estudio de muchas generaciones en un lapso de pocos años, aunque existen algunas diferencias de longevidad entre cepas como consecuencia básicamente a su distinta sensibilidad ante procesos patológicos (Altamirano, 1994).

7. Teratología.

7.1 Historia.

Los primeros estudios, en embriones de pollo, anfibios y peces, donde se habían sometido a alteraciones ambientales, mostraron ser muy susceptibles a influencias desfavorables durante el desarrollo, pero experimentos de este tipo no fueron aceptados como ejemplo de que animales mayores podrían tener la misma vulnerabilidad, ya que se sabía que el desarrollo del embrión en los mamíferos estaba protegido, dentro del ambiente materno, de los factores extrínsecos. Incluso, después del redescubrimiento de los principios mendelianos de la herencia a principios del siglo XX, este punto de vista fue consistente con la opinión generalizada de que la mayoría de los aspectos normales así como el desarrollo anormal estaban genéticamente determinados. Aunque había muchas publicaciones sobre defectos que habían sido

observados después de la exposición de mujeres y animales preñados a radiaciones ionizantes (Goldstein y Murphy, 1929), la implicación fundamental de que los embriones de mamíferos eran susceptibles a factores ambientales no fue inmediatamente comprendida (Wilson y Fraser, 1977).

De hecho, los estudios realizados por Warkany y Schraffenberg (1947) de que era predecible detectar el tipo y número de descendientes malformados como resultado de la exposición de mamíferos preñados a estrés ambiental no originó mucho interés acerca del riesgo que podría correr el embrión humano en presencia de estos factores. Además de los datos aportados por Gregg (1941) y otros investigadores, de que el virus de la rubéola podría desviar el curso normal del desarrollo en el embrión humano.

Todo esto no alertó a los científicos biomédicos de la posibilidad de que otros agentes extrínsecos podían afectar los mecanismos de protección de la madre y dañar a la descendencia. La implicación real de esta posibilidad fue notada solo después que Lenz (1961) y McBride (1961) observaron la prevalencia de un tipo de malformación en miembros de infantes recién nacidos debido al consumo de un "inofensivo" sedante-hipnótico, la talidomida.

Así, a pesar del sufrimiento humano, la catástrofe de la talidomida puede ser vista como un gran beneficio para la humanidad, ya que esto llamó la atención por el hecho, de que no se tenían antecedentes de ello. Este hecho mostró que tanto en humanos como en embriones de mamíferos podía haber una alta vulnerabilidad a ciertos agentes ambientales a pesar de que estos tienen un insignificante o ningún efecto tóxico en individuos postnatales. Este hallazgo, por supuesto, dio un gran ímpetu a la teratología (Koren, 1994).

7.2 Definición.

La teratología es el estudio de las causas, mecanismos y manifestaciones de desarrollo anómalo, que pueden ser de naturaleza estructural y funcional (Loomis, 1982). Un agente teratógeno se define por su capacidad para producir defectos congénitos; un defecto congénito se origina durante el desarrollo embrionario o fetal y consiste en una desviación mayor o menor de la función o morfología normal (Sheppard, 1992).

El siguiente cuadro muestra ejemplos de los agentes teratógenos más comunes, con su actividad teratogénica en el hombre y el ratón.

Cuadro 1. Efectos teratógenos en el hombre y el ratón.

Compuesto	Efecto en el Ratón	Efecto en el Hombre
Ácido acetilsalicílico	Labio hendido, microcefalia, exencefalia, espina bífida, defectos esqueléticos.	No se conoce su actividad teratogénica
Cafeína	Defectos en los dígitos, paladar hendido, hemorragias subcutáneas.	No se conoce su actividad teratogénica
Cortisona	Paladar hendido	Posible teratógeno
Actinomicina D	Anormalidades ectodérmicas y mesodérmicas	Datos insuficientes
Progesterona sintética	Masculinización de los fetos hembra	Masculinización de los genitales externos en los infantes de sexo femenino
Hidroxiurea	Encefalocele, paladar hendido, cola corta o ausente, anomalías en las extremidades y en el sistema esquelético.	Datos insuficientes

(Taylor,1986)

Los teratógenos actúan alterando el material genético, con igual resultado que en una mutación, o alterando otras moléculas (Cuadro 2). De ahí que la acción de los teratógenos externos suelen manifestarse como síndromes de malformación y no como anomalías aisladas (Mc. Bride 1961; Rodríguez y Rodríguez, 2000).

Cuadro 2. Nivel bioquímico de acción de los teratógenos.
(Rodríguez y Rodríguez, 2000)

<i>Nivel bioquímico</i>	<i>Teratógeno</i>
ADN cromosómico	Sustancias alquilantes, antibióticos, esteroides
ARN mensajero	Virus
Reacciones de transferencia de grupos metilo, síntesis de ARN	Antimetabolitos (antagonistas del ácido fólico), alcohol, anticonvulsivantes, litio.
Síntesis de proteínas	Antibióticos
Oxidación fosforilativa	Sustancias alquilantes
Glucólisis	Sustancias alquilantes

Una vez que se evaluaron los riesgos potenciales en el feto, las cuales, antes de la catástrofe de la talidomida no existían. Se originaron una serie de preguntas acerca de los posibles efectos adversos en el desarrollo intrauterino y esto ha provocado un mayor cuidado en el uso de medicamentos durante el embarazo (Wilson y Fraser, 1977).

7.3 Susceptibilidad a teratógenos en relación con la etapa del desarrollo fetal.

La susceptibilidad del embrión o feto a una agresión externa es tan compleja y variable como el proceso de desarrollo. Cada uno de los períodos, ya sea de implantación, embrionario, fetal y postnatal presenta una vulnerabilidad característica. El período más crítico del desarrollo es cuando se encuentran al máximo la división y diferenciación celular y la morfogénesis.

El período de *preimplantación* se caracteriza por su susceptibilidad a la letalidad embrionaria y raramente a la teratogenicidad. Un daño en este periodo puede repararse a través de una hiperplasia compensadora de células relativamente indiferenciadas; o bien puede presentarse la muerte temprana y aborto espontáneo del embrión o ambos (Fraser, 1992).

El periodo *embrionario* corresponde a la fase de organogénesis que se caracteriza porque existe migración y asociación de células que dan lugar a tejidos y órganos rudimentarios; este es un período de mayor vulnerabilidad. Las agresiones en

este período pueden producir defectos estructurales al nacimiento, muerte del embrión o reparación del daño (Fraser, 1992).

En el periodo *fetal*, los principales procesos son la histogénesis, la maduración funcional y el crecimiento. La agresión en esas fases puede producir un amplio espectro de efectos que se manifiestan por retardo en el crecimiento, muerte fetal, alteraciones funcionales y carcinogénesis transplacentaria (Fraser, 1992).

Periodo *postnatal* este se caracteriza porque la maduración funcional y estructural continua. El paso y acción de agentes teratogénicos pueden manifestarse en un retardo en el crecimiento, alteraciones funcionales del sistemas nerviosos, inmune y endocrino, así como alteraciones neuroconductuales y cáncer en la infancia (Fraser, 1992).

7.4 Principios de Teratogénesis.

1.- La susceptibilidad a la teratogénesis depende del genotipo del descendiente y la manera en la cual este interactúa con los factores ambientales.

En términos simples la naturaleza genética del organismo en desarrollo en el cual se induce teratogénesis se debe a los genes y las influencias extrínsecas. Diferencias entre individuos, cepas o especies en la reacción de un mismo agente dañino se presume que se debe a la variación de la naturaleza bioquímica o morfológica que esta determinada por los genes (Wilson, 1973).

Es necesario enfatizar que la mayoría de estas diferencias tienen probablemente una base hereditaria, aunque su naturaleza precisa puede no conocerse porque el metabolismo y los sitios estructurales de acción del agente teratogénico a menudo no se conocen (Wilson, 1973).

2. - La susceptibilidad a agentes teratogénos varia con el estado de desarrollo del producto, al tiempo de la exposición.

Es un precepto básico en Biología que los organismos inmaduros o en desarrollo son más susceptibles a cambios que los que están maduros o completamente desarrollados. Esto implica que una mayor susceptibilidad se extiende durante todo el desarrollo, esto es, desde la fertilización hasta la maduración postnatal, aunque no

necesariamente a un nivel constante (Stockard, 1921).

3. - Los agentes teratogénicos actúan de manera específica (mecanismos) sobre el desarrollo celular y de tejidos para provocar anomalías en la embriogénesis (patogénesis).

En la actualidad se dice que hay ocho mecanismos que influyen en el desarrollo de anomalías. Estos mecanismos son; mutaciones, ruptura de cromosomas, interferencia mitótica, alterar la función o integridad de los ácidos nucleicos, falta de precursores, substratos, etc., alteraciones en los recursos de energía, cambios en la membrana, e inhibición enzimática (Wilson, 1973).

4. - La manifestación final en el desarrollo anormal es la muerte, malformaciones, retardo en el crecimiento, y desórdenes funcionales.

Después de iniciada la organogénesis es relativamente fácil inducir malformaciones en órganos específicos y sistemas, debido, a la alta sensibilidad de la mayoría de los tejidos durante la organogénesis esto hace que el embrión sea susceptible de morir. Además una necrosis celular menor que la cantidad necesaria para provocar la muerte del embrión podrían ser el resultado tardío, de un retardo en el crecimiento para proporcionar el tiempo requerido para reponer las células perdidas.

