



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**

Toxicología reproductiva inducida por la  
Casiopéina III-Ea en ratón macho de la cepa CD-1.

**T E S I S**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA

PRESENTA

**PAULA BERENICE GARCÍA ZAMORA**

DIRECTOR DE TESIS

DR. MARIO A. ALTAMIRANO LOZANO

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA Y  
TOXICOLOGÍA AMBIENTAL



**F E S**  
**ZARAGOZA**

MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis 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*

Al Dr. Mario Altamirano Lozano. Por su confianza, paciencia, enseñanzas y apoyo durante este trayecto, pero principalmente le agradezco por darme la oportunidad de participar en este proyecto.

A los sinodales por el tiempo y atención dedicada a la revisión y estudio de la tesis, así como su siempre sabio consejo en la consecución de este trabajo.

A la MVZ. Adriana Altamirano y MVZ. Román Hernández, quienes participaron en cierta medida con su ayuda y conocimiento, para la elaboración de este trabajo, además de brindarme su amistad.

A mis compañeros de laboratorio y amigos, en especial agradezco a Miriam por su ayuda. Quienes con su amistad y apoyo me motivaron al término de este trabajo.

A la persona más allegada a mí, quien no solo me brindo su ayuda y apoyo incondicional, sino también su cariño durante esta etapa. Alfonso O. Camargo Sánchez.



## *Dedicatorías*

A mis padres:

José Javier García Pacheco y María de los Ángeles Zamora Reyes.

A quienes debo este triunfo profesional y agradezco toda su dedicación para darme una formación académica, por su infinito amor, paciencia y apoyo incondicional. Les dedico este logro, que también es de ellos.

A mis hermanos, Karen, Paty y Javier, por su apoyo, cariño. Por todos los momentos que hemos compartido juntos como familia.



## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b> pág.
1.1 Cáncer.....	1 pág.
1.2. Tratamientos contra el cáncer.....	2 pág.
1.3. El cobre y sus propiedades.....	7 pág.
1.4. Casiopeínas®.....	10 pág.
1.5. Casiopeína III-Ea.....	12 pág.
1.6. Pruebas Preclínicas.....	14 pág.
1.7. Toxicología.....	16 pág.
1.7.1. Toxicología Reproductiva.....	17 pág.
1.7.2. Estructura del Espermatozoide.....	19 pág.
1.7.3. Toxicología del Desarrollo.....	23 pág.
1.8. El ratón como modelo biológico.....	24 pág.
<b>2. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>27</b> pág.
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>28</b> pág.
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b> pág.
4.1. Objetivo General.....	29 pág.
4.2. Objetivos Particulares.....	29 pág.
<b>5. METODOLOGÍA.....</b>	<b>30</b> pág.
5.1. Animales.....	30 pág.
5.2. Compuesto Químico.....	30 pág.
5.3. Grupos.....	30 pág.
5.4. Evaluación Espermática (Motilidad y Morfología).....	32 pág.



---

5.5. Viabilidad Espermática.....	33 pág.
5.6. Evaluación de Fertilidad.....	33 pág.
5.7. Análisis de la Descendencia.....	34 pág.
5.8. Registro de datos y Análisis Estadístico.....	35 pág.
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>36 pág.</b>
6.1. Efecto Tóxico y Reprotóxico.....	36 pág.
6.1.1. Fertilidad.....	37 pág.
6.1.2. Evaluación Espermática. (Motilidad, Viabilidad y Morfología)...	38 pág.
6.2. Efecto Embriotóxico y Teratógeno de la descendencia de ratones machos tratados con Casiopeína III-Ea.....	42 pág.
6.2.1. Efecto Embriotóxico.....	42 pág.
6.2.2 Efecto Teratogénico.....	43 pág.
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>48 pág.</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>64 pág.</b>
<b>9. REFERENCIAS.....</b>	<b>65 pág.</b>



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1. 1. Cáncer

El cáncer surge como resultado de los defectos fundamentales de la regulación celular. En el curso de los años se ha propuesto un gran número de teorías para explicar el cáncer, pero en la actualidad se sabe que la mayoría de los cánceres, y quizá todos, surgen por defectos en el ADN (Pierce, 2005), dando lugar a un crecimiento indómito y diseminado de las células cancerosas (Guyton, 1984).

Las células cancerosas difieren de las células normales en muchas características, incluyendo la pérdida de la capacidad de diferenciación, de invasividad y la disminución de la sensibilidad a las drogas citotóxicas, estas características son resultado de la proliferación celular descontrolada y del proceso de evolución de la célula normal hacia una célula con potencial tumorigénico (Zaragoza *et al.*, 1997).

Las células cancerígenas son capaces de propagarse por el cuerpo gracias a dos mecanismos: invasión y metástasis. La invasión es la migración y la penetración directa de células cancerígenas en los tejidos vecinos (Macarulla *et al.*, 2009). Si las células del tumor permanecen localizadas, se dice que el tumor es benigno; si las células invaden otros tejidos se dice que el tumor es maligno. Las células que viajen por contigüidad a los tejidos adyacentes donde se establecen tumores secundarios, se dice que han establecido metástasis (Pierce, 2005), dicha diseminación se puede producir por vía linfática, por la sangre (García, 2003).

El cáncer empieza cuando una sola célula sufre una mutación que determina que la célula se divida a una velocidad anormalmente rápida. La célula prolifera y da lugar a un clon de células, cada una de las cuales puede poseer la misma mutación o no (Pierce,



2005). Se ha sugerido que las células cancerosas presentan mutaciones que inducen inestabilidad genómica y, por lo tanto, aceleran la tasa de mutaciones del genoma.

Algunas de estas mutaciones afectan a genes que codifican componentes de los mecanismos de control del ciclo celular (puntos de control), los cuales determinan el orden de los eventos de dicho ciclo, así como la fidelidad e integridad de los sistemas de replicación y reparación del ADN (Zaragoza *et al.*, 1997).

Se estima que, a nivel mundial, la mortalidad por cáncer aumentará un 45% entre 2007 y 2030 debido en parte al crecimiento demográfico y al envejecimiento de la población, durante el mismo periodo el número de casos nuevos de cáncer aumentará de 11,3 millones a 15,5 millones (OMS, 2009). En la mayor parte de los países desarrollados el cáncer es la segunda causa principal de mortalidad después de las enfermedades cardiovasculares, y los datos epidemiológicos muestran que el comienzo de esta tendencia se presenta en partes del mundo menos desarrollado, en particular en los países «en transición» y países de ingresos medianos, más de la mitad de los casos de cáncer se registran ya en países en desarrollo (OMS, 2009).

En México, durante 2007 se registraron 514 420 defunciones, de los cuales los tumores malignos ocuparon el tercer lugar entre las principales causas de muerte del país con 68 815 casos (13.4%); por debajo de los decesos por las enfermedades del sistema circulatorio y las enfermedades endocrinas, nutricionales y metabólicas (INEGI, 2010).

## **1. 2. Tratamientos contra el Cáncer**

La meta terapéutica contra el cáncer es lograr la muerte selectiva de células neoplásicas. En principio, existen al menos dos estrategias para alcanzar esta meta. La primera, es importante que el fármaco se acumule en el tejido tumoral para que favorezca su acumulación en células transformadas. La segunda, busca activar selectivamente la



maquinaria de muerte celular en las células tumorales sin dañar las células sanas (Alberts *et al.*, 1999).

Los tres tipos más comunes de tratamiento para el cáncer son: la cirugía; que es el retiro quirúrgico de la masa tumoral, se aplica a tumores sólidos y semisólidos, preferentemente bien localizados (Josep y López, 1998). La radioterapia clínicamente se refiere a la erradicación de tumores mediante radiaciones ionizantes, rayos x, rayos gama (Josep y López, 1998; Morris *et al.*, 1998), sin embargo de la misma manera que actúa sobre células tumorales puede provocar cambios sobre las células normales, transformándolas en tumorales y por último la quimioterapia (Josep y López, 1998).

La quimioterapia, consiste principalmente en el uso de fármacos capaces de actuar sobre el organismo eliminando a las células cancerosas que continúan proliferándose, con el fin de combatirlo y destruirlo causando el mínimo daño a las células normales (Pratt *et al.*, 1994). En la actualidad, se han descubierto y se están utilizando otras formas como son la inmunoterapia, la hipertermia, la hipotermia, la hormonoterapia, así como otros que se encuentran en fase experimental como la terapia génica (Bravo, 1998), las cuales han reducido el uso de procedimientos quirúrgicos radicales, además de que pueden combinarse para lograr mejores resultados.

Sin embargo, la utilización de antineoplásicos o citostáticos los cuales son fármacos utilizados en el tratamiento del cáncer, es la alternativa más común (Phillip, 2003). Los citostáticos se pueden administrar con fines curativos o paliativos, ya que a veces cánceres avanzados pueden ser controlados con terapia farmacológica durante períodos prolongados aumentando el tiempo de supervivencia del paciente (García, 2003).

Los fármacos antineoplásicos tienen características especiales que los hacen diferentes a otros grupos farmacológicos, son fármacos con un estrecho margen terapéutico, una elevada toxicidad y pueden inducir resistencia en las células cancerosas



(Didier y Delprat, 2004). En cuanto a su mecanismo de acción afectan principalmente a la síntesis del ADN (Taylor y Dawson, 2003).

Existen factores farmacológicos que pueden influir en la respuesta a estos fármacos como son; la vía de administración, la farmacocinética, la transformación y la farmacodinámica del compuesto, la biotransformación, la excreción, la interacción con otros medicamentos, la resistencia neoplásica y la toxicidad (Ruano y Calderón, 2001; Chabner y Longo, 2006).

Los fármacos empleados en las terapias oncológicas pueden clasificarse en varias categorías, ya sea en función de cómo actúan y cómo afectan a las células cancerígenas (Skeel, 2007). Conociendo en qué momento del ciclo celular actúan y qué actividad concreta bloquean para frenar la multiplicación de la enfermedad, los médicos pueden decidir qué fármaco actuará mejor sobre cada tipo de tumor, si deben combinarse varios de ellos para lograr una mayor eficacia, si se puede emplear conjuntamente con algún otro tipo de medicamento e incluso cuándo debe administrarse para lograr el efecto deseado (Didier y Delprat, 2004).

