UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

LO HUMANO EJE DE NUESTRA REFLEXION

TOXICOLOGÍA REPRODUCTIVA INDUCIDA POR LA CASIOPEÍNA III-ia EN RATONES MACHO DE LA CEPA CD-I

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

DIANA BOCANEGRA ASTIVIA

Director : DR. MARIO A. ALTAMIRANO LOZANO

MÉXICO, D. F. MAYO DE 2005

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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

A mis padres Laura y Raúl por la paciencia, el apoyo y amor brindado. Sin ellos no lo hubiera logrado...

A Agustín por todos los momentos vividos y soñados...

Gracias amor.

A los señores Agustín y Ma. Elena por el apoyo incondicional en todo momento.

Al Dr. Mario A. Altamirano por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

A todos aquellos que de alguna manera creyeron en mi. Gracias.

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 635012, de la DGAPA proyecto IN–212701 y salud CO1–7677.

Índice

Resumen

Introducción…….. 1

Cáncer……. 1

Evolución del cáncer……... 2

Tratamiento……. 3

Fármacos…….. 4

Casiopeínas…….. 6

Casiopeína III-ia……. 7

Toxicología reproductiva……. 9

Ratones de laboratorio……. 12

Características del ratón……. 12

Mantenimiento…….. 13

Alimentación……. 14

Manejo……. 14

Aspectos reproductivos……... 15

Sistemas reproductivos……... 16

Eutanasia……... 16

Sistema reproductor masculino……. 18

Espermatogénesis……. 18

Justificación…….. 20

Objetivos……. 20

Objetivo general……. 20

Objetivos particulares……... 20

Método…….. 21

Cruzas…… 22

Técnica de fijado y tinción…….. 22

Registro de datos y análisis estadístico…… 23

Resultados…… 24

Discusión……28

Número y motilidad…….. 28

Anormalidades en los espermatozoides …….. 29

Infertilidad…….. 31

Malformaciones esqueléticas…… 32

Conclusiones…… 37

Comentarios finales…… 38

Referencias……39

Resumen

La casiopeína III-ia (Nitrato de (4,4'-dimetil,2,2'-bipiridina) (acetilacetonato) cobre (II) · H_2O) se presenta como una nueva alternativa para el tratamiento del cáncer. Sin embargo, como todo nuevo fármaco, debe ser sometido a pruebas preclínicas que identifiquen sus propiedades farmacológicas y toxicológicas, para determinar su seguridad y eficacia en la terapéutica oncológica en humanos. Como parte de estas pruebas preclínicas, en el presente trabajo se evalúa el efecto toxicológico, tanto en el proceso reproductivo como en la descendencia de ratones macho de la cepa CD-1.

En esta investigación se monitorizaron los cambios físicos de los ratones macho durante el tratamiento. Al término de éste, se cuantificaron los espermatozoides en una cámara de Neubauer y se evaluó la motilidad y la morfología mediante un microscopio de contraste de fase a 400X (Nikon), encontrándose que la casiopeína III-ia altera el proceso de espermatogénesis, al inducir cambios morfológicos y una disminución de la motilidad y número de espermatozoides.

El número de hembras preñadas por machos tratados fue significativamente menor que en el grupo testigo, lo que indica una disminución de la fertilidad. Sin embargo, el número de implantes en las hembras preñadas no se vio alterado.

Posteriormente, los productos de los machos tratados, se analizaron por medio de un estereoscopio después de haber sido fijados en alcohol, desviscerados, transparentados en KOH, teñidos con rojo de alizarina y colocados en glicerina, encontrándose mutaciones dominantes, tales como osificación tardía en cráneo y extremidades delanteras y traseras, además de anormalidades en cráneo, esternebras, vértebras y costillas, así como ausencia en las tres últimas.

Las alteraciones esqueléticas fueron aumentando conforme aumentó la dosis aplicada, sin embargo, en la dosis de 1.75 mg/kg la ausencia de vértebras y costillas fue mayor con respecto a los otros tratamientos.

Introducción

Cáncer

La evolución de las ciencias biomédicas se enfrenta en la actualidad a un problema creciente, éste es el cáncer. Audersick (1997) lo define como un mal funcionamiento de los controles de crecimiento de las células corporales.

El desarrollo normal de todo órgano inicia con un crecimiento rápido en la etapa de la vida embrionaria, un crecimiento más lento en la etapa juvenil y finalmente el mantenimiento de un tamaño constante durante la etapa adulta (Audersick, 1997). Existen células muy diferenciadas que liberan factores inhibidores del crecimiento, las cuales se oponen a una mayor actividad mitótica y causan inhibición por contacto; en consecuencia, controlan el tamaño de los órganos (Curtis, 2000).

Para explicar el desarrollo del cáncer, es necesario entenderlo como una alteración celular de base que confiere propiedades de crecimiento activo transmitido a toda la estirpe de las células. Esto significa que el cáncer mantiene una íntima relación con cambios genéticos, ya que los patrones de crecimiento se convierten en una característica heredada a la descendencia de la célula normal. Este concepto se ha sometido a muchos estudios y hay varias evidencias importantes que apoyan el fundamento genético en la biología del cáncer (Sack, 2002).

Actualmente se piensa que pueden existir reguladores químicos, que aún no se detectan y que están actuando sobre el DNA nuclear. El cáncer depende de una alteración del DNA de las células afectadas. De los genes eucarióticos, el llamado oncogén, se parece estrechamente a los genes normales de las células

en que se encuentra y se cree que desempeña una función en el desarrollo del cáncer. El producto genético de estas células parecen ser proteínas reguladoras que intervienen en el control del crecimiento y división celular (Curtis, 2000).

Los tumores son crecimientos neoplásicos íntimamente relacionados al cáncer. Se pueden clasificar en dos grupos según su efecto sobre el organismo y según ciertas características de su crecimiento. Existen tumores benignos y malignos, ambos tienen la potencialidad de producir cáncer. Los tumores benignos en general tienen un crecimiento limitado, se mantienen localizados en el sitio de aparición y sus efectos sobre el organismo no son graves y derivan de los trastornos mecánicos que puede ocasionar un cuerpo extraño en el seno de un tejido normal. Los tumores malignos se caracterizan por un crecimiento descontrolado y rápido, por ser invasivos, tanto en el sitio donde se han iniciado, como en su capacidad de diseminarse a otros tejidos del organismo, originando las metástasis. Sus efectos son graves y si no son tratados a tiempo, conducen a la muerte (Alberts, 1996).

Las características de los tumores no son absolutas para determinar su peligrosidad. Por ejemplo, hay tumores benignos que por su localización pueden ser peligrosos, o puede haber tumores malignos de crecimiento lento y que raramente dan metástasis (Levin, 1978; Doll, 1989).

Evolución del cáncer

El cáncer al diseminarse por el organismo conduce a quien lo porta a su fase terminal. Se caracteriza por una evolución polifásica que incentiva la

proliferación de las células cancerígenas irrumpiendo en el desarrollo normal de las células sanas.

Según Levin (1978) se pueden definir tres situaciones en la evolución de la enfermedad:

1. Enfermedad localizada: Comienzo del proceso; el tumor se desarrolla únicamente en el tejido en que va creciendo. Durante esta etapa es donde se obtienen los mejores resultados a tratamientos terapéuticos.
2. Enfermedad regional: El proceso se ha desarrollado alcanzando los ganglios linfáticos de la zona. La terapia en estos casos del mismo modo resulta efectiva y debe comprender tanto al tumor como a los ganglios involucrados.
3. Enfermedad diseminada o avanzada: Se han producido metástasis en sitios distantes del tumor original. La terapia debe ser general y debe abarcar todas las localizaciones tumorales.

Tratamiento

Para la erradicación del cáncer se han intentado múltiples tratamientos, tanto empíricos como científicos, sin embargo, los esfuerzos han sido limitados. No obstante, las investigaciones científicas han dado importantes pasos en la elaboración de fármacos y tratamientos que han mitigado, detenido y en su caso eliminado la enfermedad (Romero, 1996; Cameron, 1995).

La estrecha similitud entre las células cancerosas y las normales ocasiona que casi todos los fármacos citotóxicos actualmente disponibles carezcan de acción selectiva. En dosis terapéuticas producen efectos secundarios tóxicos,

sobre todo en las células en división rápida como las de la mucosa intestinal, folículos pilosos, médula ósea, epitelio germinativo de los testículos, timo, y en el feto. Los ritmos de división de estas células suelen ser superiores a los de las células tumorales (Bowman, 1997). Lo anterior produce anemia, leucopenia y trombocitopenia (Rivera, 1998; Lesson, 1990), por lo que en los pacientes tratados son comunes las hemorragias y mayor susceptibilidad a las infecciones, lo que obliga a que exista una estrecha vigilancia de los niveles leucocitarios, así como de la salud de los pacientes.

El tratamiento de las enfermedades neoplásicas en la actualidad consta de modalidades terapéuticas modernas, entre las cuales se encuentra la quimioterapia, la radioterapia y la inmunoterapia, éstas han reducido el uso de procedimientos quirúrgicos radicales, además pueden combinarse para lograr mejores resultados. En la mayoría de los casos la cirugía y la radioterapia son los tratamientos más usuales, sin embargo, en algunas ocasiones la quimioterapia es la opción, como medida adicional para prolongar la vida (Romero, 1996; Cameron, 1995).

La quimioterapia consiste en la preparación y empleo de productos químicos oportunos, es decir, fármacos capaces de actuar en un organismo agredido por cualquier agente patógeno vivo, extraño a él y dotado de tendencia invasora, con el fin de combatirlo y destruirlo causando el mínimo daño al organismo invadido (Muntoni, 1971).

Fármacos

La mayor parte de fármacos citotóxicos –los quimioterapeúticos tumorales- que se utilizan en la quimioterapia anticancerosa son inmunosupresores. Esto

significa que los fármacos tienen una acción contraproducente, ya que suprimen cualquier respuesta inmune del organismo.

Para su clasificación, a éstos se les ha dividido en:

1) Antimetabolitos: son moléculas que interfieren en la formación o la función de un metabolismo natural gracias a su afinidad estructural con este último.

2) Agentes alquilantes: constituyen un grupo de compuestos provistos de grupos químicos particulares, por medio de los cuales reaccionan con un variado número de moléculas orgánicas sustituyendo átomos de iones hidrógeno por grupos alquílicos. La alquilación tiene lugar en un punto molecular “nucleófilo” que es rico en electrones y produce modificaciones estructurales y funcionales, y que pueden conducir a alteraciones de la reproducción, a mutaciones, a cáncer y a la muerte de la célula dañada.