Una deficiencia funcional, ordinariamente no se esperaría que fuera seguida por la producción de algún daño durante la organogénesis porque la histogénesis y la maduración funcional no son aspectos eminentes del desarrollo en este tiempo. Sin embargo, esto ha sido reportado (Spyker, 1975), y podría ser explicado como resultado del no reabastecimiento de las células dañadas o de otros trastornos en tejidos.

Retardos en el crecimiento, particularmente se esperan después de daños ocasionados durante el periodo fetal, el cual está totalmente caracterizado por el crecimiento. Para la cuarta manifestación de desarrollo anormal las malformaciones (patogénesis) tal vez, es la mejor comprendida, en términos del agente causal y tiempo de inducción (Wilson, 1973).

5. - La importancia de los factores ambientales adversos en el desarrollo de tejidos depende de la naturaleza del agente.

Básicamente hay dos vías de acceso por las cuales las influencias ambientales pueden alcanzar los tejidos en desarrollo dentro del útero: directamente atravesando el cuerpo materno o siendo indirectamente transmitido a través de este (Wilson, 1973).

Agentes químicos o sus productos, en realidad, tienen contacto con el embrión o feto en alguna fracción de su concentración en la sangre materna. Si el embrión o el feto tienen contacto con una concentración considerable del compuesto químico, esto depende de muchas variables. La primera de estas es la dosis materna y el grado de absorción dentro del flujo sanguíneo, la cual se vuelve dependiente de la forma física del agente (sólido, líquido o gas), de la vía de entrada, u otras. (Wilson, 1973).

La placenta, es capaz de actuar como una barrera detrás de la cual el descendiente es protegido de los agentes químicos externos. Sin embargo, hay evidencias que indican virtualmente que todos los químicos dentro del plasma materno tienen acceso al producto a través de la placenta. Muchas moléculas de tamaño pequeño y baja carga iónica atraviesan por simple difusión, otros por difusión facilitada, transporte activo, o por pinocitosis. La pregunta no es si una molécula o un ion atraviesan la placenta sino en que grado lo hacen, esto está determinado por su tamaño, carga, solubilidad de los lípidos, afinidad con otros químicos, etc. (Wilson, 1973).

6. - La manifestación de desviaciones en el desarrollo se incrementa cuando el grado de la dosis incrementa, desde el no-efecto hasta un nivel letal.

Para la evaluación segura de una nueva droga es muy importante conocer el rango de dosis por debajo del cual no existen efectos adversos. Si esto es cierto, esto permite que los compuestos puedan ser usados a dosis más altas con un relativo umbral de dosis sin efectos. Si esto no ocurre no hay un nivel totalmente seguro, cuando la dosis decrece la probabilidad de efectos adversos también decrece, pero teóricamente no se alcanza el cero hasta que la dosis es nula (Wilson, 1973).

III. JUSTIFICACIÓN

En la Facultad de Química de la UNAM desde hace algunos años se han venido desarrollando una serie de fármacos antineoplásicos con centro metálico de cobre llamados *Casiopeínas*. Los estudios preliminares han mostrado que las *Casiopeínas* son capaces de inhibir el crecimiento celular *in vitro* de líneas celulares HeLa, mostrando una curva dosis respuesta similar a la de la Mitomicina-C y al Cisplatino, con la ventaja de tener una toxicidad menor a estas. Debido a que el Instituto Nacional de Cancerología ha considerado la posibilidad de su uso en humanos, se deben de cubrir todos los aspectos experimentales previos a esta etapa.

Debido a que la toxicidad de las drogas es causa importante de efectos colaterales indeseables en los pacientes a los que se les están practicando quimioterapias intensivas por tumores malignos, la investigación toxicología clínica de las drogas anticancerígenas es, de fundamental importancia. Para poder llegar a su uso clínico se requieren una serie de estudios preclínicos, los cuales tienen por objeto; 1) Excluir de los ensayos clínicos los compuestos cuya toxicidad pudiera hacerlos inadmisibles; 2) Proveer datos farmacológicos a partir de los cuales pueda calcularse una dosis clínica inicial, y 3) Suministrar datos sobre la naturaleza de la toxicidad en animales, sus variaciones dentro y entre las especies y su reversibilidad, y la frecuencia de incidencia de un signo tóxico (Creaven y Mihich, 1978).

Por lo tanto, en el presente trabajo se decidió realizar estudios de toxicología reproductiva administrando Casiopeína IIgly - Acua(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) (glicina) cobre (II) Nitrato; (Cas IIgly), en ratones hembra y gestantes de la cepa CD-1, de dos a tres meses de edad para estudiar su posible efecto (s) teratogénico (s).

IV. HIPÓTESIS

Es bien conocido que fármacos anticancerígenos (como por ejemplo el Cisplatino), son teratógenos, debido a que atacan de manera inespecífica al embrión o al feto, los cuales tienen una alta tasa de proliferación celular.

Se ha demostrado que la Casiopeína Igly es citotóxica y produce daño al ADN similar a lo observado con el Cisplatino (compuesto de actividad teratogénica reconocida), pero con una toxicidad menor (Ruíz-Azuara, 1992). Por lo tanto, se esperaría que el tratamiento con Casiopeína Igly en las hembras preñadas fuera mejor tolerado, produciendo un bajo porcentaje de mortalidad en las hembras gestantes, lo cual permitirá la obtención de fetos vivos en el día 18 de gestación para poder estudiar las posibles malformaciones congénitas; estructurales y esqueléticas en caso de que la Casiopeína Igly fuera teratogénica.

V. OBJETIVOS

1. Objetivo General

Analizar el posible efecto teratogénico de la Casiopeína IIgly al ser administrada, de manera crónica, a ratones hembra gestantes de la cepa CD-1, durante el período de organogénesis del desarrollo embrionario.

2. Objetivos Particulares

- Estudiar la posible toxicidad materna en las hembras gestantes tratadas con diferentes dosis de casiopeína IIgly (2.2, 3.3 y 4.4 mg/kg) durante el período de preñez.
- Evaluar el efecto de la Casiopeína IIgly administrando diferentes dosis sobre el desarrollo embrionario y fetal, analizando las posibles malformaciones gruesas.
- Evaluar el tipo y frecuencia de alteraciones esqueléticas inducidas por las diferentes dosis de Casiopeína IIgly en los fetos de las hembras tratadas.

VI. MATERIAL Y METODOS

Compuesto.

La casiopeína Ilgly - Acua (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) (glicina) cobre (II) Nitrato utilizada en el presente estudio fue proporcionada por el Departamento de Química Inorgánica y Nuclear a cargo de la Dra. Lena Ruiz Azuara en la Facultad de Química de la UNAM.

Animales.

Se utilizaron ratones hembras y machos de la cepa CD-1 de dos meses a tres meses de edad, los cuales se obtuvieron de la Unidad de Experimentación Animal de la Facultad de Química de la UNAM (Bioterio UNAM-Harlan). Los animales se aclimataron durante una semana antes del tratamiento en el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza en condiciones controladas de bioterio luz-oscuridad, con agua y alimento a libre acceso. En todos los casos las hembras fueron de edades (2 a 3 meses) y pesos similares (20-25 gramos).

Tratamientos y Rutas de Administración.

La casiopeína Ilgly se administro durante todo el período de organogénesis (día 6 hasta el día 15 de gestación), por vía intraperitoneal (ip) partiendo de la dosis letal media calculada para la Cas Ilgly (LD₅₀, 8.8 mg/kg por vía ip, García, *et al.*, 1995). En este proyecto se trabajo con las siguientes dosis; 2.2 mg/kg de peso, 3.3 mg/kg de peso, y 4.4 mg/kg de peso corporal.

Cruzas.

Durante la noche los animales fueron puestos a cruzar en una proporción de dos hembras por macho. A la mañana siguiente cada hembra fue examinada para detectar la presencia del tapón vaginal. La presencia de tapón se considero como el día cero de preñez.

Grupos.

Se utilizaron 5 grupos, cada uno, con 10 hembras gestantes. Dos lotes testigo; uno tratado con agua destilada (grupo control negativo) y otro tratado con Cadmio 5 mg/kg, un teratógeno conocido (grupo control positivo). Tres grupos experimentales tratados con tres diferentes dosis (2.2, 3.3 y 4.4 mg/kg) de Cas Ilgly. Los animales se asignaron de manera aleatoria a cada lote.

Obtención de los Fetos.

Todas las hembras se pesaron y revisaron diariamente hasta su sacrificio. En el día 18 de gestación se sacrificaron por dislocación cervical y se expusieron los úteros para iniciar el siguiente análisis.

Datos registrados para evaluar Toxicidad materna y Embriotóxicidad.

1. Signos de Toxicidad materna:

Mortalidad

Peso

2. Signos de Embriotoxicidad

Número de fetos totales

Número de reabsorciones

Peso fetal por camada

Peso promedio por feto

Número de implantes totales

Número de fetos vivos

Número de fetos muertos

Genero de los fetos

Malformaciones Macroscópicas y Esqueléticas.

Los fetos obtenidos fueron revisados individualmente para registrar la frecuencia y tipo de malformación macroscópica presente, así como medir la longitud de los fetos por genero.

De los fetos obtenidos 2/3 partes de los fetos se fijaron con alcohol al 70% para posteriormente teñir el esqueleto. Los fetos restantes se preservaron para análisis posteriores.

Técnica de doble Tinción para esqueleto de fetos de ratón para estudios teratológicos (Whitaker y Kathaleen, 1979).

De cada feto se retiraron las vísceras abdominales y el tejido adiposo para posteriormente fijarlos en etanol al 70% por 24 horas como mínimo, después se tiñeron por 24 horas con la siguiente solución a 37 °C.