En la actualidad, los agentes quimioterapéuticos pueden agruparse de acuerdo a su estructura química y mecanismos de acción:

➤ *Antineoplásicos que actúan sobre el ADN*

Afectan a la integridad de las cadenas de ácidos nucleicos, fundamentalmente al ADN, impidiendo la replicación celular normal. Dentro de este extenso grupo de antineoplásicos existen distintos subgrupos (García, 2003):

I. Agentes alquilantes; actúan a través de un grupo reactivo alquilo capaz de formar enlaces covalentes con los ácidos nucleicos. Se establecen enlaces transversales entre dos

filamentos del ADN, lo cual impide la replicación o la transcripción o se puede producir la ruptura de los filamentos del ADN y de esta manera alterar o evitar la duplicación celular por ejemplo: Platinos, Ciclofosfamida y Busulfán (Taylor y Dawson, 2003; Boulikas *et al.*, 2007).

II. Antimetabolitos; la estructura química de los antimetabolitos es parecida a la de ciertos componentes necesarios para la síntesis de los ácidos nucleicos (Skeel, 2007). Debido a esta similitud interfieren en el metabolismo normal de la célula y en particular en la síntesis de las bases púricas y pirimídicas. Su toxicidad es dependiente de la dosis y el tiempo. Actúan directamente sobre enzimas específicas, ya sean inhibiéndolas o bien sintetizando moléculas aberrantes no funcionales. Por ejemplo, 5-Fluorouracilo (5-FU) es un análogo de la base pirimídicas uracilo, y puede incorporarse en su lugar o llevar a cabo un bloqueo enzimático de su transformación en timidina (Didier y Delprat, 2004).

III. Antibióticos citostáticos; los fármacos de este grupo sólo tienen en común su origen natural, principalmente son heterogéneos de origen bacteriano. Actúan alterando el ADN celular por mecanismos muy variados (García, 2003). Algunos de estos dependen del antibiótico, por ejemplo; la dactinomicina impide la transcripción al interferir con el ARN polimerasa. La doxorubicina inhibe la transcripción y la replicación porque inhibe la topoisomerasa II. La bleomicina actúa fragmentando las cadenas de ADN (Taylor y Dawson, 2003).

➤ *Antineoplásicos que actúan sobre la mitosis celular*

Actúan interfiriendo en el proceso de la mitosis y, por tanto, impiden la reproducción celular (Pratt *et al.*, 1994). No afectan directamente al ADN y tienen poco efecto sobre las células que no se dividen (García, 2003). Afectan a los microtúbulos necesarios para formar el huso cromático en la mitosis, impidiendo su formación (alcaloides de la Vinca) o promoviendo la formación de estructuras microtubulares alteradas que no



pueden participar en la mitosis (taxoides) (Skeel, 2007). Por ejemplo los alcaloides de la vinca, vinblastina y vinorelbina y el etopósido (Pratt *et al.*, 1994; Taylor y Dawson, 2003).

➤ *Antineoplásicos hormonales*

Amplio grupo de fármacos que actúan en tumores cuyo crecimiento depende del estímulo hormonal. Se utilizan fundamentalmente en procesos dependientes de hormonas sexuales como cáncer de mama y próstata (García, 2003). Ejemplos: Corticosteroides suprarrenales, antagonistas estrogénicos, estrógenos, progestágenos, antagonistas de los andrógenos (Taylor y Dawson, 2003).

➤ *Antineoplásicos que actúan sobre el sistema inmunitario*

Los fármacos de este grupo potencian la acción del sistema inmunitario, ya que éste es capaz de reconocer y destruir las células cancerosas. Los dos representantes de este grupo son la *aldesleukina* y la *vacuna Bacilo Calmette Guerin (BCG)*. La *aldesleukina* tiene acción inmunomoduladora y antineoplásica. Químicamente es una glucoproteína cuya acción antitumoral es debida a que induce una respuesta citolítica, mediada por linfocitos T, en las células tumorales (García, 2003).

En cuanto a la elevada toxicidad de los antineoplásicos en general, ésta se debe fundamentalmente a que no actúan sólo sobre las células tumorales sino también sobre células normales o malignas, especialmente sobre las células con mayor actividad proliferativa cíclica y su actividad es mínima frente a las células en reposo (Taylor y Dawson, 2003), por ejemplo las de la mucosa digestiva, las de la médula ósea y las de los folículos pilosos (García, 2003). Como consecuencia de este efecto citotóxico sobre células normales producen alteraciones gastrointestinales, anemia, vómito, náuseas, diarrea, supresión funcional de la médula ósea y del sistema inmune, así como anafilaxia y

cambios en el sistema urinario. De forma crónica se presentan daños en el corazón (Powis y Hacker, 1991), trombocitopenia, leucopenia, alopecia (García, 2003), toxicidad pulmonar, toxicidad hepática y daño renal (Phillip, 2003).

Además de que muchos de estos fármacos pueden producir también esterilidad, teratogenicidad y carcinogenicidad, sumados a los efectos secundarios propios de cada fármaco (Szabo, 1998; Chabner y Longo, 2006).

Por lo anterior, en las últimas décadas la producción de antineoplásicos se ha enfocado en la investigación de quimioterapéuticos de menor toxicidad y más específicos para cada tipo de cáncer. Dentro de estas nuevas drogas se encuentran las conformadas por metales como el platino, rutenio, oro, plata, mercurio, arsénico, zinc, vanadio y cobre (Fajardo, 2007).

### **1.3. El Cobre y sus propiedades**

El cobre (Cu) se encuentra principalmente en forma de compuestos minerales. Está ampliamente distribuido en todos los continentes y forma parte de la mayoría de los organismos vivos (Gunnar, 1998). Aunque se han descubierto algunos depósitos naturales de cobre metálico generalmente se extrae en forma de sulfuros, como es el caso de la covelita (CuS), la calcocita (Cu<sub>2</sub>S), la calcopirita (CuFeS<sub>2</sub>) y la bornita (Cu<sub>3</sub>FeS<sub>3</sub>); o de óxidos, como la malaquita (Cu<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(OH)<sub>2</sub>); la crisocola (CuSiO<sub>3</sub>·2H<sub>2</sub>O) y la calcantita (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O) (Carson, 1987; Gunnar, 1998) .

Debido a sus propiedades eléctricas, más del 75 % del cobre que se produce se utiliza en la industria eléctrica (Gunnar, 1998). Se utiliza en muchas aleaciones: latón, berilio-cobre, latón, bronce, óxido cúprico, cromatos de cobre (Carson, 1987). Entre otros usos de este metal se encuentra la fabricación de cañerías para el agua, material para techos, baterías de cocina, equipos químicos, farmacéuticos y producción de aleaciones

de cobre (Gunnar, 1998). Es componente de pesticidas, pinturas, fungicidas, insecticidas y cerámicas (Carson, 1987).

El cobre es un elemento esencial en los sistemas biológicos incluyendo el humano, sus propiedades químicas le permiten la participación en procesos fundamentales que involucren la transferencia de electrones asociada a enzimas oxidantes, por ejemplo la hemocianina, citocromo oxidasa y superóxido dismutasa (Bravo *et al.*, 2002), también interfiere en la respiración mitocondrial, biosíntesis de melanina, metabolismo de la dopamina, homeostasis del hierro, defensa antioxidante, angiogénesis, formación de matriz extracelular y amidación peptídica (Mejía *et al.*, 2006).

**Cuadro 1.** Diferentes tipos de exposición al cobre, concentraciones y su toxicidad (OMS, 2003; ASTSDR, 2004; Araya *et al.*, 2005).

Tipo de Exposición		Concentración de Cobre		Toxicidad producida
		Permisible	No permisible	
Vía Oral	Agua (resultado de la corrosión de tuberías interiores de cobre)	<2 mg/l	>10 mg/l	➤ Toxicidad Aguda: problemas gustativos, vómitos, diarrea, hiperactividad, calambres estomacales, sudoración, síndrome premenstrual, irritación del tracto gastrointestinal.
	Alimentos	1.2 - 1.5 mg/día	8 - 10 mg/día	➤ Toxicidad Crónica: daños hepáticos y renales, hepatitis, cirrosis, convulsiones, coma y la muerte.
Inhalación	Polvos y humos	1 - 200 ng/m <sup>3</sup>	> 5,000 ng/m <sup>3</sup>	➤ Toxicidad Aguda: alta temperatura, sabor metálico, náusea, tos, debilidad general, dolor muscular, y agotamiento. ➤ Toxicidad Crónica: irritación del tracto respiratorio superior, congestión de membranas mucosas nasales, ulceración y perforación del tabique nasal, y congestión de la faringe.
Vía Cutánea	Polvos y humos	0.1 - 1.0 mg/m <sup>3</sup>	>1.0 mg/m <sup>3</sup>	➤ Toxicidad Aguda: Causa irritación a la piel, incluyen enrojecimiento, comezón y dolor, decoloración de la piel a negro-verdoso, causar dermatitis suave.

El cobre es absorbido por el estómago, el intestino, en el suero sanguíneo es transportado principalmente por el ceruloplasmina, en partes pequeñas por la histidina y la albumina, la exposición al cobre puede ser por vía oral, por inhalación y cutánea (Cuadro 1) (Carson, 1987; Nasulewics *et al.*, 2004).

La deficiencia de dicho metal en el organismo y su alteración en la metabolización puede inducir anemia, neutropenia, anormalidades esqueléticas (por desmineralización), algunas de las enfermedades relacionadas con el déficit de cobre es la enfermedad de Wilson también llamada degeneración hepatolenticular progresiva; es una enfermedad hereditaria por genes recesivos autosómicos, los cuales codifican una proteína transportadora de cobre, cuya disfunción permite que se acumulen grandes cantidades de este metal en el organismo, lo que origina una disfunción de las estructurales hepáticas, del sistema nervioso central, de los riñones, huesos y ojos (Gunnar, 1998; Mejía *et al.*, 2006; Cermeño, 2007).

Sin embargo, el cobre también ha sido utilizado con fines terapéuticos. Algunos compuestos reductores del Cu, tales como, penicilamina, tetratiomolibdato (TM) y capyopril, entre otros, son efectivos en la terapia antiangiogenica y ofrecen ciertas ventajas como: efectividad en el tratamiento de varios tumores, bajo riesgo de toxicidad, la posibilidad de combinarse con otra estrategia antitumoral, su bajo costo y además presenta un interés especial como estrategia cuando los procedimientos médicos son limitados para monitorear la progresión del tumor antes de tomar una decisión terapéutica (Nasulewics *et al.*, 2004).