3) Mitostáticos: son compuestos caracterizados por una capacidad común de detener el proceso mitótico en el estadio de la metafase.

4) Antibióticos: son sustancias heterogéneas en cuanto a su estructura química que inhiben la proliferación celular.

5) Compuestos varios.

6) Hormonas.

Actualmente hay fármacos tanto de origen orgánico como inorgánico. En 1969 Rosemberg da a conocer la actividad citostática de un compuesto sintético de origen inorgánico, lo que posibilitó la síntesis de una nueva serie de compuestos, éste fue el cis-diamino-dicloro-platino(II), conocido como Cisplatino (Ruiz, 1996; Bravo, 2002).

Casiopeínas

El desarrollo de productos antineoplásicos es prioritario en nuestro país. Los costos elevados y la necesidad ineludible de importación de esos productos motiva el desarrollo de nuevos fármacos.

Desde el año de 1975, la Dra. Lena Ruiz Ramírez trabaja en el diseño de compuestos de coordinación con actividad biológica, a base de cobre, en específico contra el cáncer, surgiendo así las casiopeínas (Romero, 1996). Dichos compuestos, muestran de manera teórica y experimental una actividad biológica potencial. A partir de 1981 se inician trabajos de constatación biológica *in vitro*, con base en el postulado de que pueden tener actividad antineoplásica (Romero, 1996).

Hoy día, encontramos sintetizados cerca de cien compuestos con actividad biológica potencial. Éstos tienen como sostén los experimentos citostáticos y antineoplásicos *in vitro*, lo cual permite el desarrollo de ensayos *in vivo* empleando dichos compuestos (Ruiz, 1996).

Las casiopeínas tienen como centro metálico cobre (II) que en la esfera de coordinación presenta un ligante bidentado del tipo diiminas (N-N) y otro que puede ser aminoacidato (N-O) o donador (O-O) (Bravo, 2002). Los complejos estudiados de esta familia han demostrado tener actividad citostática, citotóxica y antineoplásica. (Tovar, 1996).

Para la obtención de los complejos de la casiopeína se toma en cuenta que el metal presenta una toxicidad relativamente baja, que su estado de oxidación es similar al de los metales que se encuentran en los fluidos biológicos y posee un

número de coordinación alto. Por otro lado los ligantes deben tener la capacidad de formar quelatos y cierto grado de hidrofilicidad e hidrofobicidad (Villar, 1996).

Según estas características serán las propiedades de los compuestos en términos de: solubilidad, potencial electroquímico, capacidad de transporte a través de las membranas y estabilidad, ya que se pretende, entre otras posibilidades, que el mecanismo de actividad sea por interacción con el ADN (Villar, 1996).

Casiopeína III-ia

La casiopeína III-ia (Nitrato de (4,4'-dimetil,2,2'-bipiridina) (acetilacetonato) cobre (II) · H_2O) (Fig.1) presenta las siguientes características:

- La fórmula es $C_{17}H_{19}O_3N_3Cu_3H_2O$.
- Tiene un peso molecular de 426.99 g/mol.
- Es soluble en agua, solución salina y solución glucosada.
- La LD_{50} es de 14.6 mg/kg vía intraperitoneal (Gracia, 1995).

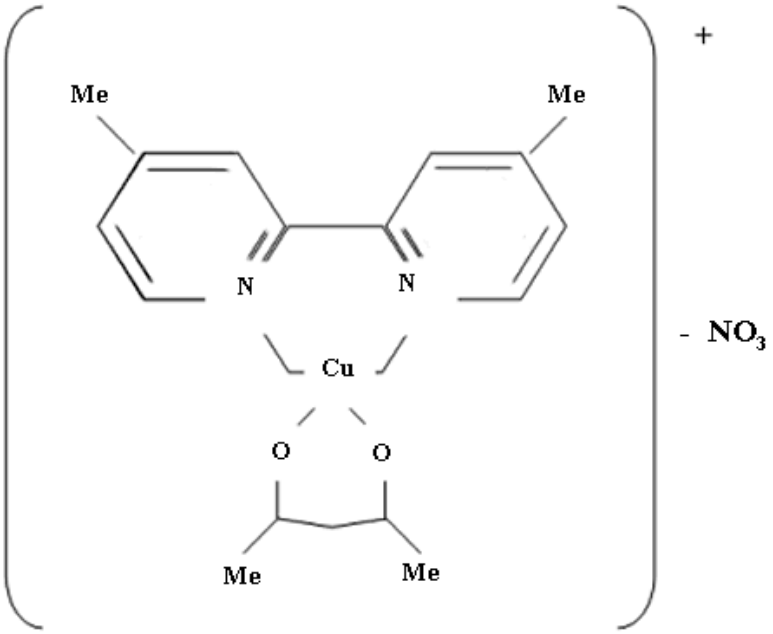

Fig.1 Estructura química de Casiopeína III-ia [Cu (N-N) (O-O)] NO_3 (Tomada de Fuentes-Noriega,2002).

Algunas investigaciones en las que se ha trabajado con casiopeína III-ia, arrojan la siguiente información: muestra actividad antineoplásica *in vitro* en líneas tumorales humanas (Macías, 2004), presenta cambios morfológicos acordes a apoptosis en linfoma inducidos por el virus de la enfermedad de Marek (Calderón, 2004), además de no presentar inducción de micronúcleos en dosis de 7mg/Kg en ratones machos, hembras preñadas y sin preñar y fetos (Pérez, 2004), muestra una alta efectividad ante tumores mamarios espontáneos en ratas (Rivera, 2004), posee actividad citotóxica y citostática, es menos genotóxica que el cisplatino y no es mitogénica en un sistema *in vivo* (Sánchez, 2004).

Por otro lado ha inducido toxicidad materna, es embriotóxica y fetotóxica (Bocanegra, 2004), afecta la función mecánica del corazón en forma dependiente dosis-tiempo (Hernández, 2004), e induce crisis respiratoria en perros (García, 2004).

Dado lo anterior, podemos afirmar que a pesar de ser una alternativa para el tratamiento del cáncer, las casiopeínas han causado algunos efectos tóxicos en animales que fueron tratados con ellas (Rivera, 1998; De Vizcaya, 2003).

Es por esta razón que se continúa con el estudio de estos compuestos con gran potencial anticancerígeno, con la finalidad de seleccionar a aquellos que presenten una baja toxicidad (Marín, 2003) para evitar efectos secundarios graves, resistencia cruzada y un menor costo (Rivera, 1998).

Toxicología reproductiva

El hombre se encuentra expuesto a gran cantidad de substancias, algunas ejercen un efecto dañino o tóxico sobre los organismos y el medio ambiente, por

lo que ha sido necesario clasificarlas como toxinas a aquellas de origen natural y como tóxicos aquellos derivados de ocupaciones humanas (Aragón, 1998).

Se ha definido a la Toxicología Reproductiva como la rama de la Toxicología que estudia los efectos deletéreos producidos por agentes exógenos (es decir, xenobióticos ajenos a la naturaleza de los organismos) en la reproducción. Se incluyen dentro de los xenobióticos agentes químicos naturales o sintéticos, biológicos (virus) y físicos (radiaciones). De tal manera que éstos pueden afectar cualquiera de las etapas del ciclo reproductivo e interferir con la fertilidad o el desarrollo pre o postnatal de los individuos (Bonilla, 2001) (Fig. 2).

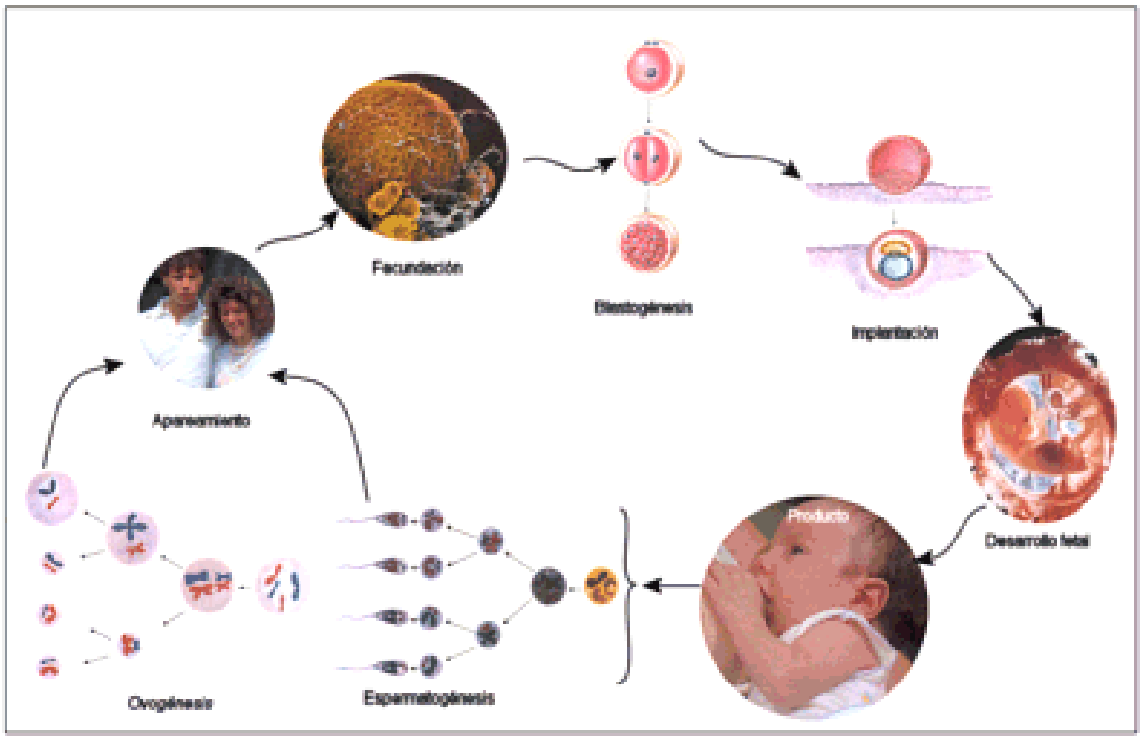

Fig. 2. Ciclo vital de reproducción en humanos.

En esta definición se manejan varios tipos de toxicidad. La teratogenicidad, que es la capacidad de causar grandes malformaciones estructurales en el feto en desarrollo y la toxicología del desarrollo (entre otros) que estudia las alteraciones

producidas en la descendencia como resultado de la exposición de hembras o lactantes a xenobióticos (Bonilla, 2001 y Aragón, 1998).