1 Vol.- de azul alciano al 0.3% en etanol al 70% (filtrado)

1 Vol.- de rojo de alizarina al 0.1% en etanol al 95% (filtrado)

1 Vol. - de ácido acético glacial

17 Vol.- de etanol al 70%

Después de las 24 horas en la solución de tinción, se enjuagaron 3 veces con agua destilada y se colocaron en una solución de KOH al 3% por 24 a 72 horas hasta que el esqueleto fue visible a través del tejido graso. Posteriormente se hicieron tres cambios en agua destilada y se colocaron en partes iguales de glicerina y etanol al 70% hasta aclarar y finalmente se dejaron en glicerina pura para observación y preservación.

El análisis del esqueleto en los fetos incluye:

- Conteo de los metatarsos y metacarpios
- Número y forma de pares de costillas
- Número y forma de las esternobras
- Número y forma de las vértebras

Registro y Análisis Estadístico de los datos.

Se calculó la media para cada grupo y se utilizó el software Statgraphics. Los datos de los grupos testigo y de los grupos experimentales se analizaron de la siguiente manera: El peso materno se comparó por medio de un análisis de covarianza. El peso fetal y el peso por camada se analizaron por un análisis de varianza seguida de la prueba de Kruskal-Wallis. La sobrevivencia fetal y la incidencia de anomalías macroscópicas se registró haciendo una estimación de proporciones con un intervalo de confianza del 95%. Las malformaciones esqueléticas se registraron como porcentajes de fetos por grupo.

VII. RESULTADOS

Embriotoxicidad

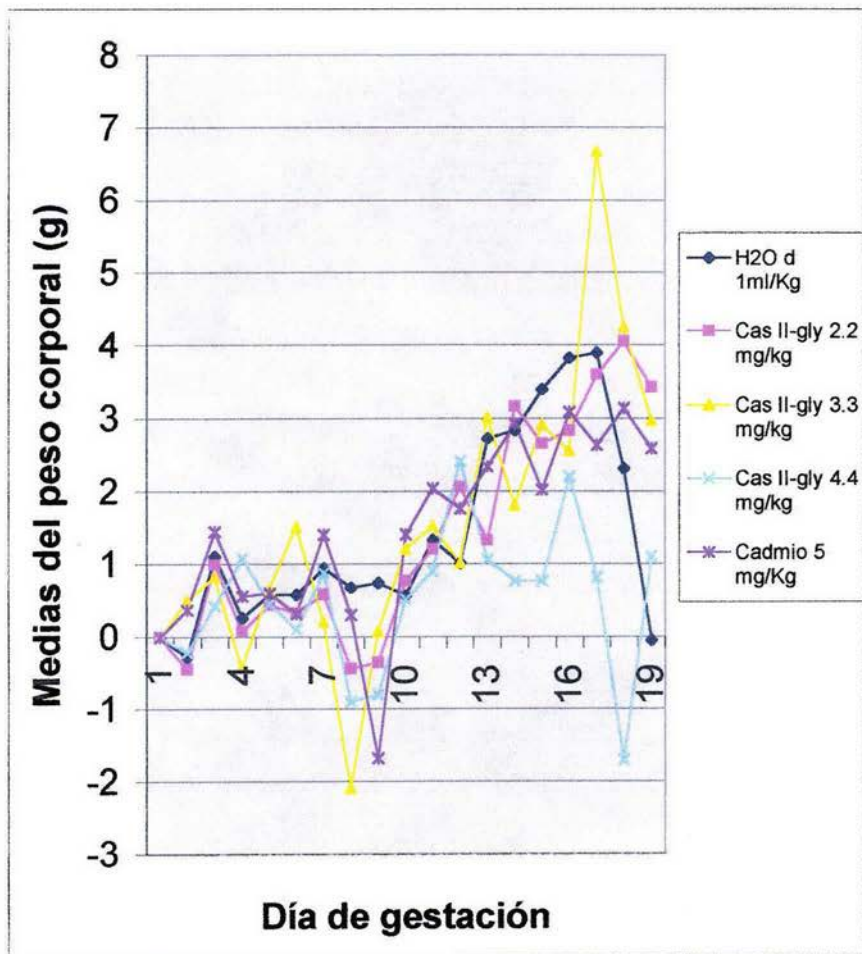
En la tabla 1 y en la gráfica 1 se pueden observar los cambios de peso corporal durante el período de gestación. La ganancia de peso corporal en las hembras gestantes de los grupos tratados con 2.2 ó 3.3 mg/kg de Casiopeína IIgly y con 5 mg/kg de cadmio, fueron semejantes al grupo testigo negativo (ganancia promedio de 1.51 g por día de gestación), mientras que para el grupo tratado con 4.4 mg/kg de Casiopeína IIgly, el promedio disminuyó (0.54 g por día, $P < 0.05$).

TABLA 1. TOXICIDAD MATERNA

	Testigo negativo (H ₂ O)	Cas IIgly	Cas IIgly	Cas IIgly	Testigo positivo (CdCl ₂)
Dosis (mg/kg)	1 ml/Kg	2.2	3.3	4.4	5
No. de hembras preñadas por grupo	10	10	10	10	10
No. de hembras preñadas con camada por grupo	10	10	10	5	10
Media del Peso ganado (grs.) durante el período de gestación.	26.48	26.32	29.25	9.86*	27.29
Ganancia de peso (grs.) en las hembras preñadas del día 6-15 de gestación (X ± D.E).	17.13 ± 3.03	13.24 ± 4.35	12.77 ± 5.72	6.92 ± 4.02*	14.21 ± 4.86

* $P < 0.05$

GRÁFICA 1. GANACIA DE PESO EN HEMBRAS PREÑADAS DEL DÍA 0-18 DE GESTACIÓN.



Una vez disectados los cuernos uterinos al realizar el análisis se observó que para el grupo tratado con la máxima dosis de Cas IIgly hubo una disminución significativa en el promedio de los sitios de implantación y en la media del total de fetos obtenidos por camada fue menor en comparación con los demás grupos.

El análisis de las muertes tempranas de los embriones o fetos en los grupos tratados y testigo y reportadas como reabsorciones se muestran en la tabla 2. En este caso se encontró que el mayor número de reabsorciones fue en los grupos tratado con 4.4 mg/kg de Cas IIgly y en el grupo tratado con Cadmio.

En la tabla 2 también se muestra el porcentaje de fetos vivos totales obtenidos al momento de la cesárea, observando que fue similar para todos los grupos tratados con Casiopeína IIgly y el grupo control negativo (del 97-100% en todos los casos), mientras que hubo una disminución del 10% para el grupo control positivo tratado con Cadmio.

TABLA 2 DE EMBRIOTOXICIDAD: DATOS OBTENIDOS AL MOMENTO DE LA CESAREA DE HEMBRAS TRATADAS CON CASIOPEÍNA IIGLY DURANTE EL DÍA 6 AL 15 DE GESTACIÓN.

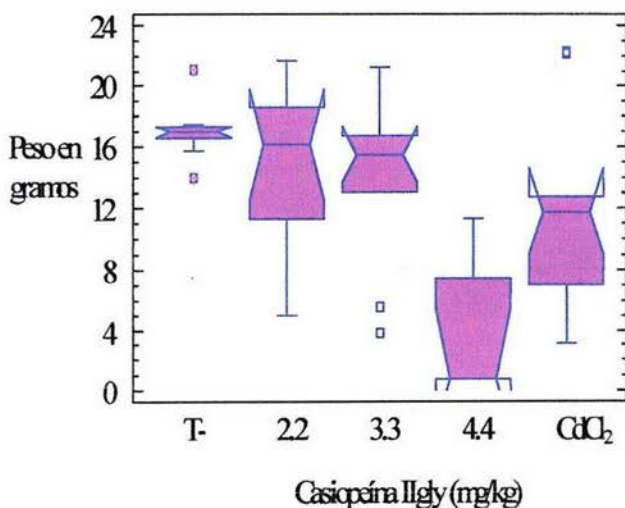
	Testigo negativo (H ₂ O _d)	Cas IIgly	Cas IIgly	Cas IIgly	Testigo positivo (CdCl ₂)
Dosis (mg/kg)	1 ml/kg	2.2	3.3	4.4	5
Número de implantes por camada (X ± D.E).	12.8 ± 1.55	15 ± 2.36	12.3 ± 4.74	*8 ± 1.87	13.4 ± 4.95
Numero total de fetos obtenidos por camada (X ± D.E).	12.6 ± 1.65	12.2 ± 3.58	11.0 ± 4.14	*3 ± 4.24	9.3 ± 5.25
Fetos vivos (X ± D.E).	12.3 ± 1.77	11.9 ± 3.79	10.8 ± 4.0	3 ± 4.24	*8.5 ± 5.90
Fetos muertos (X ± D.E).	0.3 ± 0.67	0.1 ± 0.32	0.2 ± 0.42	0	*0.8 ± 1.55
Reabsorciones (X ± D.E).	0.2 ± 0.42	2.9 ± 2.4	1.3 ± 1.41	*5 ± 3.32	*4.1 ± 3.79
Peso por camada (grs.) (X ± D.E).	17.0 ± 1.74	15.32 ± 5.0	13.92 ± 5.32	*4.2 ± 4.9	11.78 ± 6.40
Peso por feto vivo (grs.) (X ± D.E).	1.36 ± 0.13	1.06 ± 0.17	1.26 ± 0.13	1.24 ± 0.67	1.18 ± 0.14

* P < 0.05 con la prueba de Kruskal-Wallis vs el grupo testigo negativo

El análisis del porcentaje de fetos a término muertos, mostró que para los grupos tratados con 2.2 ó 3.3 mg/kg de Cas Ilgly y para el grupo control tratado con agua destilada, fue del 1-3%, mientras que para el grupo tratado con la mayor dosis de Casiopeína Ilgly no hubo fetos muertos y el grupo tratado con Cadmio tuvo el mayor porcentaje de fetos muertos.