Son las características citadas anteriormente las que llevaron a su elección para formar parte como centro metálico, en el diseño de las Casiopeínas®.

#### 1.4. Casiopeínas®

En México, existe una necesidad creciente por dar servicio a la demanda de salud en pacientes con problemas de cáncer. El costo de la quimioterapia como tratamiento primario o adyuvante en ocasiones, puede ser una opción inaccesible a un gran número de pacientes (Ruiz y Gracia, 2006). Así, en la búsqueda de nuevas alternativas, un grupo de investigadores de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, encabezado por la Dra. Lena Ruiz Azuara. Han diseñado, sintetizado y caracterizado una serie de fármacos a partir de metales de transición; los cuales son biológicamente esenciales y análogos al cisplatino (Ruiz-Azuara *et al.*, 1991). Obteniendo como resultado una familia de compuestos de coordinación con cobre como núcleo metálico, a los que se denominó CASIOPEÍNAS® (Tovar-Huerta *et al.*, 2006), con fórmula general  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{N-O})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$  ó  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$  (Bravo *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2006).

Las diversas combinaciones entre los sustituyentes de las Casiopeínas® han originado alrededor de 100 compuestos que se clasifican por subfamilias, que van de la familia I a la IX (Sánchez *et al.*, 2006). Algunos de los complejos estudiados de estas familias han mostrado tener actividad citostática, citotóxica y antineoplásica (Tovar-Tovar y Ruiz-Azuara, 1996). Su eficacia ha sido probada en diferentes líneas neoplásicas tales como: HeLa, (Gracia-Mora *et al.*, 2001), carcinoma ovárico (CH1) y leucemia murina (L1210) (De Vizcaya-Ruiz *et al.*, 2000), sarcoma (S180), melanoma B16 (Ruiz-Azuara *et al.*, 1991), entre otras.

Se ha demostrado que interactúan fácilmente con el ADN (Tovar-Tovar *et al.*, 2004), por lo que algunas casiopeínas inhiben el crecimiento y la proliferación celular e inducen muerte celular, en dosis semejantes o menores a las requeridas para ejercer el mismo efecto con otros quimioterapéuticos como el cisplatino y la mitomicina C (Fajardo, 2007).

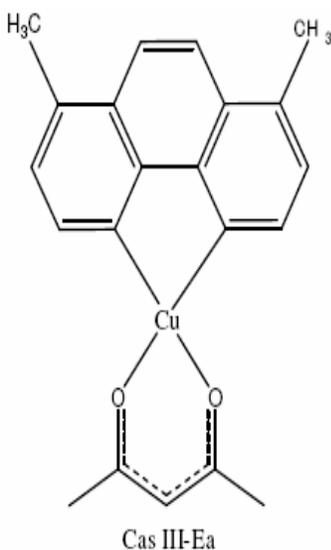
Otros de los efectos que producen son toxicidad materna, embriotoxicidad y fetotóxicidad, cuando se administra Cas III-ia a ratones macho (Bocanegra-Astivia y Altamirano-Lozano, 2006), mientras que las casiopeínas de la familia II y III afectan la función mecánica del corazón en forma dependiente dosis-tiempo (Hernández, 2004) e inducen crisis respiratoria en perros (García, 2007).

Como probable mecanismo de acción se ha propuesto, a la generación inicial de especies reactivas de oxígeno (ERO), producto de reacciones de oxido- reducción de tipo Fenton y Haber-Weis en la cual participa el cobre (Marín-Hernández *et al.*, 2003), que pueden causar daño oxidativo a diversas estructuras celulares como las mitocondrias, un ejemplo es producir pérdida del potencial de membrana mitocondrial con cambios en su permeabilidad y liberación de factores apoptogénicos o dañar el ADN (Marín-Hernández *et al.*, 2003; Serment-Guerrero *et al.*, 2006).

Los compuestos han cubierto de forma más que satisfactoria los requisitos de actividad solicitados internacionalmente tanto *in vitro* como en modelos de animales y han cubierto casi en su totalidad las pruebas preclínicas exigidas para el registro de un fármaco (Ruiz-Azuara y Gracia, 2006). Por lo que se ha sugerido como una alternativa en el tratamiento del cáncer dado que son menos tóxicas y tienen un menor costo, esto al ser comparadas con los compuestos como el cisplatino y el carboplatino (García-Rodríguez *et al.*, 2006).

## 1. 5. Casiopeína III-Ea

La Casiopeína III-Ea [Nitrato de agua, 4,7-dimetill-1,10-fenantrolina, acetilacetionato cobre (II)] (Fig. 1), presenta un peso molecular de 447.9 g/mol (Alemón-Medina *et al.*, 2007). Es ligeramente higroscópica y no reactiva a luz, soluble en agua, y en solución salina.



**Figura 1.** Estructura de la Casiopeína III-Ea (Cas III-Ea) (Tovar-Huerta *et al.*, 2006).

De acuerdo a investigaciones anteriores en las que se ha trabajado con la Cas III-Ea se reporta que presenta una buena actividad antineoplásica *in vitro* empleando cuatro diferentes líneas celulares tumorales de estirpe humana (Tovar-Huerta *et al.*, 2006). En cuanto a su mecanismo de acción se han realizado estudios donde demuestran que a diferencia de otras casiopeínas tiene actividad oxidativa en el citosol, sin embargo, dicho efecto aparece cuando se reduce la Cas III-Ea en presencia de ácido ascórbico (Alemón-Medina *et al.*, 2006), obteniendo como resultado un mayor efecto inhibitorio sobre las células cancerígenas incrementando su acción citotóxica, lo que confirma que la muerte celular que inducen muy probablemente se debe a la formación de radicales libres (Alemón-Medina *et al.*, 2006).



El diseño original de las Casiopeínas® contemplaba la posibilidad de interacción entre la casiopeína y la molécula de ADN, propiciando un posible efecto genotóxico. No obstante no todas cumplen con esta suposición, ya que, de acuerdo con un estudio realizado con cultivos de HeLa tratados con Cas III-Ea, por medio del “ensayo cometa”, mostró que se produce una extensa degradación del ADN, pero se conserva íntegra la membrana, este efecto es el resultado del proceso de apoptosis ya que de existir daño directo al genoma, el grado de fragmentación disminuiría total o parcialmente a medida que aumentara el tiempo de incubación post-tratamiento. Por el contrario si es consecuencia de apoptosis, el nivel de degradación de ADN aumenta (Serment-Guerrero *et al.*, 2006).

En cuanto a su actividad reprotóxica la Cas III- Ea ha inducido toxicidad materna, ya que en estudios anteriores en ratones hembra gestantes de la cepa CD-1 provocó, la muerte del 90% de los individuos gestantes en dosis de  $\frac{1}{4}$  de su  $DL_{50}$  (3.25 mg/kg), así como embriotóxicidad y fetotóxicidad en su descendencia (Camargo *et al.*, 2009). Además de inducir aberraciones cromosómicas en células de médula ósea de ratón, e inhibir la división celular debido a una disminución en el índice mitótico (Beltrán y Trinidad, 2009).

Sin embargo, se sigue estudiando dicho antineoplásico con la finalidad de optar por los compuestos menos tóxicos y de este modo evitar efectos secundarios al organismo.

## 1.6. Pruebas Preclínicas

El descubrimiento de un nuevo fármaco parte del conocimiento de un determinado proceso biológico, o bien de una sustancia con potencial terapéutico ya conocido. Una vez que se ha identificado un compuesto con potencial terapéutico comienza su desarrollo en el cual se identifican dos etapas denominadas estudios preclínicos y estudios clínicos (Román, 1990; Phillip, 2003; García, 2007). Además comprenden una serie de procedimientos necesarios que se deben de realizar al fármaco antes de ser utilizado en humanos tales como: farmacocinética (liberación, absorción, distribución, metabolismo y eliminación del fármaco), farmacodinamia, perfiles de dosis-respuesta y potencial toxicológico (Chi-Jen *et al.*, 2003).

También se realizan estudios complementarios de seguridad, destinados a descartar los efectos no deseados sobre otros órganos o tejidos, así como las posibles interacciones con otros fármacos, ya que toda actividad farmacológica potencial suele estar acompañada de efectos no deseados, en algunos casos perjudiciales. De aquí la gran importancia que tiene los programas de identificación y selección de los compuestos a desarrollar (Clark *et al.*, 1993).

Los investigadores, emplean una multitud de técnicas sofisticadas para observar, reportar y analizar los efectos primarios y secundarios que podría tener la sustancia en el hombre, las cuales van desde tratamientos *in vitro*, el uso de cultivos de órganos y tejidos, hasta el uso de modelos *in vivo* (Román, 1990), específicamente en animales los cuales son fundamentales en pruebas preclínicas ya que ofrecen un perfil toxicológico general del fármaco (García, 2007).

Si el compuesto, llena las dos características del propósito, es decir, seguridad y actividad biológica se procede al registro y patente, una vez comprobada su eficacia se prueba el ensayo en humanos, a este proceso se le llama Ensayo o Estudio Clínico (Feris *et al.*, 1996). El objetivo principal del ensayo clínico es el de establecer objetivamente evidencias de seguridad y eficacia. La seguridad es usualmente determinada comparando la nueva droga con una bien conocida, con un tratamiento conocido o un placebo. Los diferentes tipos de criterios para medir los parámetros de eficacia incluyen la presencia o no de síntomas, signos, alguna otra manifestación de enfermedad o cualquier cambio de estos parámetros durante el tratamiento (Feris *et al.*, 1996; Chi-Jen *et al.*, 2003).

La realización de estos estudios representa alrededor del 60-70 % de tiempo y el 30% del costo total del desarrollo (García, 2007), los cuales constan de las siguientes fases:

- Fase I: también conocidos como desarrollo del perfil farmacológico; establece la dosificación y seguridad del medicamento candidato, la duración de su permanencia en el organismo y otros factores preliminares, es decir cómo se absorbe, su distribución, su metabolización y excreción. Durante esta fase se estudian aproximadamente entre 20 y 30 voluntarios sanos, el nivel de dosis inicial será el mínimo y se irá incrementando o disminuyendo cuidadosamente, según sea el caso dependiendo de los efectos observados. Los resultados preliminares de la Fase I pueden determinar el inicio de pruebas de *toxicidad crónica*, a fin de ver el efecto que tendría un tratamiento completo (Román, 1990; Feris *et al.*, 1996; Chi-Jen *et al.*, 2003; Phillip, 2003).
  