Según el sexo, un mismo tóxico puede producir diferentes efectos al entrar en contacto con el organismo. En los machos la elevada y constante producción de células gaméticas, así como las múltiples componentes que integran su sistema reproductor lo hacen más susceptible al daño inducido por agentes exógenos. Un biomarcador en Toxicología Reproductiva es un indicador de los efectos desfavorables en los componentes o procesos bioquímicos o celulares que pueden ocurrir en cualquier paso de la ruta que inicia con la exposición y/o los cambios biológicos tempranos y pasa a la incidencia de resultados reproductivos anormales (Aragón, 1998).

Se piensa que los cambios en la salud reproductiva humana ocurridos en un lapso de tiempo muy corto, pueden ser provocados por la exposición a agentes potencialmente tóxicos (APTs) que hoy día encontramos en el ambiente (Nunziata, 1998).

Ante la gran cantidad de APTs a los que nos encontramos expuestos, hace algunos años se ha puesto especial énfasis al desarrollo de estudios que nos permitan evaluar la toxicidad de estos agentes en la reproducción (OECD, 1993).

Para la identificación de agentes que provoquen efectos deletéreos sobre la reproducción es necesario realizar estudios en humanos y animales de laboratorio. Ciertamente, la mejor opción de identificación de reprotóxicos es seguir la última alternativa. Para lo cual se parte de los siguientes supuestos (Bonilla, 2001):

1. Cualquier agente que produce un efecto reproductivo adverso en animales de laboratorio suele presentarse el efecto en humanos. Esto se basa en

comparaciones de los datos obtenidos por los resultados de APTs en humanos y animales de laboratorio (Kimel, 1990).

2. Un agente que daña la función reproductiva en un sexo, afectará de igual manera al sexo opuesto, por la similitud en los procesos biológicos que se llevan a cabo en machos y hembras (Bonilla, 2001).

3. Al no tener información para determinar cuál es la especie animal más adecuada en la evaluación del riego reproductivo, se deben utilizar los resultados de la más sensible, observando que los humanos son más sensibles que la mayoría de las especies empleadas en estudios de toxicidad reproductiva (Working, 1989).

4. En un análisis cuantitativo donde se evalúa toxicidad reproductiva, la curva dosis-respuesta será lineal a partir de cierto umbral, donde las células y órganos del sistema reproductor tienen cierta capacidad para detener o reparar el daño producido. Frecuentemente se presenta un umbral en las dosis utilizadas, a partir de la cual se produce el daño (González, 2004).

En la reproducción humana los efectos adversos son múltiples y no han sido entendidos en su totalidad. Las condiciones hereditarias por sí solas son difícilmente responsables de la mayoría de estos efectos, ya que la otra causa es debida a la exposición de químicos sintéticos y naturales, drogas, radiación, consumo de alcohol e infecciones, sin embargo, la dimensión de cada uno de ellos se desconoce (Scialli, 1992).

Al llevar a cabo la evaluación de los metales en el organismo, debe contemplarse el mecanismo por el cual se incorporan al cuerpo y cuál es su blanco de acción. Varios factores modifican la toxicidad de los metales como los

nutricionales, fisiológicos y constitucionales como el sexo y la edad de los organismos estos pueden jugar un rol importante, tanto en la relación dosis-respuesta como en la relación dosis-efecto (Altamirano, 1992).

Ratones de laboratorio

El ratón de laboratorio es un roedor cuyo ancestro es el ratón común o ratón casero. Su nombre científico es *Mus musculus* (Andress, 1992).

A principios del siglo XVIII, el ratón fue utilizado en estudios de anatomía comparada. Hoy por hoy el avance de las ciencias y las constantes necesidades nos han permitido crear un mamífero pequeño, de manejo sencillo, económico y fácil de alojar y es así como ha surgido el ratón de laboratorio (Andress, 1992).

A través de cruzamientos selectivos se han creado nuevas cepas de ratones de laboratorio. Actualmente existen entre 100 y 120 cepas consanguíneas de ratón. Los ratones de laboratorio constituyen entre el 60 y 80 por ciento de los mamíferos usados en la investigación, esto debido a su gran prolificidad, a su capacidad de adaptación, a los conocimientos que se tienen acerca de su fisiología y a la factibilidad de su manejo (Andress, 1992).

Otra ventaja del ratón para su utilización es su ciclo corto de vida (1-3 años), lo que permite el estudio de muchas generaciones. Un gran número de ratones se utilizan en bioensayos, realización de pruebas de toxicidad, estudio de nuevos fármacos, estudios de microbiología y de virología; sin embargo para estas pruebas se refiere al ratón albino no consanguíneo.

Un gran número de mutaciones han aparecido en el ratón y muchas de éstas se han presentado en condiciones similares a estados congénitos en el hombre.

Características del ratón

El periodo de vida de estos roedores es de 1.5 a 3 años. Nacen sin pelo, con los ojos y oídos cerrados, vocalizan y son muy activos; el pelo comienza a crecer al tercer día, al décimo ya están cubiertos de pelo y el meato auditivo externo está completamente abierto. A los doce días abren los ojos; comienzan a comer sólido y aprenden a beber agua de la botella por imitación (Lane, 1976). Los machos se distinguen de las hembras por los testículos visibles a través de la pared abdominal, la mayor distancia entre el ano y la papila urogenital y el mayor tamaño de la papila urogenital (Dyban, 1991; Harkness, 1989). Los incisivos crecen continuamente pero son limados por fricción.

Mantenimiento

Los ratones utilizados en la investigación se pueden alojar en jaulas que varían de acuerdo al diseño, tamaño y composición. Las jaulas que más se utilizan para el alojamiento de ratones son las tipo caja de zapato, de policarbonato y polipropileno o poliestileno. El acero inoxidable es el material más utilizado para la fabricación de las tapas debido a su alta durabilidad y facilidad de limpieza. Las jaulas deben mantener secos y limpios a los animales, permitir la libertad de movimientos, evitar restricciones físicas innecesarias y proporcionar acceso al agua y alimento. Se requiere de un material de cama que absorba el orín, la

humedad de la jaula y que les permita hacer sus nidos. Dos o tres cambios por semana de la cama son suficientes.

Los cuartos de alojamiento de los animales deben permanecer bajo estricto control de la humedad de 40 a 70 por ciento, la temperatura de 20 a 25º C y el fotoperiodo de 12 hrs. luz por 12 hrs. obscuridad, es el más recomendado (Altamirano, 1994).

Alimentación

Los requerimientos nutricionales del ratón están determinados por la calidad genética, el estado de salud, la gestación y la etapa del desarrollo. La alimentación puede influir en los resultados de la investigación al modificar la respuesta de los animales a los fármacos u otros factores que se estén estudiando, por lo que la dieta debe proporcionar un balance de nutrientes esenciales y estar libre de contaminantes de tipo químico y biológico.

El ratón consume de 3 a 5 gramos de alimento por día después del destete, manteniendo este consumo de por vida (Dyban, 1991). A su vez, es importante señalar que los ratones deben tener acceso libre al agua potable; un decremento en el consumo de agua provocará disminución en el consumo de alimento (Gad,1998).

Manejo

En la investigación es inevitable la toma de muestras, así como la inspección de los animales. Para ello, es necesario inmovilizarlos y esto debe hacerse de la manera más adecuada para que el operador y el animal no corran

ningún riesgo. Los métodos de identificación de los ratones son: el uso de las tarjetas en los cuartos, estantes y jaulas, manchas de color y las muescas o perforaciones en las orejas (Altamirano,1994).

Aspectos reproductivos

La activación de los estrógenos provoca cambios reproductivos importantes en la hembra. La cornificación del epitelio vaginal y la apertura vaginal son algunos de ellos, los cuales se presentan entre los 24 y 28 días de edad. El ciclo estral es el periodo que existe entre una ovulación y otra acompañada por signos de estro (Hafez, 1987), inducidos por el nivel de estrógenos, así el ratón hembra es poliéstrica continua; es decir, presenta ciclos estrales continuos durante todo el año con ligeras variaciones estacionales.

En la reproducción del ratón influyen algunos factores. Entre los que se destacan por su incidencia: el ruido, la alimentación, el fotoperiodo y la densidad de población, los cuales influyen directa e indirectamente en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada y consecuentemente, en el control hormonal de la función ovárica y testicular. El apareamiento puede detectarse mediante la observación de espermatozoides en frotis vaginales, así como por la presencia de tapón vaginal formado por semen gelificado, el cual persiste de 18 a 24 horas, en algunos casos hasta 48 horas. (Harkness, 1989; Holmes, 1987; Jacoby, 1984).

El periodo de gestación del ratón hembra es de 19 a 21 días. Las hembras gestantes son extremadamente sensibles a los efectos del medio, por lo que deben protegerse de las fluctuaciones de temperatura, ruido y otros factores que induzcan estrés. El parto ocurre generalmente durante la noche; el tamaño de la

camada depende de la cepa, del número de gestaciones y de la edad de la hembra (Altamirano, 1994).

Sistemas reproductivos

En los ratones los sistemas reproductivos más utilizados de acuerdo con Altamirano (1994) son:

a) Las colonias: se aparea un macho por cada 2 a 6 hembras, éstos se mantienen unidos generalmente de manera permanente siendo aconsejable extraer las crías tras el destete.

b) Parejas monógamas: consiste en mantener parejas permanentes. Las crías se extraen antes de que se produzca el otro parto.

c) Conjuntos polígamos: se combina un macho por cada 2 a 6 hembras. Inmediatamente antes del parto, las hembras se separan en jaulas individuales, impidiendo aprovechar el celo postparto.

Eutanasia

En la investigación biomédica, es necesario el uso y sacrificio de animales. De los cuales, es posible la obtención de enzimas, membranas, receptores, células, tejidos y órganos después del sacrificio o bien, realizar estudios *in vitro* durante la experimentación o en la fase final de ésta. El término eutanasia significa muerte sin dolor, proceso mediante el cual se sacrifica a los animales, utilizando técnicas humanitarias reconocidas y aceptadas, realizándose de manera silenciosa sin dolor, y sin signos de miedo o ansiedad en el manejador y/o en el animal (Altamirano, 1994; Vogel, 1997).