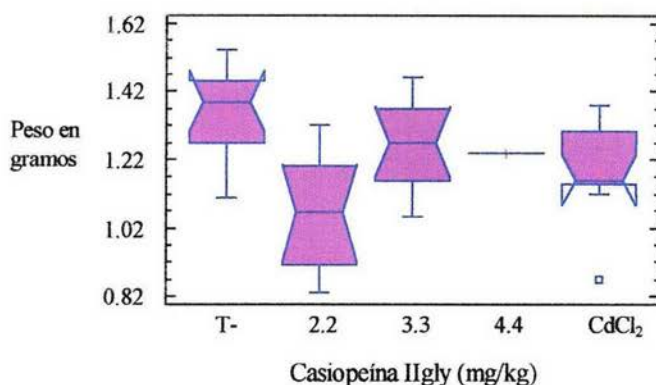
Con respecto a los pesos por camada se encontró que hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas de los 5 grupos con un 95% de confianza. Para comparar que mediana(s) era significativamente diferente de las otras, se empleo el diagrama de cajas y bigotes (gráfica 2) y se encontró que había una diferencia significativa del grupo tratado con 4.4 mg/kg Cas Ilgly con respecto al grupo testigo negativo y a los grupos tratados con 2.2 o 3.3 mg/kg de Cas Ilgly.

Gráfica 2 de Cajas y Bigotes para peso de camada por grupo.



[Testigo negativo= agua destilada; CdCl₂=5 mg/kg]

Gráfica 3 de Cajas y bigotes para peso fetal por grupo..



[Testigo negativo= agua destilada; CdCl₂=5 mg/kg]

En la gráfica 3 de cajas y bigotes se puede observar, que para el peso fetal por grupo no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos tratados con Cas IIgly y los grupos testigo.

Anormalidades estructurales macroscópicas externas.

Los fetos observados se evaluaron bajo los criterios del glosario internacional de términos para el desarrollo de anomalías estructurales en animales de laboratorio (1° versión) (Wise *et al.*, 1997).

En la tabla 3, se mencionan las anomalías macroscópicas observadas en los fetos analizados y separados por género. Los efectos teratogénicos observados con mayor frecuencia fueron los siguientes:

En el grupo tratado con 2.2 mg/kg Cas IIgly se encontró que; 6 fetos machos (11.53%) y 1 feto hembra (1.53%) presentaron micromelia, extremidad desproporcionalmente corta o pequeña, mientras que en el grupo tratado con 3.3 mg/kg; 5 fetos machos (7.93%) y 3 fetos hembra (6.38%) presentaron la misma anomalía.

Por otro lado se observó la presencia de extremidades mal rotadas, extremidad rotada hacia el centro o la periferia. En el grupo tratado con 3.3 mg/kg; 3 machos (4.61%) y 4 hembras (6.34%) presentaron esta alteración, mientras que en el grupo

tratado con 2.2 mg/kg de Cas IIgly hubo un feto macho (1.92 %) y 3 fetos hembra (4.61%) con la extremidad mal rotada (Foto 1).

Otra anomalía observada fue la extremidad hiperextendida, extensión excesiva de la pata. En la dosis de 2.2 mg/kg hubo un feto macho (1.92%) y 3 fetos hembra (4.61%) mientras que en la dosis de 3.3 mg/kg se observaron 3 fetos macho (4.61%) y un feto hembra (1.58%).

En la dosis de 3.3 mg/kg, 5 fetos hembra (7.93%) y 1 feto macho (1.53%) tuvieron cola enroscada.

Las siguientes malformaciones se encontraron en un solo feto del total de fetos revisados por grupo, para el grupo tratado con 2.2 mg/kg se observó; macho con exencefalia, protuberancias del cerebro fuera del cráneo, macho con criptofalmia, no hay formación del párpado, macho con hiperflexión de una extremidad, doblamiento excesivo de una extremidad o unión, hembra con braquidactilia (dígito acortado), hembra con cola enroscada, macho con cola doblada. En el grupo tratado con 3.3 mg/kg se observó; macho con amelia, ausencia total de uno o más miembros, macho con braquidactilia, hembra con sindactilia, fusión del tejido entre los dígitos (Foto 2), hembra con cola doblada, hembra con cola en forma de gancho (Foto 2).

En el grupo que recibió la dosis más alta (4.4 mg/Kg) no se observaron malformaciones gruesas. El grupo testigo tratado con agua destilada inyectable, no presentó ningún tipo de efecto, mientras que el grupo tratado con Cadmio mostró un alto porcentaje de malformaciones macroscópicas ya que el 100% de las camadas obtenidas se vieron afectadas por el compuesto.

TABLA 3. ANORMALIDADES MACROSCÓPICAS EN FETOS DE RATÓN DE LA CEPA CD1 DE HEMBRAS GESTANTES TRATADAS CON CASIOPEÍNA II-GLY DEL DÍA 6-15 DE GESTACIÓN.

	Testigo negativo	Cas IIgly	Cas IIgly	Cas IIgly	Cd Cl ₂
Dosis (mg/Kg)	1 ml/Kg	2.2	3.3	4.4	5
Fetos revisados	120	117	110	15	91
Total de camadas afectadas (%)	0	*8/10 (80)	*7/10 (70)	0	10/10 (100)
Fetos con al menos una malformación (%**):					
♂	0	*9 (17)	*15 (24)	0	22 (59)
♀	0	*9 (14)	*5 (11)	0	34 (63)
CRÁNEO (%):					
Exencefalia:					
♂	0	*1 (1.92)	0	0	17 (45.9%)
♀	0	0	0	0	23 (42.59)
OJOS (%):					
Ciclopia:					
♂	0	0	0	0	0
♀	0	0	0	0	1 (1.85)
Criptofthalmia:					
♂	0	*1 (1.92)	0	0	5 (13.5)
♀	0	0	0	0	8 (14.81)
Exoftalmia					
♂	0	0	0	0	0
♀	0	0	0	0	2 (3.70)
BOCA (%)					
Macroglosia					
♂	0	0	0	0	7 (18.91)
♀	0	0	0	0	18 (33.3)
Macrognatia					
♂	0	0	0	0	3 (8.10)
♀	0	0	0	0	4 (7.40)
Microglosia					
♂	0	0	0	0	1 (2.70)
♀	0	0	0	0	1 (1.85)
EXTREMIDADES (%):					
Micromelia					
♂	0	*6 (11.53)	*5 (7.93)	0	7 (18.91)
♀	0	*1 (1.53)	*3 (6.38)	0	14 (25.92)
Macromelia					
♂	0	0	0	0	1 (2.70)
♀	0	0	0	0	1 (1.85)
Malrotada					
♂	0	*1 (1.92)	*3(4.61)	0	0
♀	0	*3 (4.61)	*4 (6.34)	0	1 (1.85)
Hiperextendida					
♂	0	*1(1.92)	*3 (4.61)	0	0
♀	0	*3 (4.61)	*1 (1.58)	0	0

Hiperflexión					
♂	0	*1 (1.92)	0	0	0
♀	0	0	0	0	0
Amelia					
♂	0	0	0	0	0
♀	0	0	0	0	0
PATA/DIGITOS (%):					
Ectrodactilia					
♂	0	0	0	0	1 (2.70)
♀	0	0	0	0	0
Braquidactilia					
♂	0	0	*1 (1.53)	0	0
♀	0	*1 (1.53)	0	0	0
Sindactilia					
♂	0	0	0	0	0
♀	0	0	*1 (1.58)	0	0
COLA (%):					
Enroscada					
♂	0	0	*1 (1.53)	0	0
♀	0	*1 (1.53)	*5 (7.93)	0	0
Doblada					
♂	0	*1 (1.92)	0	0	0
♀	0	0	*1 (1.58)	0	0
Forma de gancho					
♂	0	0	0	0	0
♀	0	0	*1 (1.58)	0	0

* Intervalo de confianza del 95%

** El porcentaje de malformaciones macroscópicas es, en relación del total de fetos por género observados (Tabla 4) y no en relación del total de fetos observados por grupo.

Al analizar los datos de las malformaciones por sexo (Tabla 3), se encontró que el grupo tratado con 2.2 mg/kg obtuvo el mismo número de hembras y machos afectados y el 80% de las camadas fueron afectadas por el compuesto, mientras que el grupo tratado con 3.3 mg/kg se observó que los fetos machos fueron más susceptibles de daño que los fetos hembra y el 70% de sus camadas fueron afectadas.

Haciendo una estimación de proporciones con un intervalo de confianza del 95% para anomalías macroscópicas, se encontró que la Cas Ilgly administrada en dosis de 2.2 o 3.3 mg/kg de Cas Ilgly ocasiona malformaciones macroscópicas en una cantidad significativa en fetos de ratón (CD1) (Tabla 3).