- Fase II: comienza después de haber determinado el intervalo de dosis tolerada. El objetivo principal es presentar evidencias de que el fármaco presenta los efectos sugeridos por las pruebas preclínicas (Page *et al.*, 1998). En estas pruebas también se investigan datos farmacocinéticos, se verifica la manifestación de efectos colaterales. Se evalúa entre 100 y 200 pacientes (Román, 1990; Feris *et al.*, 1996).

- Fase III: se inicia solo en caso de que los datos de la fase anterior indiquen un buen resultado; en esta etapa se pretende evaluar el beneficio terapéutico real del producto en práctica, el rango de efectividad y de riesgo (Román, 1990). Se realiza entre 1000 a 3000 pacientes de forma ambulatoria, como en pacientes hospitalizados de acuerdo a las características del fármaco (Feris *et al.*, 1996). Una vez comprobada su eficacia se podrá aprobar para su distribución y uso.
- Fase IV: el hecho de obtener la probación gubernamental y de haber iniciado su comercialización del fármaco, no concluye la investigación sobre el mismo, se continúa monitoreando su comportamiento (Román, 1990). Debido a que muchos de los efectos secundarios inusuales y alergias, se pueden observar solamente tras el amplio uso por un gran número de pacientes, reuniéndose más datos acerca de su eficacia y toxicidad (García, 2007).

No obstante, se sabe que por cada 10,000 moléculas probadas solo 10 de estas alcanzan la etapa de notificación de medicamentos en fase de investigación clínica y probablemente solo una se convierta en un medicamento nuevo (Velasco, 2003).

### 1.7. Toxicología

La toxicología se define como la ciencia que estudia los efectos nocivos provocados por agentes químicos sobre los sistemas biológicos (Gutiérrez y López, 2001; Medina *et al.*, 2009). En términos generales se busca demostrar la seguridad del fármaco bajo condiciones de uso similares a las que se ha destinado, así como describir los signos y efectos asociados a su toxicidad y determinar un margen de seguridad (Gutiérrez y López, 2001).

Los ensayos de toxicidad y los estudios preclínicos; son un eslabón fundamental en la cadena de requisitos regulatorios para los ensayos clínicos, pues estos permiten hacer una evaluación exhaustiva del fármaco a probar, a través del comportamiento de los animales durante un tiempo predeterminado para registrar las lesiones generadas. De manera particular las pruebas toxicológicas preclínicas consisten en una serie de estudios agudos, subagudos, crónicos y de potencial mutagénico y carcinogénico, diseñados para determinar los efectos tóxicos del compuesto sobre los sistemas de órganos en los animales (Medina *et al.*, 2009).

Los estudios toxicológicos se pueden clasificar en: generales, cuyo objetivo es demostrar cualquier tipo de efecto tóxico que afecte morfológica o funcionalmente a los distintos órganos o sistemas del individuo (Markey, 2001), mientras que los específicos; son aquellos que se clasifican en función del efecto que se quiere investigar ya sea por órgano (Ej. hepatotoxicidad) o sistema (Ej. neurotoxicidad) que se estudia o por el tipo de daño (irritabilidad, carcinogenicidad) (Medina *et al.*, 2009).

Así mismo se realizan estudios durante los tres segmentos de la reproducción (debido a que los fármacos son productos que se administran durante la vida de un individuo, incluyendo la etapa reproductiva del mismo).

### **1. 7. 1. Toxicología Reproductiva**

La toxicidad reproductiva se define como la aparición de efectos adversos en el sistema reproductor, en el sistema endocrino o ambas. Muestra de ello son las alteraciones en el comportamiento sexual, reducción de la fertilidad (Gutiérrez y Salsamendi, 2001), modificación del proceso normal de desarrollo de un organismo durante la gestación, durante la lactancia o su desarrollo postnatal hasta alcanzar su madurez sexual e impedir de esta manera que se pueda completar el ciclo reproductivo



(Altamirano, 2006). Además modifica otras funciones de las cuales depende de la integridad del sistema reproductor como alteraciones genéticas y cromosómicas (Gutiérrez y Salsamendi, 2001). Este concepto también puede incluir los siguientes términos:

- Toxicidad en órganos; pudiendo interferir en la función normal del sistema reproductor (Branch, 2004).
- Teratogenocidad; es la capacidad de causar dismorfogénesis en el feto en desarrollo (Branch, 2004).
- Toxicología del desarrollo; involucra las alteraciones que se puedan dar durante el proceso del desarrollo embrionario, es decir, desde la gametogénesis hasta la embriogénesis, como resultado de los cambios en el sistema materno (Altamirano, 2006).

Según el sexo, un mismo tóxico puede producir diferentes efectos al entrar en contacto con el organismo. Los mecanismos específicos mediante los cuales estos agentes reprotóxicos causan daño a células somáticas y germinales son en general desconocidos debido principalmente a la escasez de sistemas, que permitan evaluar el efecto de estos agentes, sus metabolitos y sustancias análogas sobre distintos tipos celulares, en especial los gametos (Bonilla *et al.*, 2001).

En los machos la elevada y constante producción de células gaméticas, así como múltiples componentes que integran su sistema reproductor lo hace más susceptible al daño inducido por agentes exógenos (Aragón, 1998). Siendo dichas células gaméticas masculinas las más accesibles, utilizadas para evaluar efectos genotóxicos y pueden ser examinados de manera rápida, reproducible y en gran número (Wyrobek, 1979).

Los espermatozoides son utilizados en pruebas de toxicología reproductiva por qué se puede evaluar daño espermatogénico, efectos de fertilidad y mutaciones génicas heredables (Foster y Lamb IV, 1988). Las consecuencias genéticas de la fertilización con espermatozoides dañados por exposición a un químico, no se conocen aun, pero espermatozoides que llevan anomalías numéricas y estructurales en los cromosomas pueden afectar la viabilidad, el desarrollo y la salud del embrión (Wyrobek *et al.*, 1984; Wyrobek, 1993).

### 1. 7.2. Estructura del espermatozoide.

El espermatozoide se divide en dos partes principales (Fig. 2):

➤ **Cabeza:** *núcleo, acrosoma* (rodea las 2/3 partes del núcleo), capa fina de citoplasma carente de orgánulos (Rodríguez *et al.*, 2003).

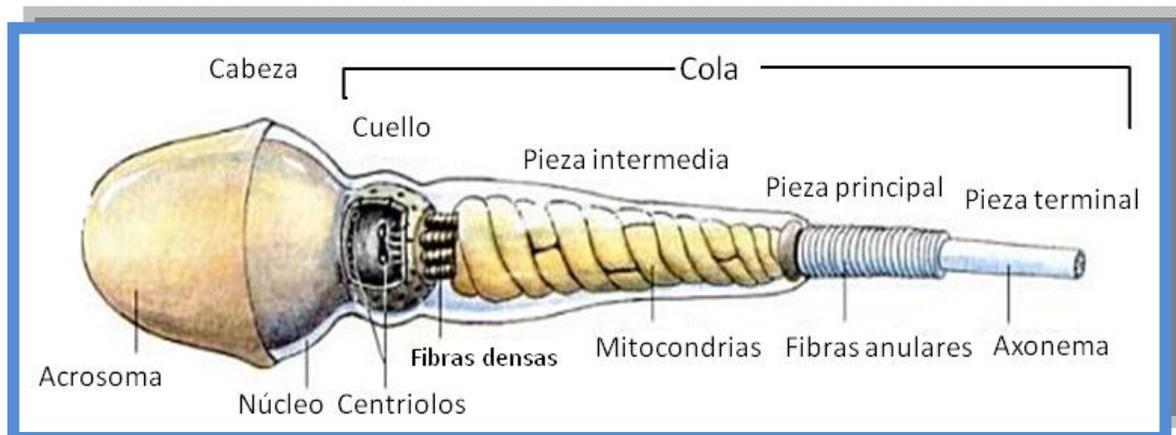
➤ **Cola:** *cuello*; es un estrechamiento que se produce inmediatamente después de la cabeza y que da origen al flagelo. Es donde se localizan los centriolos (Rodríguez *et al.*, 2003).

*Porción intermedia*; presenta el axonema del flagelo rodeado por nueve fibras externas densas, rodeando esto se encuentra las mitocondrias dispuestas en forma helicoidal. Conforme nos acercamos a la siguiente pieza, se detecta por debajo de la membrana plasmática un engrosamiento fibroso denominado anillo fibroso, que impide que las mitocondrias se deslicen hacia la pieza principal.

*Porción principal*; es la parte más alargada. Presenta el axonema del flagelo y las nueve fibras externas densas procedentes de la pieza intermedia.

*Porción terminal*; es una porción muy corta de la cola y está constituida por el axonema del flagelo (Rodríguez *et al.*, 2003).

En los mamíferos las células germinales atraviesan por procesos de división celular (mitosis y meiosis) y de transformación celular durante la espermatogénesis y la espermiogénesis. 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).



**Figura 2.** Estructura del espermatozoide humano (Rohen y Lütjen-Decroll, 2008).

La espermatogénesis es un proceso que se lleva a cabo en los túbulos seminíferos del testículo y comienza en la adolescencia. Consta de una serie de etapas de división y diferenciación celular, cuya duración es dependiente de la especie; en el humano es de 74 días, en la rata es de 53 días y en el ratón es de 35 días (Johnson *et al.*, 1997).

La espermatogénesis consta principalmente de tres etapas de diferenciación celular (Fig. 3):

- *Fase inicial o Espermatocitogénesis.* Bajo el estímulo de la testosterona, las células de Sertoli se diferencian en un sistema de túbulos seminíferos. Las células germinales primordiales en reposo, reanudan su desarrollo, se dividen varias veces



por mitosis y meiosis, acaban diferenciándose a espermatogonias (Lanser y Lanser, 2003).