En los ratones los principales métodos eutanásicos empleados propuestos en la AVMA (1978) y en Holmes (1987) son:

1. Aturdimiento con desangrado: Se da un fuerte golpe en el cráneo provocando una hemorragia cerebral masiva, y con ello, una depresión inmediata del sistema nervioso central; de esta manera, el animal queda insensible al dolor. Después del aturdimiento se debe desangrar al animal por incisión en los grandes vasos y en el músculo cardíaco (AVMA; 1978).
2. Dislocación cervical: Consiste en interrumpir la comunicación del cerebro y la médula espinal mediante la separación de las vértebras cervicales. El ratón debe colocarse en una superficie lisa y con un objeto tubular, se coloca de manera horizontal contra el cuello, luego se jala rápida y firmemente de la base de la cola (Holmes, 1987). Este método es el más utilizado en los ratones.
3. Agentes anestésicos inhalados: Los más empleados en los ratones son el éter y el cloroformo debido a su bajo costo, pero el éter es altamente explosivo, por lo que estos agentes no deben emplearse cerca del fuego o equipos eléctricos.
4. Gases no anestésicos: A este grupo pertenecen el monóxido de carbono, dióxido de carbono, nitrógeno y cianuro. El único que se utiliza con los ratones es el dióxido de carbono.
5. Agentes tranquilizantes: Éstos se utilizan en grandes dosis para producir la muerte.

Sistema reproductor masculino

El sistema reproductor masculino se constituye por dos testículos y un sistema de conductos que van desde éste hasta la uretra, las glándulas

accesorias, cuyas secreciones junto con los espermatozoides constituyen el líquido seminal o semen y el pene (Lesson, 1990).

El testículo es un órgano ovoide y par alojado en el escroto constituido por túbulos seminíferos, los espermatozoides son producidos en el epitelio que constituye la pared de los túbulos seminíferos y de allí se desprenden e inician su recorrido hasta llegar al exterior impulsados durante la eyaculación (Arredondo, 1995; Gartner, 1995).

Espermatogénesis

La función del sistema reproductor es la formación de espermatozoides (véase figura 3) morfológica y fisiológicamente competentes en número suficiente para llevar a cabo la fertilización, la elaboración de hormonas sexuales masculinas y la liberación de los gametos masculinos en el tracto reproductor femenino (Aragón, 2003; Gartner, 1995).

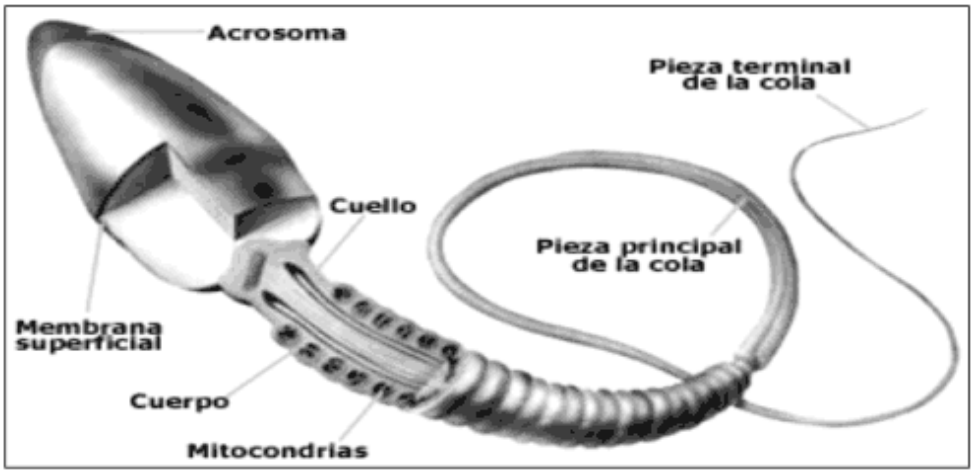

Fig. 3 Espermatozoide

La serie de eventos citológicos como resultado de la formación de espermatozoides maduros a partir de células precursoras es conocida como espermatogénesis y comienza durante la pubertad, este proceso tiene lugar en los

túbulos seminíferos del testículo durante la vida reproductiva del macho (Carlson, 2000). La espermatogénesis es un proceso que involucra una serie de divisiones mitóticas de las espermatogonias, dos divisiones meióticas de los espermatocitos, cambios morfológicos de las espermátidas durante la espermiogénesis y la liberación de células libres en los túbulos seminíferos (Aragón, 1998; De Kretser, 1994; Sadler, 2004).

Justificación

En la actualidad existen múltiples fármacos para tratar el cáncer, sin embargo la mayoría de ellos producen reacciones secundarias y efectos dañinos a diversos sistemas corporales en el ser humano.

El diseño y elaboración de las casiopeínas como agentes antineoplásicos, muestra una nueva opción de tratamiento. Sin embargo se sabe poco sobre sus efectos secundarios y no se conocen los efectos reprotóxicos. El presente trabajo de investigación tiene como finalidad determinar el grado de toxicidad reproductiva de la casiopeína III-ia.

Objetivos

Objetivo general

Analizar los efectos de la casiopeína III-ia en el sistema reproductor masculino y en la descendencia al ser administrada en diferentes dosis a ratones macho de la cepa CD-I.

Objetivos particulares

- Evaluar concentración espermática y la motilidad.
- Analizar la morfología espermática.
- Determinar si la casiopeína III-ia induce infertilidad.
- Evaluar en hembras preñadas por machos tratados el número de implantes.
- Analizar si la casiopeína III-ia aplicada en ratones macho induce malformaciones externas y/o esqueléticas en la descendencia.
- Evaluar la relación dosis-respuesta.

Método

Los animales utilizados en el proceso de investigación fueron 40 ratones macho de la cepa CD-1, de dos meses de edad, sexualmente maduros, con un peso de 35 a 45 gramos, y 80 ratones hembra de la misma edad con un peso de entre 30 y 38 gramos. Estos ejemplares se obtuvieron del bioterio Harlan de la Facultad de Química, UNAM.

A los ratones se les alimentó con comprimidos *purina* y agua *ad libitum*, y se les mantuvo bajo condiciones ambientales de temperatura y circulación de aire, así como periodos de luz-oscuridad controlados (12-12 horas). Los ratones fueron pesados al comenzar el tratamiento, cada dos días y después se ubicaron para la cruza, posteriormente se sacrificaron.

La casiopeína III-ia fue preparada con agua inyectable e inyectada intraperitonealmente (ip) conteniendo volúmenes adecuados con concentraciones desde 1.75 mg/kg (1/8 LD_{50}), 3.5 mg/kg (1/4 LD_{50}), o 4.8 mg/kg (1/3 LD_{50}). A los ratones se les inyectó cada dos días por un periodo de 60 días (FDA).

Después del tratamiento con casiopeína III-ia, los ratones machos se colocaron durante 5 días con 2 hembras cada uno para la cruza, posteriormente fueron sacrificados por dislocación cervical. Los conductos deferentes se extrajeron para obtener el semen colocándolo en 2μl de solución Tyrode's (Sigma Chemical, ST. Louis, Mo., USA) a 37º C mezclando y homogeneizando la suspensión. Una gota de la suspensión de esperma de cada animal fue colocada en un portaobjetos para su observación, se analizó a través de un microscopio de contraste de fases a 400X (Nikon). La motilidad de espermas fue determinada por

el promedio de n células expuestas en movimiento del total de células analizadas (Seed, 1996).

La concentración de esperma fue determinada en una cámara de Neubauer (PROPER Lumycite 1/100mm de intensidad). Se tiñeron las laminillas con Giemsa (1:16 en agua por 30 minutos) fue usado el análisis de morfología espermática acordado en los criterios descritos por Wyrobek y Bruce (1975) con algunas modificaciones, para informar el porcentaje de formas anormales y el porcentaje relativo de cada tipo anormal encontrado.

Cruzas

En cada caja se dejó por 12 horas a dos ratones hembra con un ratón macho. Al concluir este tiempo se revisó que la hembra tuviera tapón vaginal como resultado del proceso de cruza. Una vez identificado el tapón se consideró ese día como “día cero”.

La obtención de fetos fue al cumplir 18 días de gestación, sólo entonces, las hembras se sacrificaron, éstos fueron contados conforme a la ubicación de ellos en cada uno de los lados del útero. En el útero se observaron junto con los fetos si hubo o no evidencia de reabsorciones y en qué porcentaje. Al examinar los fetos se verificó que no presentaran malformaciones externas evidentes; se comprobó por medio de estimulación que estuvieran vivos y finalmente se registró el peso por camada y por feto.

Técnica de fijado y tinción

Al colocarse todos los fetos en etanol al 70 por ciento por 24 horas, al azar se tomaron dos terceras partes de los fetos obtenidos por camada, se procedió al registro del sexo, al retiro de vísceras y cada feto fue colocado en una solución de hidróxido de potasio (KOH) al uno por ciento de 24 a 72 horas, realizando tres cambios de la solución hasta que el esqueleto fue visible a través del tejido graso. Posteriormente se mantuvieron en solución limpia de KOH al uno por ciento con rojo de alizarina (500 mg/100 ml de KOH 1%) durante 24 horas hasta teñir el esqueleto. Una vez teñidos se pasaron a glicerina pura para eliminar el exceso de colorante, observarlos y preservarlos.

Se realizó el análisis de las estructuras óseas de cada feto por medio de un estereoscopio Nikon, registrando todo tipo de evidencia de daño.

Registro de datos y análisis estadístico

Se calculó la media y desviación estándar, para los siguientes parámetros: cantidad y motilidad de espermatozoides, anormalidades espermáticas, implantes por camada, peso por camada y por feto. Además de obtener un análisis estadístico por medio de la “t” de Student (nivel de significancia $P<0.05$). Las malformaciones esqueléticas se registraron como porcentajes de fetos por grupo.

Resultados

La aplicación de casiopeína III-ia a ratones macho de la cepa CD-1 durante 60 días, tuvo efecto en el peso corporal al finalizar el tratamiento. En todos los grupos tratados el incremento de peso fue menor que en el grupo testigo negativo. Por otro lado, en la dosis mayor de casiopeína III-ia hubo pérdida de ratones al finalizar el tratamiento. Tabla 1.

Tabla 1. Ratones macho tratados con casiopeína III-ia durante 60 días según dosis aplicada y peso corporal.

Ratones y peso	Dosis aplicadas (mg/kg)			
	0	**1.75**	**3.5**	**4.8**
Número de machos al inicio	10	10	9	10
Número de machos al final	10	10	9	5
Peso inicial (g)	35	41	41	35
Peso final (g)	44	46	43	39
Ganancia de peso (g)	9	5	2	4

Se evaluó la movilidad y cantidad de los espermas, revisando una laminilla por cada animal de cada dosis y encontramos que conforme aumenta la dosis disminuyen ambas características considerablemente. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Cantidad y concentración de espermatozoides según dosis y movilidad (X ± D.E).

Dosis mg/kg	**Motilidad**	**Concentración espermática**
0	480 ± 208	348 ± 56.8
1.75	270.3 ± 295.5	256.5 ± 139.3
3.5	64 ± 68.8*	198.8 ± 66.9*
4.8	0	113 ± 49.8**

*P< 0.05 vs testigo; **P<0.01 vs testigo, con prueba de t de Student.