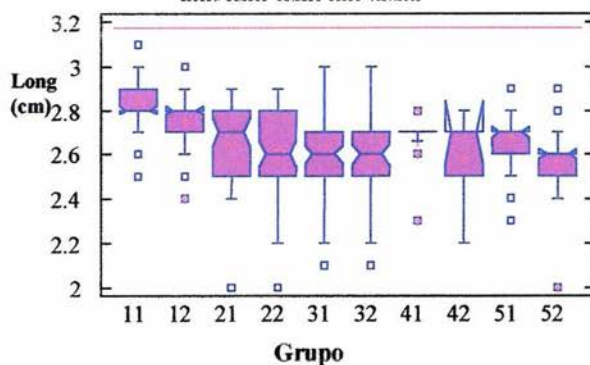
Por otro lado, aplicando la prueba de Kruskal-Wallis, se demuestra que hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas de la longitud de los fetos entre el grupo control positivo de machos y el grupo control negativo de hembras con un 95% de confianza (Tabla 4 y Gráfica 4). No hubo diferencia en la longitud de los

TABLA 4. PROPORCIÓN DE SEXOS Y LONGITUD DE LOS FETOS

	Testigo negativo	Cas Ilgly	Cas Ilgly	Cas Ilgly	Cd Cl ₂
Dosis (mg/Kg)	1 ml/Kg	2.2	3.3	4.4	5
Proporción de sexos:					
♂	55 (46%)	52 (44%)	63 (57%)	10 (66%)	37 (41%)
♀	65 (54%)	65 (56%)	47 (43%)	5 (34%)	54 (59%)
Longitud fetos (cm) (X ± D.E.)					
♂	*2.8 ± 0.11	2.64 ± 0.17	2.63 ± 0.15	2.66 ± 0.13	2.67 ±
♀	2.74 ± 0.12	2.61 ± 0.18	2.58 ± 0.18	2.58 ± 0.61	*2.56 ± 0.14

* P < 0.05 con la prueba de Kruskal-Wallis vs el grupo testigo negativo

**Gráfica 4 de Cajas y Bigotes.
Longitud fetal por sexo.**



(11= ♂♂ T-; 12= ♀♀ T-; 21= ♂♂ 2.2 mg/kg; 22= ♀♀ 2.2 mg/kg; 31= ♂♂ 3.3 mg/kg; 32= ♀♀ 3.3 mg/kg; 41= ♂♂ 4.4 mg/kg; 42= ♀♀ 4.4 mg/kg; 51= ♂♂ 5 mg/kg, CdCl₂; 52= ♀♀ 5 mg/kg, CdCl₂).

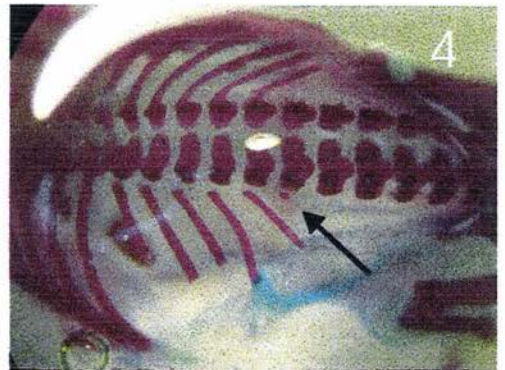
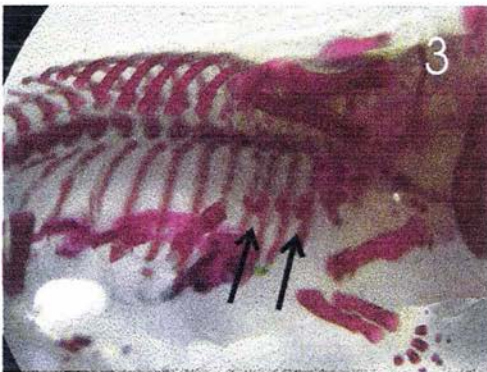
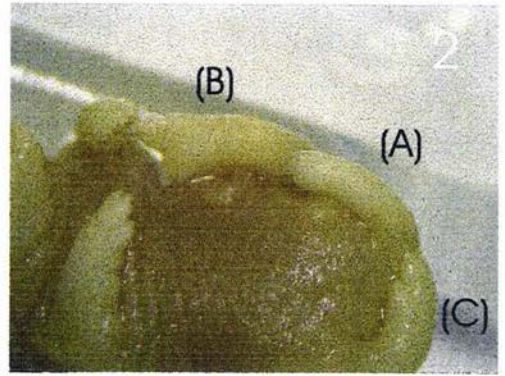
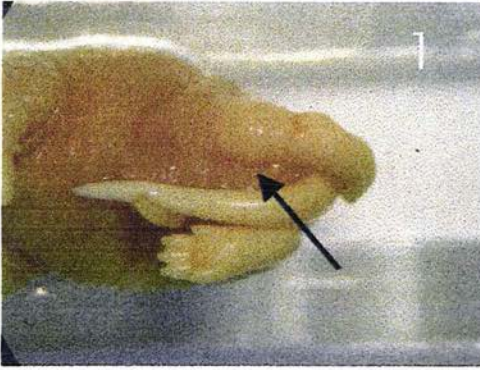


Foto 1.- Extremidad malrotada

Foto 2.- (A) Cola en forma de gancho, (B) Sindactilia
y (C) Extremidad mal rotada

Foto 3.- Esternebras asimétricas

Foto 4.- Costilla supernumeraria rudimentaria

Anormalidades Esqueléticas

En la tabla 5, se muestran los porcentajes de anomalías esqueléticas analizadas por tratamiento. En todos los grupos analizados se observaron variaciones esqueléticas, encontrando que a mayor dosis mayor porcentaje de fetos malformados y mayor frecuencia de camadas alteradas.

En el grupo tratado con 2.2 mg/kg de la Cas Ilgly, se observaron por lo menos una malformación en el 36.84% del total de fetos observados de las cuales; el 13.55% correspondió a la presencia de costillas supernumerarias, el 7.89% a costillas rudimentarias (Foto 4), el 5.26% a costillas cortas, el 10.52% a esternebras rudimentarias, el 15.78% a esternebras asimétricas (Foto 3) y el 5.26% a esternebras divididas asimétricamente.

Cuando se analizó el grupo tratado con 3.3 mg/kg de Cas Ilgly, en el 65% del total de fetos se registró algún tipo de malformación esquelética. En este caso el 36.92% presentaban costillas supernumerarias, el 18.46% costillas rudimentarias, el 15.38% costillas cortas, el 4.61% esternebras supernumerarias, el 3.07% esternebras en forma de pesa, el 12.30% esternebras rudimentarias, el 23.07% esternebras asimétricas, el 3.07% esternebras divididas asimétricamente y el 1.53% tenían vértebras lumbares revueltas.

Para el grupo tratado con 4.4 mg/kg de Cas Ilgly, se observó que el 90% del total de fetos revisados presentaron, al menos, un tipo de malformación esquelética. En este caso el 80% presentó costillas supernumerarias, el 50% costillas rudimentarias y cortas, el 10% esternebras supernumerarias, el 20% esternebras en forma de pesa, el 3% esternebras rudimentarias y el 50% con esternebras divididas asimétricamente.

El grupo testigo positivo tratado con cadmio presentó el 75% del total de fetos observados con alguna malformación esquelética y en el grupo testigo negativo el 22.5% del total de fetos observados presentaron al menos una malformación esquelética.

TABLA 5. EFECTO DE LA CASIOPEÍNA II-GLY SOBRE EL SISTEMA ESQUELETICO EN FETOS DE RATÓN DE LA CEPA CD1 DE 18 DÍAS DE GESTACIÓN

	Testigo negativo	Cas II-gly	Cas II-gly	Cas II-gly	CdCl ₂
Dosis ml/Kg	1 ml/Kg	2.2	3.3	4.4	5.0
Fetos revisados	80	76	65	10	44
No. fetos con al menos una malformación esquelética (%)	18 (22.5)	28 (36.84)	43 (65)	9 (90)	33 (75)
No. Camadas con malformación	7/10	9/10	9/10	2/2	10/10
Costillas (%):					
Supernumerarias	7 (8.75)	10 (13.15)	24 (36.92)	8 (80)	6 (13.63)
Fusionadas	0	0	0	0	12 (27.27)
Rudimentarias	5 (6.25)	6 (7.89)	12 (18.46)	5 (50)	3 (6.81)
Cortas	2 (2.5)	4 (5.26)	10 (15.38)	5 (50)	7 (16.0)
Esternebras (%):					
Supernumerarias	4 (5)	0	3 (4.61)	1 (10)	3 (6.81)
Forma de pesa	3 (3.75)	0	2 (3.07)	2 (20)	1 (2.27)
Rudimentarias	4 (5)	8 (10.52)	8 (12.30)	3 (30)	3 (6.81)
Cortas	0	0	0	0	0
Asimétricas	4 (5)	12 (15.78)	15 (23.07)	5 (50)	12 (27.27)
Asimétricamente divididas	0	4 (5.26)	2 (3.07)	0	3 (6.81)
Revueltas	0	0	0	0	1 (2.27)
Vértebras (%):					
Rudimentarias	1 (1.25)	0	0	0	1 (2.27)
Revueltas	0	0	1 (1.53)	0	0
Asimétricas	0	0	0	0	10 (22.72)
Fusionadas	0	0	0	0	4 (9.09)

VIII. DISCUSION

Una recopilación de los datos de embriotoxicidad, se muestran en la tabla I. Las hembras tratadas con dosis de 2.2 o 3.3 mg/kg de Cas IIgly no ocasionaron toxicidad materna, por lo cuál, se puede considerar a estas dosis como niveles en los que no se presentan efectos adversos, NOAEL, por sus siglas en ingles (No-Observed-Adverse-Effect-Level), en hembras preñadas. Pero si se encontró que la dosis 2.2 mg/kg fue embriotóxica ya que provocó un bajo peso en los fetos.