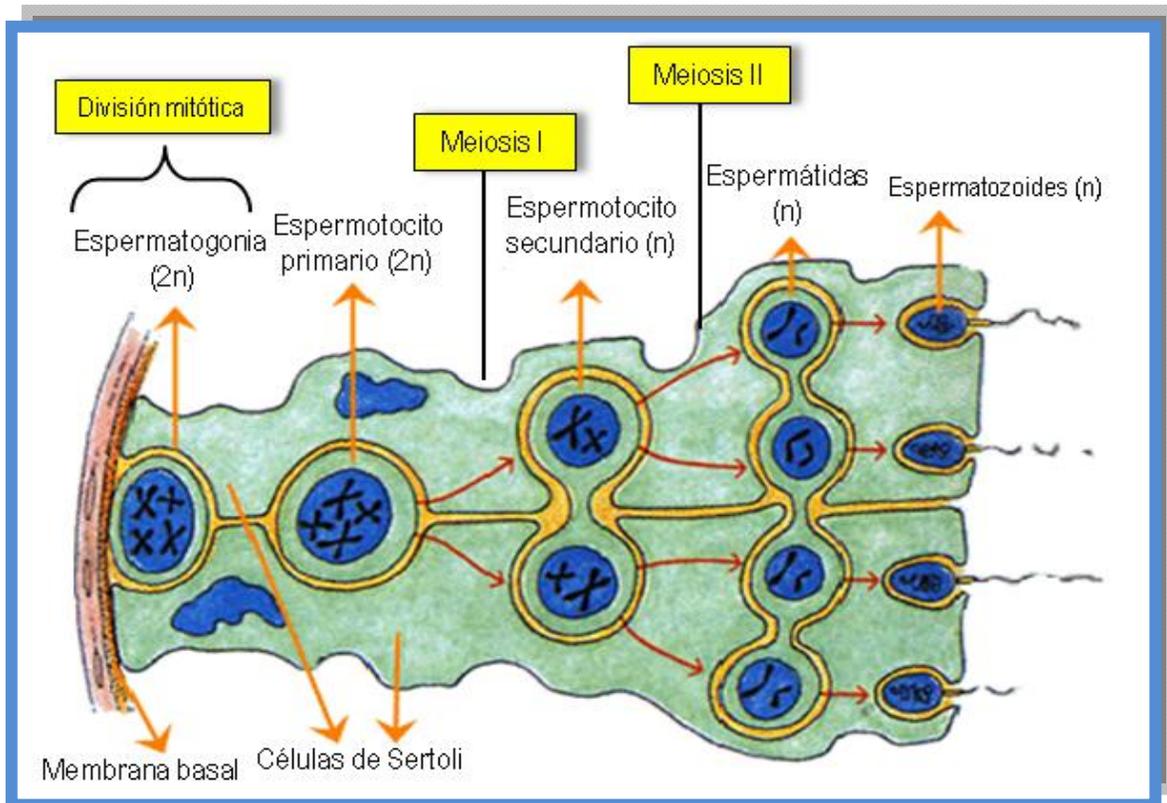
Las espermatogonias proliferantes dan origen a los espermatocitos en el compartimiento basal de los túbulos seminíferos a través de dos divisiones meióticas (Shing *et al.*, 1999).

- *Segunda fase.* A medida que la espermatogénesis progresa, estas células se trasladan gradualmente desde el lado basal al luminal del epitelio seminífero, pasando entre las células de Sertoli. Durante la fase migratoria, los espermatocitos primarios reclutados experimentan sin interrupción las dos divisiones meióticas, produciendo primero dos espermatocitos secundarios y después cuatro espermátidas (Cunningham, 2003; Lanser y Lanser, 2003). Los espermatocitos primarios y secundarios permanecen intercalados con el citoplasma de las células de Sertoli (Shing *et al.*, 1999).
  
- *Fase final.* Llamada espermiogénesis; es el proceso de transformación morfológica de las espermátidas a espermatozoides (Shing *et al.*, 1999), al mismo tiempo que completan su migración hacia la superficie luminal de los túbulos seminíferos, rompiendo las últimas conexiones con las células de Sertoli; este proceso final es llamado espermiación (Lanser y Lanser, 2003; Cunningham, 2003). Las características principales de la espermiogénesis incluyen la formación del acrosoma a partir del aparato de Golgi, la condensación y elongación del núcleo, la formación del flagelo y una extensa pérdida de citoplasma (Cunningham, 2003).

El apropiado funcionamiento de la espermatogénesis es una de las claves para la producción sucesiva de un número importante de espermatozoides (Sharpe, 1994), con características adecuadas de movilidad y capacidad de fertilización para producir descendencia saludable (Foster y Lamb IV, 1988). Sin embargo, las alteraciones de la

espermatozoides son frecuentes. El estudio de una muestra de semen puede mostrar espermatozoides con anomalías tales como cabezas pequeñas, estrechas o poliformes (forma de pera o banana), cabezas dobles o triples, defectos de los acrosomas y colas dobles (Wyrobek, 1975; Lanser y Lanser, 2003).

La mayoría de los estudios indican que los espermatozoides con morfología alterada muestran modificaciones en la movilidad y capacidad para llevar a cabo la reacción acrosomal, lo que impide que fertilicen al ovocito (Bonilla *et al.*, 1994). Se ha observado que la exposición a agentes tóxicos como diversos metales afectan la movilidad espermática, la cual es un indicador adecuado de daño reproductivo (Altamirano-Lozano *et al.*, 1997).



**Figura 3.** Diagrama de la Espermatogénesis en mamíferos (Patton y Thibodeau, 2008).

### 1.7.3. Toxicología del Desarrollo

El desarrollo embrionario es un proceso biológico complejo, desde la gametogénesis hasta la embriogénesis, debido a esto, durante el proceso pueden ocurrir algunos errores originando anomalías o defectos sobre el embrión. Pero dicho proceso también depende del sistema materno y del ambiente en que se desarrolle el producto. No obstante, al modificar o alterar por alguna causa el sistema materno esto puede dañar de manera indirecta al embrión. En estudios realizados durante el desarrollo embrionario han revelado que agentes químicos, físicos, así como deficiencias o excesos nutricionales son agentes que producen daño de manera directa al embrión produciendo malformaciones (Altamirano, 2006).

A dichas malformaciones congénitas o mutaciones ya sean inviábiles (abortos) o viables, son estudiadas por la teratología, término proveniente del griego *Theratos* que significa monstruo. En 1997, Wilson plantea los principios generales de la teratogénesis, los cuales describen la susceptibilidad a los agentes teratogénicos dependiendo del genotipo del producto, la interacción con el medio ambiente y el tiempo en el cual se produce la exposición, así como la vía específica (mecanismo) en las células en desarrollo y en los tejidos para originar una embriogénesis anormal (Álvarez, 2002). Dentro de estos mecanismos propuestos se encuentran: la mutación, la no disyunción y rompimiento cromosómico, interferencia mitótica, alteración de la integridad y función de los ácidos nucleicos, falta de precursores normales, fallas en las fuentes de energía celular, cambios en las propiedades de las membranas celulares, fallas en el balance de sales dentro y fuera de las células (osmolar), inhibición enzimática (Wilson, 1997). Otros principios generales de la teratogénesis es la ruta de llegada del agente al producto en gestación, la cual depende de sus propiedades físico-químicas. Y por supuesto la relación dosis- respuesta; la cual puede ser tan baja que no produce efecto adverso en el producto, pero cuando se incrementa también se incrementa el daño producido e incluso puede llegar a ser letal (Álvarez, 2002).

Los teratogénos son capaces de producir uno o más de los cuatro tipos de efectos sobre el desarrollo: 1) Muerte del organismo en desarrollo, 2) Anormalidades estructurales o malformaciones, 3) Deficiencia del desarrollo y 4) Deficiencia funcional (Scialli, 1992).

### **1.8. El ratón como modelo biológico**

El ratón de laboratorio es un roedor cuyo ancestro es el ratón común o ratón doméstico, cuyo nombre científico es *Mus musculus* (Andress *et al.*, 1992; Suckow *et al.*, 2001; Fuentes *et al.*, 2008). Sin embargo, el desarrollo del ratón de laboratorio como un modelo de investigación realmente comenzó con experimentos genéticos en el año 1900. Hoy en día, el ratón de laboratorio es reconocido como el modelo preferente para la investigación genética moderna. Los ratones también se utilizan en una variedad de otros tipos de investigación, incluyendo el cáncer, la inmunología, la toxicología, metabolismo, biología del desarrollo, la diabetes, la obesidad, el envejecimiento y la investigación cardiovascular. El hecho de que son genéticamente el mejor caracterizado de todos los mamíferos aumenta su valor para todos los campos de estudio (Suckow *et al.*, 2001).

A través de cruzamientos selectivos se han creado nuevas cepas de ratones de laboratorio, actualmente existen entre 100 y 120 cepas consanguíneas de ratón, siendo este mamífero el más usado en los laboratorios, debido a su capacidad de proliferación, a su capacidad de adaptación, a los conocimientos que se tiene acerca de su fisiología y a la factibilidad de su manejo (Andress *et al.*, 1992).

El ratón es un mamífero de sangre caliente, de hábitos nocturnos y su comportamiento está influenciado por feromonas. Posee un agudo sentido de la audición, por lo que se alteran rápidamente con los ruidos, es por ello que hay que tener cuidado con los equipos que se utilizan. Por su pequeño tamaño son muy susceptibles a cambios



ambientales, puesto que una variación de la temperatura entre 2 a 3°C, puede afectar su temperatura corporal y modificar su fisiología (Altamirano, 1994). El tamaño del ratón adulto varía de 12 a 15 cm desde la punta de la nariz a la punta de la cola; el largo de la cola es igual al largo del cuerpo y con un peso aproximado de 30g. Las crías al nacer tienen un peso aproximado de 1 a 2g y gana rápidamente peso durante la lactancia (Fuentes *et al.*, 2008). Tienen una vida útil de 10 a 12 meses y se obtiene de ocho a diez camadas.