La incidencia y tipo de anormalidades espermáticas en ratones macho después del tratamiento se muestra en la Tabla 3. Se evaluaron cuatro ratones macho por grupo y se examinaron mil espermatozoides por ratón.

En los tres grupos tratados se encontró un incremento en el número de espermatozoides anormales. Se observó una diferencia significativa en la concentración de 3.5 mg/kg y 4.8 mg/kg. Los espermatozoides sin gancho y doblados en sí mismo mantuvieron el mismo comportamiento, con cabeza de banana, amorfos y dos cabezas fueron más frecuentes en la dosis más alta.

Tabla 3. Porcentaje de espermatozoides según dosis y presencia e incidencia de anormalidades.

Parámetros evaluados	Dosis (mg/kg)			
	0	1.75	3.5	4.8
n (tamaño de la muestra)	4	4	4	4
Normal (%)	89.77	90.83	88.85	82.98
Espermas anormales(x ± D.E.)	12.8 ± 6.88	15.15 ± 8.77	14.36 ± 18.7*	18.29 ± 17.18**
Tipo de anormalidades (%)				
Sin gancho	1.9	3.05	0.43	2.72
Cabeza de banana	3.5	0.36	1.43	4.28
Amorfo	3.7	2.4	8.20	8.37
Doblado en sí mismo	0.88	3.2	1.08	1.53
Dos cabezas	-	-	-	0.046

*P< 0.05 vs testigo; **P<0.01 vs testigo, con prueba de t de Student.

En la tabla 4 podemos observar que el comportamiento de la casiopeína III-ia no tuvo efecto en la reproducción materna y fetal, para las ratonas hembra preñadas por estos machos.

En algunos aspectos evaluados existen diferencias marcadas en cuanto a la dosis testigo (-), en la dosis de 1.75 mg/kg el número de reabsorciones fue mayor donde las camadas con este factor representan el 50%, para la dosis de 3.5 mg/kg, el porcentaje de fetos vivos fue de 85% las camadas con reabsorciones

fueron 3 de 4 y el peso de los fetos disminuyó siendo éste el más bajo con respecto a las otras dosis.

En el grupo de 4.8 mg/kg observamos que la proporción de fetos hembra fue totalmente mayor respecto a los machos. En tres de los cuatro grupos (Testigo (-), 1.75 mg/kg y 4.8 mg/kg) hubo un parto adelantado.

Tabla 4. Efectos materno fetales en las en ratonas hembra preñadas por machos tratados con Casiopeína III-ia durante 60 días (cada tercer día).

	Dosis (mg/kg)			
	0	1.75	3.5	4.8
Total de hembras	20	20	20	10
Hembras preñadas	11	10	4	2
No. Hembras con fetos vivos	11	10	4	2
No. de implantaciones	146	138	66	28
Implantes / camada	13.3±1.9	13.8±3.9	16.5±2.6	14±1.41
Total de fetos vivos (♀ / ♂)	77 / 51	56 / 70	31 / 25	14 / 1
Fetos vivos / camada (%)	97	91	85	100
No. de reabsorciones	5	12	9	-
Camada con reabsorciones (%)	4/11 (36)	5/10 (50)	3 / 4 (75)	-
Reabsorciones tempranas / camada	4	12	9	-
Reabsorciones tardías / camada	1	-	-	-
Parto adelantado	1	1	-	1
Peso / camada (g)	15.3±4.8	12.8±4.4	14.7±3.8	17
Peso / feto (g)	1.43±0.4	1.07±0.3	1.02±0.1*	1.13

*P< 0.05 vs testigo, con prueba de t de Student.

En la tabla 5 se muestran las malformaciones esqueléticas examinadas de los fetos de ratonas preñadas por machos tratados con casiopeína III-ia, éstas corresponden a un efecto dosis-respuesta.

La osificación tardía en la dosis de 4.8 mg/kg afectó al 100% de los fetos. En la dosis de 1.75 mg/kg hubo un 94% de fetos afectados, sin embargo presentan un mayor tipo y número de malformaciones esqueléticas. En el caso de falanges dístales y proximales (extremidades delanteras) y falanges distales, medias y proximales (extremidades traseras) son mayores las osificaciones tardías.

De igual manera la presencia de esternebras en forma de pesa, asimétricas/forma de pesa y desplazadas; así como la ausencia de vértebras y costillas fue mayor en la dosis de 1.75 mg/kg con respecto a los otros tratamientos.

Tabla 5. Malformaciones esqueléticas en fetos de ratón aplicando Casiopeína III-ia durante 60 días (cada tercer día) a ratones macho. (el porcentaje se muestra entre paréntesis)

	Dosis diarias (mg / kg)			
Observación	Testigo (-)	1.75	3.5	4.8
No. de fetos examinados por camada	92 / 11	85/10	37/4	10/1
No. fetos con osificación tardía	30/92	80/85	37/37	10/10
Cráneo	11 / 92 (12)	47/85 (52)	31/37 (84)	10/10 (100)
Extremidades delanteras				
Falanges distales	26/92 (28)	66/85 (78)	20/37 (54)	-
Falanges medias	44/92 (48)	79/85 (93)	35/37 (95)	10/10 (100)
Falanges proximales	29/92 (32)	39/85 (46)	8/37 (22)	6/10 (60)
Metacarpos	18/92 (20)	13/85 (15)	24/37 (65)	3/10 (30)
Extremidades traseras				
Falanges distales	16/92 (17)	53/85 (62)	12/37 (32)	-
Falanges medias	46/92 (50)	80/85 (94)	34/37 (92)	9/10 (90)
Falanges proximales	26/92 (28)	50/85 (59)	14/37 (38)	4/10 (40)
Metatarsos	11/92 (12)	10/85 (12)	14/37 (38)	2/10 (20)
Anormalidades esqueléticas				
No. fetos con anormalidades (%)				
Esternebras				
Asimétricas	24/92 (26)	40/85 (47)	21/37 (57)	8/10 (80)
Forma de pesa	19/92 (21)	57/85 (67)	15/37 (41)	5/10 (50)
Asimétricas / forma de pesa	-	26/85 (31)	1/37 (3)	2/10 (20)
Desplazadas	-	1/85 (1)	-	-
Rudimentarias	18/92 (20)	44/85 (52)	23/37 (62)	7/10 (70)
Bifurcada	20/92 (22)	53/85 (62)	33/37 (89)	8/10 (80)
Grieta / doble apariencia	7/92 (8)	12/85 (14)	3/37 (8)	2/10 (20)
Ausencia	15/92 (16)	11/85 (13)	1/37 (3)	-
Cráneo				
Aplastado	35/92 (38)	27/85 (32)	25/37 (68)	-
Vértebras				
Ausentes	-	9/85 (11)	-	-
Costillas				
Corta	11/92 (12)	12/85 (14)	4/37 (11)	2/10 (20)
Extra	11/92 (12)	7/85 (18)	1/37(3)	2/10 (20)
Ausencia	-	5/85 (6)	-	-

Discusión

Número y motilidad

Los espermatozoides son células importantes en la toxicología reproductiva, siendo ampliamente utilizados dentro de evaluaciones de daño en células germinales, efectos en la fertilidad y mutaciones genéticas hereditarias (Wyrobek, 1984; Wyrobek, 1997), además de ser el tipo celular más primitivo en el epitelio seminífero (Aragón, 2003).

Los aspectos funcionales y morfológicos son muy importantes y tal vez inseparables en la integridad espermática, de igual manera el examen de semen en las pruebas de fertilidad, para el desarrollo de anticonceptivos o pruebas de toxicidad, usando las medidas tradicionales de producción espermática, número de formas normales y motilidad, las cuales pueden tener una amplia influencia en los sucesos reproductivos (Aragón, 1998; Wyrobek, 1983).

La motilidad de los espermatozoides, está optimizada para la propagación de los genes paternos utilizando las reservas maternas, habitualmente es altamente móvil y aerodinámico para conseguir velocidad y eficiencia en la tarea de la fecundación (Alberts, 1996). La motilidad, la adquieren a su paso por el epidídimo, después de haber sido liberados hacia los túbulos seminíferos donde son inmóviles y sin capacidad para fecundar, en donde por medio de contracciones se expulsan hacía los túbulos rectos y la red testicular por una corriente de líquido testicular, hasta llegar al conducto epididimiario (Lesson, 1990; Comhaire, 1993).

La motilidad del flagelo es una expresión de la viabilidad de células germinales en los machos. Existen algunos mecanismos que explican el por qué

de la disminución de los porcentajes de motilidad y viabilidad observadas después de la administración de altas dosis de xenobióticos disminuyendo la calidad (Aragón, 2001). Sin embargo, cambios en la motilidad espermática por si mismos no son indicativos de exposición tóxica, pero indican una reducida habilidad reproductora en el macho (Chapin, 1992).

Al analizar los resultados observamos que al administrar casiopeína III-ia a ratones macho durante 60 días ésta indujo daño a nivel reproductivo, ya que se observó una reducción tanto en la motilidad como en la cantidad de los espermatozoides.

Anormalidades en los espermatozoides

En años recientes se ha avanzado en el conocimiento del potencial tóxico sobre los espermatozoides de una gran variedad de sustancias o mecanismos genéticos, fisiológicos o citotóxicos, irradiaciones, altas temperaturas corporales, desnutrición, algunas enfermedades u otros agentes ambientales, encontrados en las ocupaciones diarias a los cuales se expone el humano (Odeigah, 1997; Aragón, 2001; Wyrobek, 1978; Kumar, 2002;), dañando los procesos de proliferación, meiosis y diferenciación, aumentando el porcentaje de las anormalidades morfológicas en la cabeza de los espermatozoides (Aragón, 2003; Cole, 1988; Meinstrich, 1993; Wyrobek, 1975). Estos factores interfieren directamente con la reproducción en los machos, principalmente dañando los tejidos productores de semen (Neuber, 2002; Sakamoto, 1996).

En general las anormalidades encontradas en espermas de ratones tratados, indican que éstas han sido causadas por alteraciones en el ADN

testicular (como deleciones, mutaciones puntuales o la combinación de ambas) las cuales interrumpen el proceso de diferenciación del espermatozoide, por lo que el proceso de espermatogénesis ha sido dañado (Odeigah, 1997). Una alteración genética en los cromosomas sexuales puede desencadenar enfermedades en el sistema reproductor (Kumar, 2002). Algunas investigaciones nos indican que existe una interacción de la casiopeína (casiopeina IIgly) con el ADN induciendo rompimientos de cadena ocasionando genotoxicidad (Florín, 2004).