La dosis más alta (4.4 mg/kg) de Cas IIgly administrada en las hembras preñadas de la cepa CD1, mató al 50% de las hembras y se observó que hubo una reducción en la ganancia de peso en el día 18 de gestación. Este nivel de dosis tiene una alta toxicidad materna y se debe evitar en los estudios de toxicología del desarrollo, ya que no proporcionó información sobre los efectos en la descendencia (Farr *et al.*, 2001) a nivel de malformaciones macroscópicas.

Se observó mortalidad embrionaria o fetal (reabsorciones) en los dos grupos testigo y en los tres grupos tratados con Cas IIgly, pero hubo un incremento en la dosis de 4.4 mg/kg y en el grupo tratado con Cadmio, lo cual indica que estas dosis son altamente tóxicas para el producto en gestación. Una característica frecuente entre los agentes xenobioticos que son tóxicos en los estados de pre-grastrulación (d.g.6), es que son letales para el embrión esto ocurre poco después de la implantación. Ciertos agentes, sin embargo, también inducen letalidad pero en un momento tardío de la gestación, mientras que otros inducen malformaciones anatómicas en fetos vivos no asociada a muerte fetal (Rutledge, 1997). También las dosis de 2.2 y 3.3 mg/kg de Casiopeína IIgly provocaron muerte embrionaria y fetal (reabsorciones), además de inducir malformaciones anatómicas y esqueléticas

El haber encontrado reabsorciones en el grupo control negativo indica que puede haber reabsorciones espontáneas en el ratón pero en un porcentaje mínimo. Todo esto nos dice, que nuestro sistema de experimentación funcionó adecuadamente.

Un incremento en las reabsorciones se clasifica como un efecto a nivel del embrión, por ejemplo; el Cisplatino relacionado con reabsorciones en la rata puede deberse a un decremento en las concentraciones hormonales, disfunciones de la placenta, o en efectos directos sobre el embrión (Bajy, 1985; Muranaka *et al.*, 1993),

pudiendo ser el caso de la Cas Ilgly y una reducción en el peso fetal, se clasifica como un signo de retraso en el crecimiento intrauterino (Chung, 1998).

Los efectos embriotoxicos observados se pueden interpretar como el resultado de una acción directa o indirecta (e.j. toxicidad materna) (Chung, 1998), de la Cas Ilgly.

ANORMALIDADES ESTRUCTURALES MACROSCÓPICAS EXTERNAS.

La Casiopeína Ilgly tiene potencial teratogénico, debido a que los fetos presentaron susceptibilidad a la inducción de malformaciones (Tabla 3 y 5) pero no se sabe en que etapa de la organogénesis ya que la Casiopeína Ilgly fue administrada durante todo este período.

En el grupo tratado con 2.2 mg/kg de Cas Ilgly se encontraron nueve diferentes tipos de malformaciones macroscópicas: exencefalia, criptoftalmia, micromelia, extremidad (malrotada, hiperextendida e hiperflexionada), braquidactilia y cola (enroscada y doblada). De estas nueve malformaciones se reporta en la literatura que la exencefalia puede ocurrir de manera espontánea en el ratón (CD1) en 0.06% (Szabo, 1989), mientras que la Casiopeína Ilgly en esta dosis la ocasiono en 1.92% y también se reporta que la Criptoftalmia se puede presentar de manera espontánea en el ratón de la cepa CD1 en 0.08% (Szabo, 1989), mientras que la Criptoftalmia en el grupo tratado con 2.2 mg/kg de Cas Ilgly, se presento en 1.92%.

La micromelia fue la malformación que se encontró en mayor porcentaje en los grupos tratados con dosis de 2.2 o 3.3 mg/kg de Cas Ilgly. Por lo tanto, se puede decir que la micromelia en fetos de ratón CD1 es causada por la administración de Casiopeína Ilgly durante el período de organogénesis ya que una sola malformación dentro de un grupo de dosis baja normalmente no importaría y tal vez, se consideraría que hubiera ocurrido por casualidad, pero se vuelve significativa desde que el mismo defecto se presenta frecuentemente en dosis altas (Farr *et al.*, 2001). Malformaciones en las extremidades o en parte de ellas son variadas en sus manifestaciones, desde la ausencia de una sola estructura o la ausencia parcial o completa de las extremidades. Ellas pueden ocurrir como malformaciones primarias localizadas o generalizadas y defectos secundarios, usualmente en asociación con disturbios en el desarrollo de otros sistemas (Szabo, 1989).

En el grupo tratado con 3.3 mg/kg de Cas IIgly, también, se encontraron 9 tipos diferentes de malformaciones: micromelia, extremidad (malrotada e hiperextendida), amelia, braquidactilia, sindactilia y cola (enroscada, doblada y en forma de gancho).

No es común que la amelia ocurra de manera espontánea en el ratón (CD1) pero se puede presentar de manera espontánea en 0.3% y la reducción de las extremidades, micromelia, es comúnmente unilateral (Szabo, 1989). La sindactilia es un defecto genético común en el ratón (Grüneberg, 1963; Kalter, 1980) se sabe que 8 genes dominantes y 10 recesivos causan este defecto (Kalter 1980).

Defectos en la cola pueden ser muy diversos, desde una simple cola doblada, ondulada o reducida hasta ausencia de la cola o duplicación. En la literatura se reporta que hay malformaciones espontáneas en la cola del ratón (CD1) hasta en 1.1% (Szabo, 1989) y la Cas IIgly la produjo en un porcentaje mayor.

El no haber encontrado ningún feto con malformación macroscópica en el grupo tratado con la dosis más alta (4.4 mg/kg) de Cas IIgly, pudo haber dependido de las diferencias en la membrana placentaria, transporte placentario, biotransformación y la susceptibilidad genética del feto influyeron sobre el pronóstico final (Rutledge, 1997).

El mecanismo de acción de la Casiopeína IIgly ocupa un lugar muy importante en la serie de eventos entre el agente causante y la última expresión del desarrollo anómalo en fetos de ratón CD1. El mecanismo de acción de la Casiopeína IIgly puede ser *por alteración de la integridad y función de los Ácidos Nucleicos*. Este es el mecanismo de acción de muchas drogas antineoplásicas, al parecer también lo presentan las Casiopeínas, ya que se ha reportado que estas degradan al ADN (Huber *et al.*, 1987) además de producir especies reactivas de oxígeno (Ruíz-Azuara *et al.*, 1991). Esto interfiere con la replicación de los ácidos nucleicos, con la transcripción, con la incorporación de bases, y con la síntesis de proteínas (RNA translación) sin producir cambios heredables en el ADN de las células germinales (Wilson y Fraser, 1977).

Otro de los mecanismos de acción que pueden tener las Casiopeínas, tomando en cuenta que también son citotóxicas (Ostrosky, *et al.*, 1987) es que puede inhibir la síntesis de DNA, deteniendo o retrasando la mitosis, desde que el proceso no puede avanzar más allá de la fase S del ciclo celular (Wilson y Fraser, 1977).

Finalmente, los resultados indican que los fetos machos fueron más susceptibles que los fetos hembra a malformaciones gruesas a causa de la administración de Casiopeína Ilgly durante el período de organogénesis. En la literatura se reporta que hay diferencias de género en respuesta a sustancias tóxicas (Altamirano *et al.*, 1991), lo cuál, puede ser por alteraciones en el nivel de hormonas esteroides o alterar la función gonadal (LeBlanc *et al.*, 1992).

MALFORMACIONES ESQUELÉTICAS.

Todas las variaciones esqueléticas, retardos y malformaciones se describen de acuerdo a su forma, tamaño y posición.

En los dos grupos control y en los tres grupos de tratamiento se observó la presencia de costillas supernumerarias. Las costillas supernumerarias se clasificaron de acuerdo a su longitud pudiendo ser; rudimentarias, cortas o completamente desarrolladas. En la literatura se reporta que el ratón CD1 presenta de manera espontánea esta malformación esquelética en un 0.2% (Szabo, 1989).

Sin embargo al ir aumentando la dosis de Cas Ilgly, se observó que incremento la presencia de costillas supernumerarias y esto es un indicador de actividad teratogénica del fármaco (Taylor, 1986). Sin embargo se debe recordar que algunas drogas pueden causar malformaciones y pueden tener poco o ningún efecto sobre el número de costillas supernumerarias (Taylor, 1986).

Muchos teratólogos se han cuestionado la importancia de las desviaciones o variaciones esqueléticas, particularmente de las costillas supernumerarias que tienen importancia teratogénica (Palmer, 1968; Kimmel y Wilson, 1973). Se ha observado que la incidencia de estas costillas se fue incrementando significativamente al administrar ciertos agentes teratogénicos tales como: Exceso de Vitamina A (Yasuda y Maeda, 1972), actinomicina D y salicilato de sodio (Kimmel y Wilson, 1973).

En general, agentes que son potencialmente teratogénicos afectan varias partes del desarrollo fetal, produciendo un incremento mayor sobre la incidencia de costillas supernumerarias en comparación con los fetos control. Los agentes que tienen un débil o no potencial teratogénico no causan cambios apreciables en el número de costillas (Szabo, 1989).

Las esternebras pueden aumentar o disminuir en número, esta última es más importante (Taylor, 1986). La Cas Ilgly ocasionó esternebras supernumerarias y en forma de pesa en la dosis de 3.3 y 4.4 mg/kg. Las tres dosis de Cas Ilgly provocaron esternebras rudimentarias (pobre osificación) y asimétricas.