Sin embargo, los machos de algunas cepas comienzan a mostrar su agresividad entre la séptima y décima semana de edad, aun cuando estos grupos se hayan establecido al destete. En el grupo de machos existe uno dominante que puede ser muy agresivo. Las hembras generalmente no pelean, incluso cuando se hayan agrupado siendo ya adultas. El acto de comer es cíclico, con un pico máximo durante el periodo de oscuridad. El mayor consumo de agua es durante las horas de oscuridad. El consumo de alimento y agua varía entre las cepas de ratones, cabe mencionar que los requerimientos nutricionales están determinados por la calidad genética, el estado de salud, la gestación y la etapa de desarrollo, pudiendo influir en los resultados de la investigación al modificar la respuesta de los animales a los fármacos u otros factores a los que se expongan (Altamirano, 1994; Bocanegra, 2005; Fuentes *et al.*, 2008).

En cuanto a su reproducción, la activación de los estrógenos provoca cambios reproductivos importantes en la hembra tales como la cornificación del epitelio vaginal y la apertura vaginal, los cuales se presentan entre los 24 y 28 días de edad, también produce una ovulación y es acompañada por estro vaginal (Altamirano, 1994), denominándose a dichos procesos ciclo estral, de esta manera la hembra es poliéstrica continua.



Tras el parto, a las 14-28 horas se produce un estro fértil, por lo que puede utilizarse el estro posparto. Hay que tener en cuenta que la lactancia y gestación simultáneas puede retrasar entre tres a cinco días la implantación del embrión (Bocanegra, 2005; Fuentes *et al.*, 2008).

El apareamiento o cópula puede averiguarse mediante la presencia de semen gelificado (Tapón vaginal) en el orificio vaginal de la hembra, el cual persiste de 18 o hasta 48 horas, o bien mediante citología exfoliante es decir; al realizar un frotis vaginal después del apareamiento, se observa la presencia de espermatozoides (Benardi *et al.*, 1999; Suckow *et al.*, 2001; Bocanegra, 2005).

El periodo de gestación de la hembra es de 19 a 21 días, durante dicho periodo se deben de tener sumo cuidado, debido a que diversos factores pueden inducir estrés sobre la hembra gestante. El parto ocurre usualmente durante la noche, y el número de productos depende de la cepa, el número de gestaciones y edad de la hembra (Altamirano, 1994; Álvarez y Medellín, 2005).

Debido a las características citadas anteriormente, es por lo que ha sido utilizado el ratón como modelo biológico para diversos estudios, sobre todo en estudios de toxicología reproductiva.

## 2. JUSTIFICACIÓN

El cáncer, al ser una de las enfermedades con mayor ímpetu en el panorama epidemiológico del país, se ha convertido en un grave problema de salud pública, a pesar de los avances en investigación y tratamiento. La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que alrededor de 84 millones de personas morirán a causa de esta enfermedad entre 2005 y 2015 (OMS, 2009).

Ya que existe un gran número de cánceres resistentes a los tratamientos quimioterapéuticos o simplemente incurables, la creación de nuevas opciones para el tratamiento oncológico, se ha vuelto una prioridad para varias instituciones tanto de salud como de investigación, principalmente enfocados en el desarrollo de fármacos que sean más selectivos y aminorando los efectos secundarios de estos.

Para México también se ha vuelto una prioridad la innovación de medicamentos ya que la gran mayoría de los tratamientos farmacológicos son elaborados en el extranjero, lo cual incrementa su costo, y son inaccesibles para algunos sectores de la población.

Así, en la búsqueda de alternativas, un grupo de investigadores de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, dirigido por la Dra. Lena Ruiz Azuara, se han enfocado en el diseño, síntesis y caracterización de una familia de compuestos de coordinación con Cobre como núcleo metálico, denominados CASIOPEÍNAS®, estos compuestos han demostrado tener actividad citostática, citotóxica, y antineoplásica en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*, comparable o superior a la del cisplatino, asociado a esto su costo de elaboración es considerablemente inferior, mostrando ser una alternativa para el tratamiento de cáncer.



No obstante son pocos los estudios realizados con Casiopeínas® que expongan su efecto toxicológico reproductivo, específicamente en líneas celulares germinales masculinas (espermatozoide). Por lo anterior se considera de suma importancia evaluar el efecto inducido por la administración de la Casiopeína III-Ea durante el proceso reproductivo del ratón macho de la cepa CD-1, así como evaluar el efecto toxico sobre su descendencia, mediante una prueba de fertilidad y evaluación espermática. Así como colaborar y complementar otras investigaciones sobre este antineoplásico, con el fin de que pueda ser utilizado como un tratamiento farmacológico contra el cáncer.

### 3. HIPÓTESIS

Se ha mostrado que la administración de algunas Casiopeínas® durante el proceso reproductivo del ratón macho y durante el ciclo espermatogénico, inducen disminución en la motilidad espermática, alteración en el desarrollo de la espermatogénesis, infertilidad y teratogenotoxicidad en su descendencia. Por lo tanto se espera que al administrar Cas III-Ea a ratones machos de la cepa CD-1 sexualmente maduros tendrá un efecto reprotóxico y afectará el desarrollo embrionario y fetal de su descendencia.



## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Evaluar el efecto toxicológico reproductivo inducido por la administración de Casiopeína III-Ea a diferentes concentraciones en ratones macho de la cepa CD-1, así como analizar el efecto teratógeno sobre su descendencia.

### 4.2. Objetivos Particulares

- Monitorear el efecto tóxico que se presenta en el macho durante la administración de 1/8, 1/16 y 1/32 de la  $DL_{50}$  de Cas III-Ea, mediante el porcentaje de mortalidad y peso corporal del ratón.
- Evaluar el porcentaje de fertilidad del ratón macho de la cepa CD-1 expuestos a diferentes concentraciones de Cas III-Ea, por medio de la incidencia de embarazo en hembras.
- Evaluar las funciones reproductivas del ratón macho de la cepa CD-1 tratado con Cas III-Ea a diferentes concentraciones, mediante parámetros tales como; la morfología y motilidad espermática.
- Evaluar la viabilidad espermática de ratón macho de la cepa CD-1 expuesto a 1/8, 1/16 y 1/32 de la  $DL_{50}$  de Cas III-Ea.
- Analizar la descendencia de los machos tratados con Cas III-Ea a diferentes concentraciones, por medio de los parámetros tales como: frecuencia y tipo de malformaciones anatómicas macroscópicas y esqueléticas.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. Animales

Se utilizaron 75 ratones machos de la cepa CD-1, de 2 meses de edad, sexualmente maduros, con un peso de 40-45 gramos, y 50 ratones hembras de la cepa CD-1 sexualmente maduras, con un peso de 30-40 gramos. Durante todo el periodo de tratamiento los ratones se mantuvieron bajo condiciones de luz-oscuridad controladas (12-12 hrs.), alimentación y agua *ad libitum*. Los animales fueron pesados al comenzar el tratamiento, durante el tratamiento (cada tercer día), y durante el periodo de apareamiento. En el caso de las hembras se pesaron durante el periodo gestación (cada tercer día) y hasta el momento del sacrificio.

### 5.2. Compuesto Químico

Se utilizó una solución de Casiopeína III-Ea [Nitrato de acua, 4,7-dimetill-1,10-fenantrolina, acetilacetato cobre (II)], preparada con agua inyectable, la cual fue inyectada vía intraperitonealmente (i.p.) conteniendo volúmenes adecuados desde 1.625 mg/kg (1/8 DL<sub>50</sub>), 0.8125 mg/kg (1/16 DL<sub>50</sub>), 0.40625 mg/kg (1/32 DL<sub>50</sub>). Para el grupo testigo positivo fueron tratados con Cloruro de Cadmio (CdCl<sub>2</sub>) preparado con agua inyectable e inyectado vía intraperitoneal (i.p.), conteniendo un volumen adecuado con una concentración de 4 mg/kg.

### 5.3. Grupos

Se utilizaron para este estudio 75 machos sexualmente maduros de la cepa CD-1, se dividieron en cinco grupos aleatoriamente (Cuadro 1). Grupo 1: testigo negativo (5 animales). Grupo 2: testigo positivo (10 animales) el cual se trató con Cloruro de Cadmio (CdCl<sub>2</sub>) cada tercer día, durante un periodo de 10 días. Después del periodo de

tratamiento, se sacrificaron 5 ratones para la evaluación espermática y se reservaron 5 animales los cuales se sometieron a una prueba de fertilidad, después del quinto día de apareamiento fueron sacrificados para las evaluaciones correspondientes.

**Cuadro 2.** Formación de los grupos para la evaluación espermática y fertilidad.

Grupo	Número de animales	Tratamiento	Tiempo de tratamiento
1 ( <i>Testigo negativo</i> )	5	Sin tratamiento	45 días
2 ( <i>Testigo positivo</i> )			
{ <i>Subgrupo 2.1</i>	5	Cloruro de cadmio (4 mg/kg)	10 días
{ <i>Subgrupo 2.2</i>	5	Cloruro de cadmio (4 mg/kg)	10 días
3 { <i>Subgrupo 3.1</i>	5	Cas III-Ea 1.625 mg/kg (1/8 DL <sub>50</sub> )	15 días
{ <i>Subgrupo 3.2</i>	5	Cas III-Ea 1.625 mg/kg (1/8 DL <sub>50</sub> )	30 días
{ <i>Subgrupo 3.3</i>	5	Cas III-Ea 1.625 mg/kg (1/8 DL <sub>50</sub> )	45 días
{ <i>Subgrupo 3.4</i>	5	Cas III-Ea 1.625 mg/kg (1/8 DL <sub>50</sub> )	45 días
4 { <i>Subgrupo 4.1</i>	5	Cas III-Ea 0.8125 mg/kg (1/16 DL <sub>50</sub> )	15 días
{ <i>Subgrupo 4.2</i>	5	Cas III-Ea 0.8125 mg/kg (1/16 DL <sub>50</sub> )	30 días
{ <i>Subgrupo 4.3</i>	5	Cas III-Ea 0.8125 mg/kg (1/16 DL <sub>50</sub> )	45 días
{ <i>Subgrupo 4.4</i>	5	Cas III-Ea 0.8125 mg/kg (1/16 DL <sub>50</sub> )	45 días
5 { <i>Subgrupo 5.1</i>	5	Cas III-Ea 0.40625 mg/kg (1/32 DL <sub>50</sub> )	15 días
{ <i>Subgrupo 5.2</i>	5	Cas III-Ea 0.40625 mg/kg (1/32 DL <sub>50</sub> )	30 días
{ <i>Subgrupo 5.3</i>	5	Cas III-Ea 0.40625 mg/kg (1/32 DL <sub>50</sub> )	45 días
{ <i>Subgrupo 5.4</i>	5	Cas III-Ea 0.40625 mg/kg (1/32 DL <sub>50</sub> )	45 días

Para los tratamientos con Cas III-Ea se asignaron los siguientes grupos. Grupo 3: 1.625 mg/kg (20 animales), Grupo 4: 0.8125 mg/kg (20 animales), Grupo 5: 0.40625 mg/kg (20 animales), los cuales fueron inyectados cada tercer día, por un lapso de 45 días. Cada uno de estos grupos se dividieron en 4 subgrupos (5 animales cada uno): de los cuales 3 subgrupos fueron sacrificados cada 15 días después de comenzar el tratamiento y el subgrupo restante se sometió a una prueba de fertilidad después de concluir el periodo de tratamiento (45 días), al quinto día de apareamiento fueron sacrificados para las evaluaciones correspondientes.