Las formas del esperma incluyendo las dimensiones, la fracción y tipo de formas anormales presentes, es una característica en el genotipo en las células espermatogénicas, el fenotipo del esperma es definido en gran medida por autosomas y genes ligados al sexo (Wyrobek, 1978).

Se sabe de dos mecanismos que afectan indirectamente la función de las células espermáticas y la morfología. El primero nos dice que la exposición a químicos produce efectos en el eje hipotálamo-hipófisis o en hormonas sexuales, afectando la espermatogénesis; y el segundo es que esta exposición a metales causa anormalidades en el fluido seminal dando como resultado el deterioro de la estructura espermática (Odeigah, 1997).

Evaluando la morfología de los espermatozoides, se encontraron anormalidades en todos los grupos tratados con casiopeína III-ia (1.75mg/kg, 3.5mg/kg y 4.8 mg/kg) las cuales estadísticamente son significativas en las dos concentraciones más altas, por lo que pueden estar asociadas al tratamiento, posiblemente debido a una interacción con el ADN testicular (Odeigah, 1997; Wyrobek, 1983).

Infertilidad

Las anormalidades reproductivas ocurren comúnmente entre los humanos y frecuentemente éstas varían. Existen varios sitios blanco en las células germinales durante el desarrollo, tanto en los machos como en las hembras donde se han identificado defectos funcionales y físicos en el macho o en la hembra en el sistema reproductivo; errores en la diferenciación de las células germinales antes de la fecundación, donde disminuye la calidad y cantidad de gametos y el desarrollo de defectos que ocurren después de la fecundación (Wyrobek, 1997).

Las funciones reproductivas normales en el macho requieren de una comunicación entre el sistema nervioso central y el hipotálamo u órganos reproductores bajo el buen funcionamiento de todas las hormonas que participan (Jüppner, 2000). Las señales hormonales y neuroquímicas transmiten información entre el hipotálamo, glándula pituitaria anterior, Células de Leydig, Células de Sertoli y el epitelio germinal (Figura 1) (Amann, 1986).

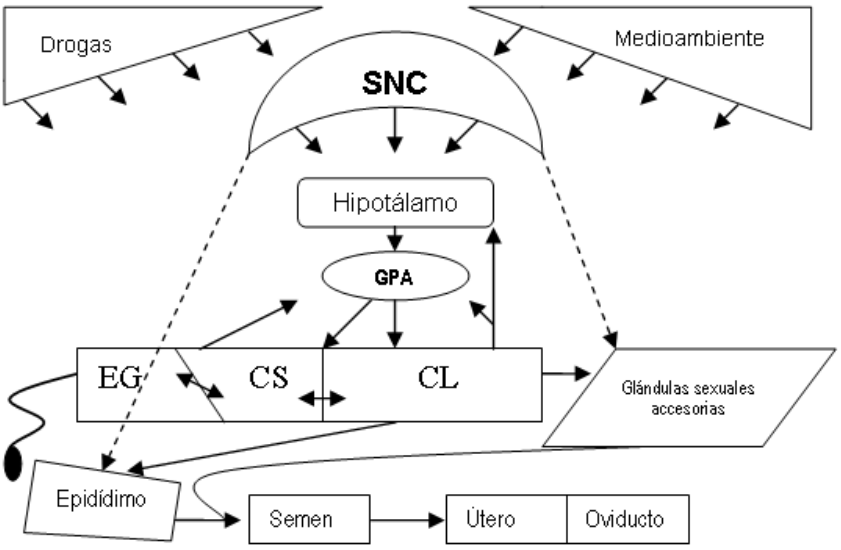

Figura 1. Interdependencia de los componentes del sistema reproductor masculino (Tomado de Amann, 1986).

La función de cada una de estos componentes en el sistema reproductor, así como, el epidídimo, glándulas sexuales accesorias y el mecanismo de eyaculación se controla desde uno de los sitios más lejanos. En teoría la fertilidad y la fecundidad pueden ser suprimidas por alteraciones en la función de cualquiera de estos sitios: hipotálamo, glándula pituitaria anterior, testículos, conductos eferentes, epidídimo, conductillos eferentes, glándula sexual accesoria y semen; sin embargo no siempre sucede esto (Amann, 1986).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la casiopeína III-ia indujo infertilidad en los machos, encontrando que las hembras preñadas disminuyeron conforme aumentó el nivel de la dosis, ya que de 10 sólo se preñaron 2 en la dosis más alta (4.8 mg/kg), sin embargo observamos que no existe diferencia alguna en cuanto al número de implantes en las hembras preñadas por los machos tratados. Algunas investigaciones revelan que al existir un daño en los espermatozoides es probable que haya una reducción en la fertilización del huevo, en la implantación o en el desarrollo después de la implantación (Bateman, 1984) pero en este caso, no fue así.

Malformaciones esqueléticas

La hipófisis y el hipotálamo están involucrados en la producción de muchas hormonas reguladas por sistemas complejos de retroalimentación negativa. La secreción de hormonas por parte de la glándula tiroides, la corteza suprarrenal y las gónadas (testículos y ovario) es controlada por el hipotálamo. Al incrementar la concentración en sangre de hormonas producidas por glándulas blanco, el

hipotálamo disminuye la producción de hormonas liberadoras, la hipófisis reduce la producción hormonal y la producción de hormonas por las glándulas blanco también baja. Esta producción hormonal también es regulada en respuesta a otros cambios en los ambientes externo e interno por medio del hipotálamo, que recibe información de muchas otras partes del cerebro (Curtis, 2000).

La glándula tiroides secreta la hormona calcitonina en respuesta a niveles crecientes de calcio en el fluido extracelular tiroideo. La acción principal de ésta es la de inhibir la liberación del ion calcio por parte de los huesos. La hormona paratiroidea desempeña un papel importante en el metabolismo mineral, especialmente en la regulación de los iones calcio y fosfato, de tal forma que ambas hormonas trabajan como un mecanismo finamente ajustado que regula el calcio de la sangre y en el que la hormona paratiroidea aparentemente desempeña el papel principal (Curtis, 2000).

Cualquier alteración en los mecanismos de acción de estas hormonas puede interferir con los procesos de proliferación y diferenciación de los condrocitos (Figura 2) (Jüppner, 2000).

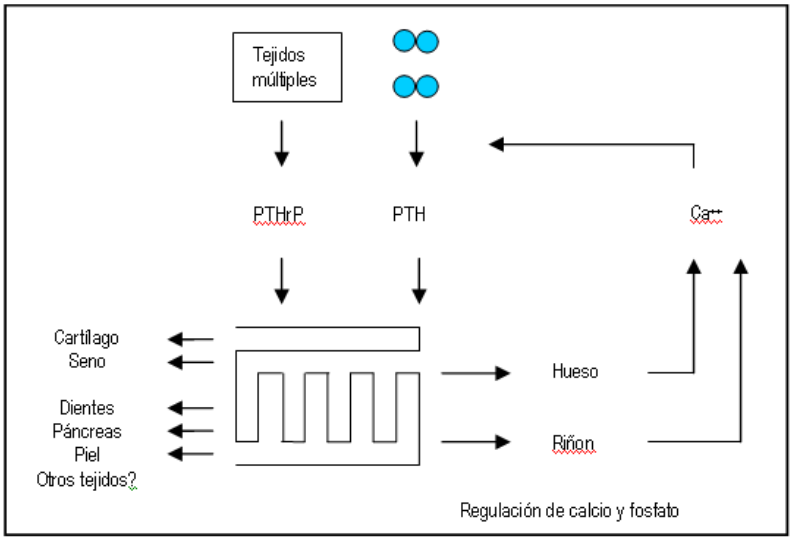

Figura 2. Función biológica de la hormona paratifoidea (PTH) y PTH- relacionada a proteínas (PTHrP) mediadas por receptores PTH/PTHrP (PTH1R). (Tomado de Jüppner, 2000)

Trabajos recientes muestran que una mutación en los receptores que requieren las hormonas para el desarrollo del hueso se manifestó en los organismos como enanismo debido a un retraso en los procesos de osificación (Murakami, 2004); por ejemplo la displasia cleidocraneal (Kundu, 2002).

Muy posiblemente, las consecuencias genéticas en la fertilización por espermas afectados por la exposición a químicos durante la espermatogénesis, puede inducir la indiferenciación de estas células, ocasionando la muerte del embrión, o la transmisión de alteraciones genéticas a la progenie nacida. Evaluando la descendencia de los machos donde sus células germinales estuvieron expuestas a mutágenos, se observan enfermedades que pueden ser muy problemáticas (Shelby, 1993). Existen muchas evidencias de que la inducción de cambios en la morfología espermática reflejan el daño genético en las células germinales (Wyrobek, 1984).

Estas observaciones se han basado en la comparación de la habilidad de los agentes químicos al inducir formas anormales en el esperma y la habilidad al inducir mutaciones letales dominantes, translocaciones hereditarias y mutaciones de locus específicas (Wyrobek, 1984). En trabajos recientes, se ha estimado que 81% de todas las anormalidades cromosómicas, el 20% de estas son desordenes genéticos debidos a mutaciones *de novo* en células reproductivas (Shelby, 1993; Wyrobek, 1993; Keshava, 1999).

De todos los mutágenos de células germinales hay algunos que inducen daño genético en células somáticas, aunque no todos los mutágenos en células

somáticas son mutágenos de células germinales. En las mutaciones letales dominantes el daño es inducido en el material genético en el desarrollo de las células germinales de los machos, esto no afecta la habilidad de las células germinales al fecundar, pero puede resultar como muerte o pérdida de una de las primeras divisiones celulares (Shelby, 1988; Shelby, 1993).

Las translocaciones hereditarias son daños cromosómicos en células germinales específicamente, cambios recíprocos de segmentos de cromosomas entre cromosomas homólogos, las células germinales que tienen translocaciones recíprocas son normalmente capaces de fecundar y el resultado individual es que teniendo un grupo completo de cromosomas las células germinales son viables. Sin embargo el efecto biológico principal en la descendencia es la reducción de la fertilidad o en algunos casos la esterilidad (Shelby, 1993).

En el análisis de malformaciones externas y esqueléticas en la descendencia encontramos que sí hubo malformaciones esqueléticas donde todos los fetos las presentaron, esto para la dosis más alta, sin embargo en la dosis de 1.75 mg/kg el 94% de fetos fueron dañados, pero las malformaciones son mayores en cuanto a tipo y sólo en algunos parámetros en número. Esto es debido a que todos los espermatozoides de los machos que recibieron el tratamiento fueron dañados, pero con la dosis más baja tuvieron la capacidad de sobrevivir aún con daño, de tal manera que fecundaron y originaron un embrión con malformaciones esqueléticas.