El tipo e incidencia de variaciones en las esternebras para ratón CD1 reportadas en la literatura es; asimétricas (4.9%), y divididas (3.7%), lo cual es mucho menor a lo que se reporta en la Tabla 5 para Cas Ilgly. Muchas de las variaciones en las esternebras se pueden atribuir a un retraso de la velocidad normal de osificación, mientras que otras se presume que se deben a disturbios en el desarrollo. Un marcado decremento en el peso fetal frecuentemente se relaciona con un retraso en la osificación de las esternebras (Fritz, 1975).

La formula de las vértebras (cervical/torácica/lumbar), reportada en la literatura para un 74.7% de ratones de la cepa CD1 es 7/13/6 respectivamente y 7/13/7 para el 25.3% (Szabo,1989). En los grupos a los cuáles se les administro Cas Il-gly se encontró que todos los fetos tenían 7 cervicales, 13 torácicas y 6 lumbares.

La anomalía en las vértebras que ocasiono la Cas Ilgly fue en la dosis de 3.3 mg/kg donde se observaron vértebras revueltas (1.53%) y en el grupo control negativo se observó vértebras rudimentarias en 1.25%.

El esqueleto vertebral, especialmente el número de vértebras, esta sometido a una variedad de cambios dependiendo de la región en la columna espinal. Hay buena evidencia de que el número de vértebras varia de acuerdo a la cepa (Green, 1954; Pennycuik, 1980).

Regresando a la evaluación del tipo y frecuencia de variaciones en las vértebras, en la bibliografía se reporta que; en el esqueleto de ratón se presenta una gran incidencia de estas variaciones más que la rata o el conejo. El tipo e incidencia de variaciones en la columna vertebral en el ratón CD1 es de 0.2% (Szabo, 1989).

IX. CONCLUSIONES

1. La Casiopeina Ilgly mostró ser embriotóxica debido a que incrementó la frecuencia de reabsorciones y disminuyó el peso fetal.
2. Los resultados para embriotoxicidad indican que los efectos adversos ocasionados por la Casiopeína Ilgly son sobre el producto más que en la madre.
3. El método de doble tinción para esqueleto utilizado en este trabajo no revela defectos intrínsecos del desarrollo del hueso.
4. Que el grupo control negativo no haya presentado ningún feto con malformación estructural y que el grupo control positivo haya presentado el mayor número de fetos malformes y once tipos diferentes de malformaciones en comparación con los resultados mencionados anteriormente. Se puede decir, que se pudo evaluar, de manera adecuada, el potencial teratogénico de la Cas Il-gly en ratones hembra de la cepa CD1.
5. La incidencia de varios tipos de malformaciones macroscópicas en las dosis de 2.2 y 3.3 mg/kg de Cas Ilgly y malformaciones esqueléticas en todas las dosis de Cas Ilgly en los fetos de hembras tratadas indican que esta es teratógena.

X. COMENTARIOS FINALES

De acuerdo a la información obtenida por este estudio en Toxicología Reproductiva con ratones de la cepa CD1. Se encontró que la Casiopeína Igly muestra riesgo al feto. Sin embargo, el beneficio de la Casiopeína Igly puede ser mayor a su riesgo potencial. Tomando en consideración que los agentes antineoplásicos se administran a una dosis máxima tolerada y es funcional terapéuticamente asociada con efectos dañinos secundarios (Rutledge , 1997).

La realización de este tipo de investigación en teratogénesis con (un deseado) próximo fármaco antineoplásico, Casiopeína Igly, fue necesario con la finalidad de obtener información crucial no disponible hasta ahora. Tal investigación se dirigió dentro de un marco ético. El cuál, reconoce la importancia del uso de animales de laboratorio.

Aplicar los resultados de Toxicología del Desarrollo en ratón a la situación humana es difícil. El hecho de que algunas sustancias afecten adversamente el desarrollo embrionario/fetal en una especie animal no significa necesariamente que otras especies sean afectadas similarmente, o que esta sustancia causara efectos similares en la gente (Cohen *et al.*, 1998; Fleisch, 1997). Sin embargo si se puede advertir que las mujeres embarazadas deben ser avisadas acerca de los posibles efectos deletéreos de la Casiopeína Igly sobre el feto.

La información sobre el mecanismo de acción de la Casiopeína Igly es limitada, y se debe trabajar en ello, ya que el uso de animales para evaluar el riesgo en humanos será más que empírico sólo cuando el grado de comparabilidad de los mecanismos de acción entre animales de prueba y el hombre sean entendidos (Wilson y Fraser, 1977).

XI. REFERENCIAS

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Roberts, K., y Watson, J. (1989). Molecular biology of the cell. 2 ed. New York; Garland publishing. pp.1296.
- Alex (2002): Podrían probarse en humanos con cáncer fármacos desarrollados en la UNAM. (en línea). 2002 Agosto 21 (Fecha de acceso 19 de febrero 2003). URL disponible en : <http://www.bine.lztacala.unam.mx.html>
- Altamirano, L.M., Ayala, M.E., Flores, A., Morales, L. y Domínguez, R. (1991). Sex differences in the effects of vanadium pentoxide administration to prepuberal rats. *Med. Sci. Res.* **19**:825-826.
- Altamirano, A. (1994). Manual de manejo de animales de laboratorio. México; FES Zaragoza., UNAM. 9-30.
- Andres, J. M., Frith, C. H., Goodman, D.G., Boysen B.G., y Cook, C.S. (1992). The mouse of models in toxicology. *Cox Gad, S. Y Chengelis. Marcel.* 26-32.
- Bajt, M. (1985). An analysis of factors responsible for resorption of embryos in Cisplatin-treated rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* **80**:97-107.
- Bonilla, E., Altamirano, M., Casas, E., Fierro, R., Ducolomb, R. y Betancourt, M. (2001). Identificación de Reprotóxicos en el Laboratorio. Ed. Javier Velázquez Moctezuma, México; UAM-PUIS, 55-73.
- Bravo, E. Tovar, A., Ruíz, M., Ruíz, L. y Moreno, R. (2002). Diseño, síntesis y caracterización de compuestos de coordinación de cobre casiopeínas®. 1° Congreso de Casiopeínas. México; UNAM. Fac. Química. 1-9.
- Burgen, A. (1986). The road to rational drug design, in innovative approaches in drug research, Harms A.F., Ed. Amsterdam; Elsevier Publishing Company.
- Chi-Jen, L. (2000). Development and evaluation of drugs. From Laboratory through licensure to Market. USA; CRC Press.1-96.
- Chung, M. (1998). Embryotoxic effects of SKY 2053R, a new potential anticancer agent, in rats. *Reproductive toxicology.* **12**:357-381.
- Cirigo, L., Moreno, E., y Ruíz-Ramírez, L. (2002). Interacción entre complejos ternarios del tipo $[Cu(N-N)(N-O)H_2O]^+$ (Casiopeína II) con el ADN y sus constituyentes. Primer congreso en Casiopeínas. UNAM.

- Cohen, A., Solomon, M., Alferiev, H., Breuer, F., Ornoy, P., Platlas, F., Eildeman, F., Hagele, M., y Golomb, E. (1998). Bisphosphonates and tetracycline; experimental models for their evaluation in calcium – related disorders. *Pharm res.* **15**:604-611.
- Creaven, P. y Mihich, E. (1978). Quimioterapia del cáncer. Bases Farmacológicas. México: Medica Panamericana. 27-50.
- De Vizcaya, R., Paredes, P., Ruíz-Ramirez, L., Candanosa, A., Mateos, T., y Sumano, L. (1996). Farmacocinética básica y eficacia de la Casiopeína II en el tratamiento de perros con tumor venéreo transmisible. Segunda Jornada de Trabajo de la Casiopeína II. UNAM.
- ECETOC (1983). Identification and assessment of the effects of chemicals on reproduction and development (reproductive toxicology monograph) No. 5. Belgium. pp. 32.
- Farr, C., Reinisch, K., Holson, J. y Nuebert, D. (2001). Potential teratogenicity of Di-n-Butyltin dichloride and other dibutyltin compounds. *Teratogenesis, Carcinogenesis y Mutagenesis.* **21**:405-415.
- Fernández, M. (2001): Animales como modelo experimental (en línea). (Fecha de acceso 19 de febrero del 2003). URL disponible en: <http://www.portalveterinaria.com/sections.html>
- FDA (Food and drugs administration) (1982). Good laboratory practice regulations for non-clinical laboratory studies. USA. Code of federal regulations. Title 21 Part. 8.
- Ferrer, S., Gasque, L., Moreno, E., y Ruíz-Azuara, L. (1995). "Equilibrio en disolución. Primera Jornada de Trabajo en Casiopeínas. UNAM.
- Fleish, H. (1997). Bisphosphonates in bone disease: from the laboratory to the patient. 3° ed. New York; Parthenon publishing group. pp. 184.
- Fraser, R. (1992). Teratology; therapeutic principles in practice. Philadelphia: *Pediat. Pharmacol.* **11**:107-110.
- Fritz, H. (1975). Prenatal ossification in rabbits as indicative of fetal maturity. *Teratology.* **11**:313-320.