#### **5.4. Evaluación Espermática (Motilidad y Morfología)**

Después de la última inyección o finalizado el período de apareamiento (según el caso) los animales fueron sacrificados, por dislocación cervical. Posteriormente se les removió ambos conductos deferentes, por medio de un exprimido se extrajo el semen, colocándolo en 2 ml de solución de Tyrode's (Sigma la Compañía Química, San Louis, MO) a 37°C, mezclándolo y homogenizando la suspensión. Se colocó una gota de la suspensión espermática de cada animal en un portaobjetos y se observaron 10 campos (amplificación 400X) en un microscopio de contraste de fases (NIKON).

La motilidad espermática fue evaluada en un lapso de 5-7 minutos después del sacrificio del animal (Altamirano-Lozano *et al.*, 1996). Los espermatozoides se clasificaron como motil o no motil y los datos obtenidos se reportaron como el porcentaje de espermatozoides motiles, es decir el número de células móviles entre el número de células totales analizadas por cien (Seed *et al.*, 1996).

Para evaluar la morfología espermática se tomaron unas gotas de la suspensión espermática original y se colocó sobre un portaobjetos, realizándose un barrido y dejándose secar al aire, posteriormente se tiñeron con Giemsa (1:40 en agua). Para cada

muestra fueron evaluados más de 500 espermatozoides, a 100X, los espermatozoides se clasificaron como normal o anormal y los datos se reportaron como el porcentaje de espermatozoides anormales. También se reportó el porcentaje relativo de cada tipo de anomalía encontrado esto de acuerdo a los criterios descritos por Wyrobek y Bruce (1975, 1978) es decir; la morfología de la cabeza (cabeza de banana, gancho inusual, amorfo y sin cabeza) y la morfología de la cola (doble flagelo, enrollado sobre si) con algunas modificaciones (doble cabeza, macrocéfalos y microcéfalos).

### **5.5. Viabilidad Espermática.**

De la solución espermática anterior de cada ratón, se tomaron 10  $\mu$ L, se colocó en un tubo eppendorf, y se le adicionó 10  $\mu$ L de azul tripano, agitándose ligeramente y enseguida se colocó una gota sobre un portaobjetos contar 200 células por ratón siguiendo el criterio de inclusión-exclusión, es decir; las células muertas se tiñeron de azul y las células vivas más claras (Sigma cell culture, 1997). Los resultados se expresaron como el porcentaje de células viables, es decir el número de células viables entre el número de células totales analizadas por cien. (Seed *et al.*, 1996).

### **5.6. Evaluación de Fertilidad**

Veinticuatro horas después de la última inyección los machos (según el caso) fueron colocados durante 5 días con 2 hembras cada uno para la cruce. Al concluir este tiempo se revisó que las hembras presentaran un tapón vaginal como resultado del proceso de copula, verificando que la hembra fue preñada o no. Se evaluó la fertilidad de los ratones macho tratados por medio de la incidencia de embarazo y el número de implantaciones.

## 5.7. Análisis de la Descendencia

Una vez identificado el tapón vaginal se consideró ese día como “día cero”. Al cumplir 18 días de gestación fueron sacrificadas las hembras por dislocación cervical, obteniéndose los fetos, éstos se contaron conforme a la ubicación de cada uno de los cuernos uterinos. Se examinó el útero para identificar alguna evidencia de reabsorciones, y en qué porcentaje se presentaron. También fueron revisados los fetos para verificar cualquier malformación externa; se comprobó por medio de estimulación (al tocarlos presentaran movimiento) que estuvieran vivos y se registró el peso por camada.

Posteriormente fueron sacrificados y colocados en etanol al 70 por ciento por 24 horas, se tomó al azar dos terceras partes de los fetos obtenidos por camada, mientras que el otro tercio fue colocado en etanol al 70 por ciento para su conservación, se registró el sexo de los fetos extraídos y se procedió a retirar las vísceras para aclarar el tejido graso.

Después se colocaron en una solución de hidróxido de potasio (KOH) al uno por ciento, por un periodo de 24 a 72 horas aproximadamente, realizando tres cambios de la solución hasta que el esqueleto fue visible a través del tejido graso.

Para la tinción del esqueleto fueron expuestos a una solución 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, y preservarlos. Se realizó el análisis de las estructuras óseas de cada feto por medio de un estereoscopio, registrando todo tipo de evidencia de daño.



### 5.8. Registro de datos y Análisis Estadístico

Se calculó la media y la desviación estándar para los siguientes parámetros: peso corporal de los machos tratados, motilidad y viabilidad espermática, espermatozoides anormales, número de implantaciones por camada, reabsorciones por camada, peso por camada, la prueba utilizada por la cual se obtuvo el análisis estadístico fue la prueba “t” de Student (nivel de significancia  $P < 0.05$ ). Mientras que para el porcentaje de fetos con malformaciones anatómicas externas, malformaciones esqueléticas, y por camada se evaluaron por medio de una prueba “z” de diferencia de proporciones (nivel de significancia  $P < 0.05$ ). Comparando siempre los grupos tratados contra el testigo negativo.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Efecto Tóxico y Reprotóxico

La administración de Casiopeína III-Ea a ratones macho de la cepa CD-1 por un periodo de 45 días, provoco una ligera disminución sobre el peso corporal en los grupos tratados con 1.625 mg/kg (1/8 DL<sub>50</sub>) mostrando una diferencia estadísticamente significativa. Por otro lado es evidente el incremento en el porcentaje de mortalidad de los individuos expuestos a 1/8 DL<sub>50</sub> de Casiopeína III-Ea (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Ratones macho cepa CD-1 tratados con Casiopeína III-Ea durante 45 días según dosis aplicada y peso corporal (X ± D.E).

Ratones y peso corporal	Dosis aplicada				
	Testigo (-)	Testigo (+) CdCl <sub>2</sub> * 4 mg/kg	Cas III-Ea 0.40625 mg/kg (1/32 DL <sub>50</sub> )	Cas III-Ea 0.8125mg/kg (1/16 DL <sub>50</sub> )	Cas III-Ea 1.625 mg/kg (1/8 DL <sub>50</sub> )
Machos al inicio(n)	5	10	20	20	20
Mortalidad (%) <sup>a</sup>	0	0	0	5	20
Peso inicial (g)	43.48 ± 3.65	44.36 ± 2.15	41.39 ± 4.64**	41.70 ± 5.39**	41.08 ± 3.40**
Peso final (g)	42.94 ± 1	42.95 ± 1.39	42.32 ± 1.21	41.78 ± 0.40**	39.38 ± 1.11**
Ganancia de peso(g)	-0.54	-1.41	0.42	0.08	-1.7

\* Administrado durante 10 días, según dosis aplicada y peso corporal.

\*\* P <0.05 vs. Testigo Negativo, con prueba "t" de Student.

X: Media. D.E: Desviación Estándar.

<sup>a</sup>(nº de machos muertos/ nº total de machos )x100

### 6. 1. 1. Fertilidad

Para la evaluación de la fertilidad de los ratones machos expuestos a diversas dosis de Casiopeína III-Ea, fue utilizado como parámetro la incidencia de preñez que presentaron los ratones hembra de la cepa CD-1 al ser apareadas con estos ratones. Como se puede observar en el cuadro 4, el porcentaje de fertilidad que presentó el grupo tratado con 1.625 mg/kg de Cas III-Ea fue menor (2/10; 20%), comparado con el grupo testigo negativo (7/10; 70%), mientras que en los otros dos grupos no hubo cambios en este parámetro.

**Cuadro 4.** Efectos de la Casiopeína III-Ea en la función reproductiva de ratones macho de la cepa CD-1 tratados intraperitonealmente por un periodo de 45 días.

Parámetros evaluados	Dosis aplicada				
	Testigo (-)	Testigo (+) CdCl <sub>2</sub> * 4 mg/kg	Cas III-Ea 0.40625 mg/kg (1/32 DL <sub>50</sub> )	Cas III-Ea 0.8125mg/kg (1/16 DL <sub>50</sub> )	Cas III-Ea 1.625 mg/kg (1/8 DL <sub>50</sub> )
Machos (n)	5	5	5	5	5
Hembras apareadas (n)	10	10	10	10	10
Hembras preñadas (n)	7	2	6	7	2
Fertilidad (%) <sup>a</sup>	70	20	60	70	20

\* Administrado durante 10 días, según dosis aplicada y peso corporal.

<sup>a</sup> (nº de hembras preñadas/ nº de hembras apareadas) \*100

### 6.1.2. Evaluación Espermática (Motilidad, Viabilidad y Morfología)

Los resultados de los diversos parámetros que se evaluaron para mostrar el efecto en los espermatozoides de ratones macho tratados con Cas III-Ea se exponen en el cuadro 5. Se puede observar que el porcentaje de motilidad en cada uno de los tratamientos disminuyó conforme transcurrió el periodo de tratamiento presentando una diferencia estadísticamente significativa, excepto para la dosis de  $1/32$  DL<sub>50</sub> a los 50 días.

Para la viabilidad se obtuvo una diferencia significativa con respecto al testigo negativo en los tratamientos de  $1/32$  DL<sub>50</sub> a los 45 días,  $1/16$  DL<sub>50</sub> a los 45y 50 días. En cuanto al porcentaje de espermatozoides anormales se observó que para la dosis de 0.40625 mg/kg y 0.8125mg/kg de Cas III-Ea hay un aumento con respecto al tiempo de tratamiento, no obstante después 50 días disminuyó el porcentaje. Para la dosis de  $1/8$  DL<sub>50</sub> de Cas III-Ea también presentó variaciones al final del tratamiento.