Con lo anterior podemos decir que las malformaciones esqueléticas observadas responden a una relación dosis-respuesta con respecto a los

tratamientos aplicados, como consecuencia del daño en espermatozoides de los machos tratados.

Finalmente, cuando se realizó un análisis de las reabsorciones, encontramos tanto reabsorciones tempranas como tardías sin embargo en la dosis de 1.75mg/kg las reabsorciones tempranas fueron 12, en la dosis de 3.5mg/kg se encontraron 9, en el testigo fueron 4 reabsorciones tempranas y 1 tardía y en el grupo más alto no hubo, por lo que podemos decir que la casiopeína III-ia es capaz de inducir mutaciones dominantes.

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos podemos concluir que:

1. La casiopeína III-ia mostró ser reprotóxica ya que indujo una disminución tanto en la cantidad como en la motilidad de los espermatozoides después del tratamiento, ocasionado por un posible daño en las mitocondrias espermáticas, las cuales desempeñan una función importante encargándose del control de los movimientos en la cola.
2. La casiopeína III-ia alteró el desarrollo normal de la espermatogénesis por lo que hubo anormalidades espermáticas.
3. El hecho de que en los grupos de machos tratados durante 60 días el número de hembras preñadas disminuyera, indica que esta casiopeína induce infertilidad.
4. El proceso de implantación no se vio afectado dado que no hubo diferencia alguna entre el grupo de hembras preñadas con machos testigo y los grupos de hembras cruzadas con machos tratados.
5. La casiopeína III-ia mostró inducir alteraciones esqueléticas en la descendencia de los machos tratados, lo que probablemente nos indica que hubo un desequilibrio en el sistema endocrino a nivel de la glándula tiroides y las glándulas paratiroides las cuales se encargan del desarrollo de los huesos.
6. El hecho de observar un incremento en la frecuencia de reabsorciones tempranas y tardías en mayor número en la dosis más baja permite concluir que la Casiopeína III-ia está induciendo mutaciones letales dominantes.
7. Los efectos de la casiopeína III-ia mostraron una relación dosis-respuesta en los parámetros evaluados.

Comentarios finales

El desarrollo de nuevos fármacos para uso humano necesariamente requiere de ser evaluado desde el punto de vista toxicológico para establecer los niveles de seguridad al ser aplicados en determinados pacientes. Una de las pruebas requeridas son las de Toxicología Reproductiva, las cuales nos permiten establecer los efectos en la reproducción y la descendencia, dentro de las normas éticas. En el presente trabajo se evaluó la casiopeína III-ia y los resultados mostraron que puede ser considerada como reprotóxica, con lo cual el aporte de esta investigación permite establecer los límites de uso durante ciertas etapas de la gestación, así como las posibles consecuencias al ser administrado en varones en edad reproductiva. A pesar de todo esto la información sigue siendo limitada por lo que es necesario desarrollar nuevos protocolos para realizar un estudio mas amplio y tomar en consideración otros parámetros, como por ejemplo la evaluación de posibles alteraciones hormonales en los individuos del sexo masculino, y correlacionar el estadío cualitativo y cuantitativo de las hormonas sexuales en función de los tratamientos con la casiopeína III-ia.

Referencias

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D. (1996). *Biología molecular de la célula* (3ª ed.). España: Omega.

Altamirano, B. A. (1994). *Manual de manejo de animales de laboratorio.* México: FES Zaragoza. UNAM.

Altamirano, L. M. A. (1992). *Efectos mutagénicos y alteraciones del ciclo reproductivo del ratón producidos por pentóxido de Vanadio.* Tesis de doctorado. México: Facultad de Ciencias, UNAM.

Amann, P. R. (1986). Detection of alterations in testicular and epididymal function in laboratory animals. *Environ. Health Pers., 70*, 149-158.

Andress, J. M., Frith, C. H., Goodman, D. G., Boysen, B. G. y Cook, C. S. (1992). The mouse. En: Cox G.S. y Chengelis, C.P. (Eds.). *Animal Models in Toxicology.* (pp. 165-294). New York : Marcel Dekker.

Aragón, M. A. (1998). *Reprotoxicidad inducida por tetraóxido de vanadio en el ratón macho CD-I.* Tesis de Licenciatura. México: Facultad de Estudios superiores Zaragoza, UNAM.

Aragón, M. A. y Altamirano, L. M. (2001). Sperm and testicular modifications induced by subchronic treatments with vanadium (IV) in CD-1 mice. *Rep. Toxicol. 15,* 145-151.

Aragón, M. A. (2003). *Toxicidad reproductiva del vanadio (IV) en el ratón macho.* Tesis de Doctorado. México: Facultad de Estudios superiores Zaragoza, UNAM.

Arredondo, G. (1995). *Embriología.* México: Interamericana McGraw-Hill.

Audersik, T. y Audersik, G. (1997). *Biología, La vida en la Tierra.* (4ª ed.). México: Prentice-Hall Hispanoamericana.

AVMA. American Veterinary Medical Association (2001). Report of the AVMA Panel on Euthanasia 2000. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218, 669-689.

Bateman, A. F. (1984). The dominant lethal assay in the male mouse. En: Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. y Ramel, C. (Eds.). *Handbook of mutagenicity test procedures.* (2nd ed.). New Cork: Elsevier.

Bocanegra, A. D. y Altamirano, L. M. (2004). Efecto teratogénico causado por la casiopeína III-ia en embriones y fetos de ratón de la cepa CD-1. En: *1er Congreso Nacional de Química Medica.* (pp. 28-31). México, D. F.: Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN) Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Bonilla, E., Altamirano, M., Casas, E., Fierro, R., Ducolomb, Y. y Betancourt, M. (2001). Identificación de Reprotóxicos en el laboratorio. En: *Biología de la Reproducción II*. (pp. 55- 73). México, D. F.: UAM – PUIS.

Bowman, W. C. y Rand, M.J. (1997). *Farmacología. Bases bioquímicas y patológicas, aplicaciones clínicas*. México: Interamericana.

Bravo, E., Tovar, A., Ruiz, M., Ruiz, R. L. y Moreno E. R. (2002). Diseño, síntesis y caracterización de compuestos de coordinación de cobre Casiopeínas®. Historia química de un proyecto exitoso. En. *Primer Congreso en Casiopeínas. 5ª jornada de trabajo en casiopeínas* (pp. 1-9). México, D. F.: Facultad de Química, UNAM.

Calderón, D. J. D., Petrone, G. V. M., Constantino, C. F., Gómez, R. C., Gracia, M. I. y Ruiz, G. L. (2004). Evaluación inmunohistoquímica y determinación del índice apoptótico en linfomas inducidos por el virus de la enfermedad de Marek, en gallinas reproductoras tratadas con casiopeína III-ia. En: *1er Congreso Nacional de Química Medica*. (pp. 22-

24). México, D. F.: Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, Facultad de Química; Departamento de Aves, FES Cuautitlán; Departamento de Patología, FMVZ; Unidad de Experimentación Animal, Facultad de Química.

Cameron, R. B. (1995). *Oncología práctica*. México: Médica panamericana.

Carlson, M. B. (2000). *Embriología humana y biología del desarrollo*. (2ª ed.). España: Harcourt.

Cole, A., Meinstrich, M., Cherry, L. y Trostle-Weige, P. K. (1988). Nuclear and manchette development in spermatids of normal and azh/azh mutant mice. *Biol. Reprod. 38,* 385-401.

Comhaire, F. H. (1993). Methods to evaluate reproductive health of the human male. *Reprod. Toxicol. 7,* 39-46.

Curtis, H. y Sue, B. N. (2000). *Biología*. (6ª ed.). México, D. F.: Médica Panamericana.

De Kretser, D. M. y Kerr, J. B. (1994). The cytology of the testis. En: Kndeil, E. y Neil, J. D. (Eds.). *The Physiology of Reproduction.* (pp. 1117-1290). New York: Raven Press, LTD.

De Vizcaya, R. A., Rivero, M. A., Ruiz, R. L., Howarth, J. A. y Dobrota, M. (2003). Hematotoxicity response in rats by the novel copper-based anticancer agent: casiopeina II. *Toxicology, 194,* 103-113.

Doll, P. (1989). *Las causas del cáncer*. Barcelona: Salvat.

Dyban, A. P., Punchkov, V. F., Samoshkina, N. A., Khozhai, L. I., Chebotar, N. A. y Baranov, V. S. (1991). Laboratory Mammals: Mouse (*Mus musculus*), Rat (*Rattus norvegicus*), Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), and Golden Hamster (*Crisetus auratus*). En : Dettlaff, T. A. y Vassetzky, S. G.

(Eds.). *Animal species for development studies. Vol. 2 Vertebrates.* (pp. 353-437). USA: Consultans Bureau New York.

FDA (Food and drugs administration) (1992). Good laboratory practice regulations for non-clinical laboratory studies. USA. Code of federal regulations. Title 21 Part. 58.

Florín, R. D., Rodríguez, M. J. J. y Altamirano, L. M. A. (2004). Evaluación de los rompimientos en el DNA inducidos por la casiopeína II-gly en leucocitos humanos de sangre periférica. En: *1er Congreso Nacional de Química Médica.* (pp. 41-45). México: Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN) Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Fuentes, N. I., Ruiz, R. L., Tovar, T. A., Rico, M. H. y Gracia. M. I. (2002). Development and validation of a liquid chromatographic method for casiopeína HI in rat plasma. *J. Chromat. 772,* 115-121.

Gad, S. C. y Chengelis, C. P. (1998). *Acute Toxicology Testing.* (2nd ed.). New Cork: academia Press.

García, O. L. E., Leal, G. M. G., Sumano, L. H., Constantino, C. F., Mondragón, V. R. L., Luna del Villar, V. J., Gracia, M. I. y Ruiz, A. L. (2004). Determinación de los efectos cardiotóxicos y sistémicos de la casiopeína III-ia y su terapia adyuvante. En: *1er congreso Nacional de Química Médica.* (pp. 45 – 48). México: Departamento de Patología, FMVZ; Departamento de Fisiología y Farmacología, FMVZ; Unidad de Experimentación Animal, Facultad de Química; Hospital de pequeñas especies, FMVZ; UNAM.

Gartner, L. P. y Hiatt, J. L. (1995). *Atlas color de histología.* (2a ed.). México: Médica Panamericana.

Gracia, M. I., Candanosa, A., Quiroz, G. y Ruiz, A. L. (1995). Dosis letales de casiopeínas en ratón, vía IP e IV. UNAM.

González, V. M. E. (2004). *Efecto teratogénico de la Casiopeína II.* Tesis de licenciatura. México: Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM.