- Gracia, M. I., Candanosa, A., Quiroz, G., y Ruíz-Azuara, L. (1995). Dosis Letales de Casiopeínas en Ratón, vía IP e IV. UNAM.
- García R. M.C., Santiago M. Y., y Altamirano L. M. (2002). Efecto de la Casiopeína II sobre el daño genotóxico en machos, hembras preñadas y sin preñar en ratón. Unidad de Investigación en genética y toxicología ambiental. Primer Congreso en Casiopeínas. FES Zaragoza. UNAM
- Goldstein, L. y Murphy, D. P. (1929). Etiology of ill-health in children born after maternal pelvic irradiation. II. Defective children born after postconception pelvic irradiation, Am, J. Roentgenol. Radium Ther. Nud. Med. **22**:322-331.
- Gregg, N. (1941). Congenital cataract following German measles in the mother, Trans. Ophthalmol. Soc. Aust. **3**:35.
- Green, N. (1954). Quantitative genetics of skeletal variations in the mouse. Crosses between three short-ear strains (P,NB,SECL2). J. Natl. Cancer Inst. USA. **15**:609-624.
- Grüneberg, H. (1963). "The pathology of development. A study of inherited skeletal disorders in animals". Blackwell, Oxford. 1-13.
- Hall, D. y Solehdim, F. (1998). Folic acid for the prevention of congenital anomalies. Eur. J. Pediatr. **157**:445-450.
- Huber K.R., Sridhar R., Griffith E.H., Amma E.L. y Roberts J. (1987). Superoxide dismutase-like activities of copper(II) complexes tested in serum. Biochimica Biophysica. Acta, **915**: 267-276.
- Institute of Laboratory Animal Resources (1996). Guidelines for the care and use of laboratory animals. Washington D.C; National Academy Press.
- Kalter, H. (1980). A compendium of the genetically induced congenital malformations of the house mouse. Teratology. **21**:397-429.
- Kimmel, C. y Wilson, J. (1973). Skeletal deviations in rats: malformations or variations?. Teratology **8**:309-316.
- Kimmel, C., Rees, D. y Francis, E. (1990). Proceeding of the workshop on the qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. Neurotoxicol. Teratol. **12**:173-292.

- Koren, G. (1994). Teratogenic drugs and chemicals. In Koren G. ed. Maternal-fetal toxicology. A clinician's guide. 2° ed. New York: Marcel Dekker 3:33-48.
- Koren, G. (2002). Ethical Framework for observational studies of medical drug exposure in pregnancy. *Teratology*. **65**:191-195.
- Koren, G., Pastuszak, A. y Ito, S. (1998). Drugs in pregnancy. *N. Engl. J. Med.* **338**:1128-1137.
- LeBlanc, G., Sundseth, S., Weber, G. y Waxman, D. (1992). Platinum anticancer drugs modulate P-450 mRNA levels and differentially alter hepatic drug and steroid hormone metabolism in male and female rats. *Cancer Res.* **52**:540-547.
- Lenz, W. (1961). Thalidomide and congenital abnormalities. *Pediatrics*. **43**: 915-926.
- Loomis, T. (1982). *Fundamentos de Toxicología*. España; Acirbia. 237-243.
- Mc. Bride, W. (1961). Thalidomide and congenital abnormalities, *Lancet*, **2**:13, 58.
- Mendiola, C., Delgadillo, M. y Flores, M. (2003): Cisplatino en usos como medicamento anticancerígeno. (en línea) Enero 2003 (Fecha de acceso 19 de Febrero del 2003). URL disponible en: <http://www.tenoch.pquim.UNAM.mx.html>.
- Morales, P., Vallarino-Kelly, T. y Rodríguez, R. (1995). Determinación del potencial citostático de drogas antineoplásicas en desarrollo mediante su efecto sobre el índice mitótico en células de la médula ósea de ratón *in vivo*. Primera Jornada de Trabajo en Casiopeínas. UNAM.
- Muranaka, R., Fukiishi, Y., Tsuiki, Y., Hirashiba, M., Ueyama, T., Kitagawa, T., Hasegawa, Y. y Kishi, K. (1993). Factors responsible for embryoletality in antineoplastic platinum complex-treated rats. *Teratology*. **48**:511.
- Palmer, P. (1968). Sporadic malformations in laboratory animals and their influence on drug testing. In "drugs and fetal development". M.A. klinberg, A. Abramoria y J Chemke, eds. New York; Plenum. 45-60.
- Pennycuik, P. (1980). Total and regional vertebral numbers and lumbosacral morphology in mice. Strain differences and the effects of the brachyury gene. *J Hered.* **71**:93-99.

- Pratt, W. y Ruddon, R. (1979). The anticancer drugs. New York: Oxford University Press. 273-313.
- Redbook (2000). Guidelines for reproduction studies. USA. FDA. 1-10
- Reyes, L., Fuentes, N. Ruíz-Ramírez, L., y Macías, L. (2002). Farmacocinética preclínica de la Casiopeína IIgly, en Ratas. Primer Congreso de Casiopeínas. Facultad de Química y Escuela de Ciencias Químicas.
- Reyes, L., Fuentes, N., Ruíz-Ramírez, L. y Macías, L. (2003). Development and validation of a liquid chromatographic method for casiopeína IIgly in rat plasma. J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. **5**:111-6.
- Rivero-Müller, Plant, N., Ruíz-Ramírez, L., De Vizcaya, R., y Dobrota, M. (1998). Degradation of DNA by the Cooper-based anticancer agent Casiopeína II. Tercera Jornada de trabajo en Casiopeínas. University of Surrey y UNAM.
- Rodríguez, C. y Rodríguez, M. (2000). Riesgo de los medicamentos en el embarazo y la lactancia. México: JGH. 1-17.
- Rotemberg, A., Komar, D. y Kaneski, N. (1999): Fármacos antineoplásicos. (en línea) 1999. (Fecha de acceso 19 de Febrero del 2003). URL disponible en: http://lafacu.com/apuntes/medicina/forma_antineo/-28K.html
- Ruíz-Azuara, L. (1992). Dirección general de Invenciones, Marcas y Desarrollo Tecnológico (SECOFI), Registro Núm. 18801-120579 y 18802-120580. U.S. Patents: Number Ap. 21 5, 107, 005: Nov. 19 (1996), 5, 576, 326; Feb. 18, (1997).
- Ruíz-Azuara, L. (2000). Casiopeínas: síntesis, caracterización y desarrollo de evaluación preclínica. Concurso para el apoyo a proyectos de investigación del CONACYT.
- Ruíz-Ramírez, L., Gracia-Mora, I., Moreno-Esparza, R., Díaz, D., Gasque, L., Huerta, L., Mayet, L. y Lomelí, C. (1991). The antitumoral activity of several transition metal complexes. J. Inorg. Biochem. **43**: 615.
- Ruíz-Azuara, L. Moreno, E., Ferrer, S. y Gasque, L. (1995). Diseño, síntesis, y caracterización de las Casiopeínas. Primera Jornada de Trabajo en Casiopeínas. Fac. de Química. UNAM.

- Rutledge, J. (1997). Developmental toxicity induced during early stages of mammalian embryogenesis. *Mutation research*. **396**:113-127.
- Ostrosky, P., Carranza y Ruíz-Ramírez, L. (1987). Congreso latinoamericano de genética. La Habana Cuba.
- Sarel, S., Mechoulam, R., y Agranat, I. (1992). Rational drug design, in trends in medicinal chemistry'90. Oxford; Blackwell Scientific, pp. 55.
- Saunders, E. y Saunders, J. (1990). Drug therapy in pregnancy: the lessons of thalidomide and bendectin. *Health Care Women Int.* **11**:423-432.
- Scialli, A. (1992). A clinical guide to reproductive and development toxicology. USA: CRC Press. 1-26.
- Sheppard, D. (1992). Catalog of teratogenic agents. 7° ed. London: The Johns Hopkins University Press.
- Sporn, M. y Suh, N. (2000). Chemoprevention of cancer. *Carcinogenesis*. Vol. **21**. **3**: 525-530
- Spyker, J. (1975). Behavioral teratology and toxicology, in: behavioral toxicology. New york; Plenum press. 311-349.
- Stockard, C. (1921). Developmental rate and structural expression: an experimental study of twins, "double monsters and single deformities, and the interaction among embryonic organs during their origin and development". *Am. J. Anat.* **28**: 115-227.
- Szabo, K. (1989). Congenital malformations in laboratory and farm animals. San Diego California; Academic press. pp. 923
- Taylor, P. (1986). Practical Teratology. Academic Press. Inglaterra. pp.171.
- Tovar, A., Círigo, C., García, A., Moreno, R., y Ruiz-Azuara, L. (1996). Estudio de la interacción de las casiopeínas II con el ADN por espectroscopia electrónica. 2° Jornada de trabajo en Casiopeínas. Facultad de química (UNAM)- Instituto de investigaciones biomédicas.
- Warkany, J. y Schraffenberger, E. (1947). Congenital malformations induced in rats. *Am. J. Anat.* **57**:455-463.

- Wilson, J. (1973). Environmental and birth defects. Academic press: New York. 123-126.
- Wilson, J. y Fraser, C. (1977). Handbook of teratology. Vol 1 General principles and etiology. New york; Plenum press. 47-74.
- Wise, D., Beck, S., Beltrame, D., Beyer, B., Chahoud, I., Clark, R., Clark, R., Druga, A., Feuston, M., Guittin, P., Henwood, S., Kimmel, C., Lindstrom, P., Palmer, A., Petreire, J., Solomon, H., Yasuda, M. y York, R. (1997). Terminology of developmental abnormalities in common laboratory mammals (Version 1). Teratology. **55**:249-292.
- Whitaker, J. y Kathaleen, M. (1979). Double staining technique for rat fetus skeletons in teratological studies. Laboratory animals. **13**:309-310.
- Working, P. (1989). Toxicology of the male and female reproductive system. Hemisphere New York. 195-197.
- Yasuda, M. y Maeda, H. (1972). Significance of the lumbar rib as an indicator in teratogenicity tests. Teratology **6**:124-125.

LA TESIS NO SE
DE LA BIBLIOTECA