Hafez, E. S. E. (1987). *Reproducción e inseminación artificial en animales domésticos*. (5ª ed.). México: Interamericana.

Harkness, J. E. y Wagner, J. E. (1989). *The biology of rabbits and rodents.* (3th ed.). USA: Lea and Febiger.

Hernández, E. L. (2004). La cardiotoxicidad de las casiopeínas II y III. En: *1er Congreso Nacional de Química Medica.* (pp. 33- 34). México: Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

Holmes, D. D. (1987). *Clinical laboratory animal medicine, an introduction.* USA, Iowa: The Iowa State University Press.

Jacoby, R. O. y Fox, J. G. (1984). Biology and Diseases of Mice. En: Fox, J. G., Cohen, B. J. y Loew, F. M. (Eds.). *Laboratory animal medicine*. USA: Academic Press.

Jüppner, H. (2000). Role of parathyroid hormone-related peptide and Indian hedgehog in skeletal development. *Pediat. Nephrol. 14,* 606-611.

Keshava, N. y Ong, T. (1999). Occupational exposure to genotoxic agents. *Mutat. Res. 437,* 175-194.

Kimmel, C. A., Rees, D. C.y Francis, E. Z. (1990). Proceeding of the workshop on the qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. *Neurotox. Teratol. 12,* 173-292.

Kumar, T. R., Doreswamy, K., Shrilatha, B. and Muralidhara. (2002). Oxidative stress associated DNA damage in testis of mice: induction of abnormal sperms and effects on fertility. *Mutation Research, 513,* 103-111.

Kundu, M., Javed, A., Jeon, J., Horner, A., Shum, L., Eckhaus, M., Muenke, M., Lian, J. B., Yang, Y., Nuckolls, G. H., Stein, G. S. y Liu, P. P. (2002). Cbfβ interacts with Runx2 and has a critical role in bone development. *Nature Genetics, 32,* 547-552.

Lane, W. P. (1976). The laboratory Mouse. En: *The UFAW Handbook of the Care and Management of Laboratiry Animals.* (5th ed.). USA: UFAW (Universities Federation for Animal Welfere).

Leeson, T. S., Leeson, C. R. y Paparo, A. A. (1990). *Texto/Atlas de Histología*. México: Interamericana McGraw-Hill.

Levin, E. (1978). *La prevención del cáncer.* Argentina: Colihue.

Macías, R. L., Chiapa, Z. N., García, P. A. E., Tovar, H. S., Ruiz, A. L., Vizza, F., Peruzzini, M., Gonsalvi, L., Gómez, R. C. y Gracia, M. I. (2004). Evaluación antineoplásica *in vitro* de nuevos compuestos de coordinación en líneas tumorales humanas. En: *1er Congreso Nacional de Química Médica.* (pp. 20-22). México: Unidad de experimentación animal, Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, Facultad de Química UNAM e ICCOM-CNR Florencia Italia.

Marín, H. A., Gracia, M. I., Ruiz, R. L. y Moreno, S. R. (2003). Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeinas) on mitochondrial functions. *Biochemical Pharmacology, 65,* 1979-1989.

Meistrich, M. L. (1993). Nuclear morphogenesis during spermiogenesis. En: De Kretser, D. (Ed.). *Molecular Biology of the Male Reproductive System*. (pp. 67-97).New York: Academic Press.

Muntoni, S. (1971). *Quimioterapia antitumoral.* Madrid: Dossat S. A.

Murakami, S., Balmes, G., McKinney, S., Zhang, Z., Givol, D. y Crombrugghe, B. (2004). Constitutive activation of MEK1 in chondrocytes causes Stat1-independent achondroplasia-like dwarfism and rescues the *Fgfr3*-deficient mouse phenotype. *Gen. Develop. 18,* 290-305.

Neubert, D. (2002). Reproductive Toxicology: the Science Today. *Teratog. Carcinog. Mutag. 22,* 159-174.

Nunziata, A. (1998). An overview of current *in vitro* test procedures to reproductive toxicology. In: del Mazo, J. (Ed.). *Reproductive toxicology, in vitro germ cell developmental toxicology, from science to social and industrial demand.* (pp.171-183). New York: Plenum Press.

Odeigah, P. G. C. (1997). Sperm head abnormalities and dominant lethal effects of formaldehyde in albino rats. *Mutat. Res. 389,* 141-148.

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) (1993). Draft guidelines for testing chemicals: combined repeat dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test.

Pérez, F. G., García, R. M. C. y Altamirano, L. M. (2004). Estudio comparativo del daño genotóxico inducido por el cisplatino y por la casiopeína III-ia: en ratones machos, hembras, hembras preñadas y fetos de la cepa CD-1. En: *1er Congreso Nacional de Química Médica*. (pp. 49-52). México: Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN) Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Rivera, H. M., López, D. F., Porras, T. I., Gracia, M. I., Macias, R. L., Ruiz, A. L. y Alexanderson, E. (2004). Evaluación clínica de la casiopeína III-ia de un tumor mamario en rata wistar con la ayuda de la técnica PET. En: *1er Congreso Nacional de Química Médica.* (pp. 57-59). México: Unidad PET- ciclotrón , Facultad de Medicina; Unidad de Experimentación Animal, Facultad de Química; Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, Facultad de Química; UNAM.

Rivera, H. M., Rovira, I. A., Gracia , M. I., Tinoco, M. M., Sumano, L. H., Macías, R. L. y Ruiz, A. L. (1998). Determinación de dosis letal 50 aguda (DL50) de la Casiopeína III y V en rata y ratón por vía intravenosa e intraperitoneal y búsqueda de terapia adyuvante. En: *3ª jornada de trabajo en casiopeínas.* (pp. 32-35). México: Facultad de Química, UNAM.

Romero, A. A., Rosiles, M. R., Bautista, O. J., Sumano, L. H., Gracia, M. I., Ruiz, A. L. y Campos, S. E. (1996). Indicadores biomoleculares del efecto de la Casiopeína III en células de encéfalo de embrión de pollo. En: *2ª jornada de trabajo en Casiopeínas.* (pp. 54-58). México: Facultad de Química, UNAM.

Ruiz, A. L., Moreno, E. R., Gasque, L., Martínez, A. Ferrer, G., Redón, R., Solans, X., Briansó, J. L., Molins, E., Álvarez, A. y Piniella, J. F. (1996). Estudio estructural de las casiopeínas. En: *2ª jornada de trabajo en Casiopeínas.* (pp. 2-5). México: Facultad de Química, UNAM.

Sack, H. G. Jr. (2002). *Genética médica.* México: McGraw-Hill Interamericana.

Sadler, D. T. W. (2004). *Langman Embriología médica con orientación clínica.* (9ª ed.). México: Médica Panamericana.

Sakamoto, J. y Hashimoto, K. (1986). Reproductive toxicity of acrylamide and related compounds in mice – effects on fertility and sperm morphology. *Arch. Toxicol. 59:* 201-205.

Sánchez, B. F., Gracia, M. I., Roldán, R. E. y Ruiz, A. L. (2004). Estudio de los efectos genotóxicos, citostáticos y citotóxicos de la casiopeína III-ia en médula ósea y sangre periférica de ratón. En: *1er Congreso Nacional de Química Médica.* (pp. 120-122). México: Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), FES Zaragoza; Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, Facultad de Química; UNAM.

Scialli, R. A. (1992). *A Clinical Guide to Reproductive and Developmental Toxicology.* USA: CRC Press.

Seed, J., Chapin, R. E., Clegg, E. D., Dostal, L. A., Foote, R. H., Hurt, M. E., Klinefelter, G. R., Makris, S. L. Perreault, S. D., Schrader, S., Seyler, D., Sprando, R., Treinen, K. A. Veeramachaneni, D. N. R. y Wise, L. D. (1996). Methods for assessing sperm motility, morphology and counts in the rat, rabbit and dog: a consensus report. *Reprod. Toxicol. 10*: 237-244.

Shelby, M. D. (1988). Genetic Toxicology of Mammalian Male Germ Cells. En: Foster, P. (Ed.). *Physiology and Toxicology of male reproduction.* (pp. 203-223). New York: Academic Press, INC.

Shelby, M. D., Bishop, J. B., Mason, J. M. y Tindall, K. R. (1993). Fertility, Reproduction, and Genetic Disease: Studies on the Mutagenic Effects of Environmental Agents on Mammalian Germ Cells. *Environ. Health Perspec. 180,* 283-291.

Tovar, T. A. y Ruiz, A. L. (1996). Reactividad de la familia de la Casiopeína II y III frente a algunas moléculas constituyentes del ADN (Bases púricas y pirimídicas, así como algunos de sus derivados). En: *2ª jornada de trabajo en casiopeínas.* (pp. 83-89). México: Facultad de Química, UNAM.

Villar, C. M. L., Ruiz, R. L, y Gasque, S. L. (1996). Síntesis y caracterización de complejos mixtos de Cu II con Péptidos. En: *2ª jornada de trabajo en Casiopeínas.* (pp. 12-15). México: Facultad de Química, UNAM.

Vogel, G. H. y Vogel, W. H. (1997). *Drug discovery and Evaluation Pharmacological Assays.* Alemania: Springer.

Working, P. K. (1989). *Toxicology of the Male and Female Reproductive System*. New York: Hemisphere.

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

Wyrobek, A. J. y Bruce, W. R. (1975). Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Cell Biol. 11,* 4425 - 4429.

Wyrobek, A. J. y Bruce, W. R. (1978). The induction of sperm-shape abnormalities in mice and humans. En: Hollaender, A. y Serres, F. J. (Eds.). *Chemical Mutagens, Vol 5.* USA: Plenum Publishing Corporation.

Wyrobek, A. J. , Gordon, L. A., Burkhart, J. G., Francis, M. W., Kapp, R. W. , Letz, G. , Malling, H. V., Topham, J. C. y Whorton, M. D. (1983). An evaluation of the mouse sperm morphology test and other sperm test in nonhuman mammals. *Mutat. Res. 115,* 1-71.

Wyrobek, A. J., Schrader, S. M., Perreault, S. D., Fenster, L., Huszar, Katz, D. F. Osorio, A. M., Sublet, V. y Evenson, D. (1997). Assessment of

reproductive disorders and birth defects in communities near hazardous chemical sites. III Guidelines for field studies of male reproductive disorders. *Reprod. Toxicol. 11,* 243-259.

Wyrobek, A. F., Watchmaker, G. y Gordon , L. (1984). Sperm morphology testing in mice. En: Kilbey, B. J., Legatot, M., Nichols, W. y Ramel, C. (Eds.). *Handbook of Mutagenicity Test Procedures.* (2a ed.). California: Elsevier Science Publishers BV.