Los diversos tipos de anomalías morfológicas que presentaron los espermatozoides fueron registradas de acuerdo a los criterios descritos por Wyrobek y Bruce (1975, 1978) con algunas modificaciones, dichas malformaciones espermáticas se muestran en el cuadro 6 (se evaluaron más de 500 espermatozoides por ratón).

Las principales malformaciones que se presentaron fueron: cabeza de banana con un 36.36% para la dosis de  $1/16$  DL<sub>50</sub> de Cas III-Ea a los 50 días, enrollado en sí con un 51.95% para la dosis de  $1/8$  DL<sub>50</sub> de Cas III-Ea a los 45 días y sin cabeza con un 30.92% para la dosis  $1/32$  DL<sub>50</sub> de Cas III-Ea a los 30 días (Figura 4). En la mayoría de los casos mostró un efecto decreciente en el porcentaje de malformaciones espermáticas conforme transcurrió el periodo de tratamiento. Al comparar las tres dosis de Cas III-Ea con el testigo negativo, los porcentajes son superiores en espermatozoides enrollados en sí, con gancho inusual, y sin cabeza.

**Cuadro 5.** Efectos de la Casiopeina III-Ea en la función reproductiva del ratón macho de la cepa CD-1 tratado intraperitonealmente por un periodo de 45 días. ( $X \pm D.E.$ )

Tratamiento mg/kg	Parámetros Evaluados			
	Machos (n)	Motilidad Espermática (%)	Viabilidad Espermática (%)	Espermatozoides Anormales (%)
Testigo (-)	5	80 $\pm$ 13.17	88.1 $\pm$ 4.45	17.12 $\pm$ 2.11
Testigo (+) CdCl <sub>2</sub> * 4 mg/kg	5	11.4 $\pm$ 6.27	61.7 $\pm$ 7.98	62.60 $\pm$ 14.65
<b>Cas III-Ea 0.40625 mg/kg (1/32 DL<sub>50</sub>)</b>				
15 días	5	80.4 $\pm$ 15.61**	69.9 $\pm$ 10.24	20.68 $\pm$ 6.90
30 días	5	74 $\pm$ 5.70**	61.8 $\pm$ 4.89	23.16 $\pm$ 12.2**
45 días	5	57 $\pm$ 14.63**	74.9 $\pm$ 10.63**	25.24 $\pm$ 9.03
50 días	5	79.6 $\pm$ 9.89	90.8 $\pm$ 4.62	19.88 $\pm$ 1.35**
<b>Cas III-Ea 0.8125mg/kg (1/16 DL<sub>50</sub>)</b>				
15 días	5	83.2 $\pm$ 12.58**	67.1 $\pm$ 2.63	21.72 $\pm$ 3.74
30 días	5	86 $\pm$ 10.12**	62.25 $\pm$ 3.22	22.8 $\pm$ 5.37
45 días	5	44.4 $\pm$ 32.94**	73.3 $\pm$ 9.34**	34.27 $\pm$ 5.22
50 días	5	24.4 $\pm$ 19.59**	56.8 $\pm$ 5.25**	28.08 $\pm$ 8.20**
<b>Cas III-Ea 1.625 mg/kg (1/8 DL<sub>50</sub>)</b>				
15 días	5	84.6 $\pm$ 10.41**	67.8 $\pm$ 4.16	25.76 $\pm$ 12.37**
30 días	2	76 $\pm$ 9.90**	63.25 $\pm$ 0.35	26.64 $\pm$ 11.24**
45 días	3	36.67 $\pm$ 26.31**	70.33 $\pm$ 2.47	19.04 $\pm$ 3.67**
50 días	5	30.6 $\pm$ 34.82**	59.1 $\pm$ 3.56**	23.32 $\pm$ 5.43**

\* Administrado durante 10 días, según dosis aplicada y peso corporal.

\*\* P <0.05 vs. Testigo Negativo, con prueba "t" de Student.

X: Media. D.E: Desviación Estándar.

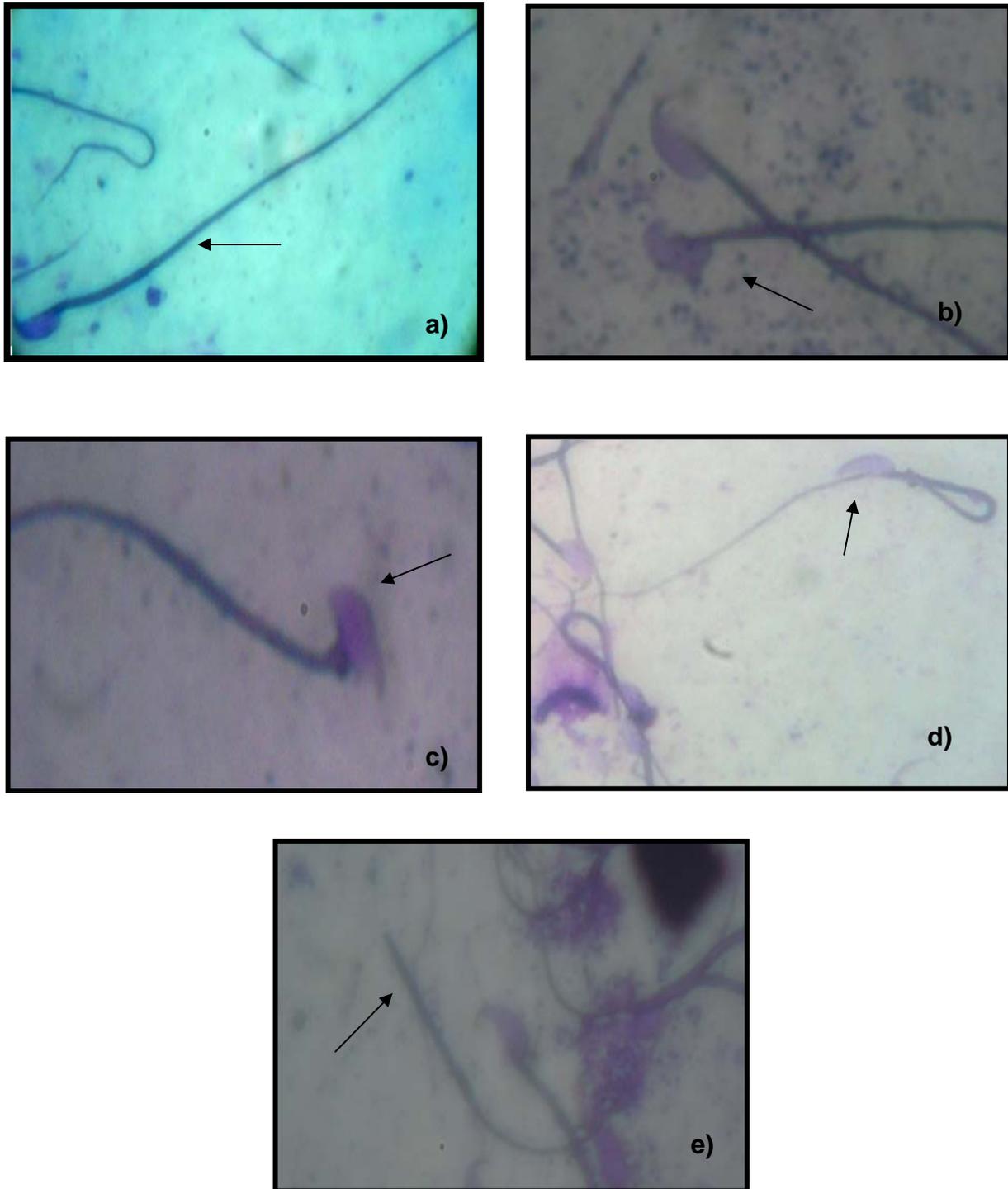
**Cuadro 6.** Porcentaje y tipo de anomalías espermáticas del ratón macho de la cepa CD-1 tratado intraperitonealmente con Casiopeina III-Ea, por un periodo de 45 días.

Tratamiento mg/kg	Tipo de Anormalidad (%)						
	Cabeza de banana	Doble flagelo	Enrollado sobre si	Gancho inusual	Sin cabeza	Amorfo	Otros <sup>a</sup>
Testigo (-)	27.80	-	29.91	1.40	21.96	18.22	0.70
Testigo (+) CdCl <sub>2</sub> * 4 mg/kg	33.29	0.13	41.09	0.06	13.35	8.75	3.32
<b>Cas III-Ea 0.40625mg/kg (1/32 DL<sub>50</sub>)</b>							
15 días	22.44	0.58	44.29	0.97	22.44	9.28	-
30 días	20.73	0.35	35.75	0.86	30.92	10.54	0.86
45 días	23.61	-	47.07	0.16	15.69	13.31	0.16
50 días	29.58	-	40.24	0.20	15.69	14.29	-
<b>Cas III-Ea 0.8125mg/kg (1/16 DL<sub>50</sub>)</b>							
15 días	17.32	2.11	41.87	2.56	23.34	9.79	-
30 días	23.12	1.50	34.23	1.50	26.28	10.96	2.40
45 días	27.73	-	40.76	0.42	19.54	11.34	0.21
50 días	36.36	-	20.07	-	21.44	20.93	1.20
<b>Cas III-Ea 1.625 mg/kg (1/8 DL<sub>50</sub>)</b>							
15 días	27.26	1.66	31.86	4.79	20.81	11.97	1.66
30 días	18.86	0.88	46.05	8.33	12.72	11.40	1.75
45 días	8.75	0.19	51.95	0.58	30.54	7.20	0.78
50 días	30.48	0.14	28.92	0.14	20.94	19.09	0.28

<sup>a</sup> Otras malformaciones: doble cabeza, macrocéfalos, microcéfalos.

\* Administrado durante 10 días, según dosis aplicada y peso corporal.

(-) No presento la anomalía.



**Figura 4.** Diversos tipos de anomalías morfológicas del espermatozoide de ratón, inducidas por la administración de Cas III-Ea. a) Espermatozoide normal, b) Cabeza de banana, c) Espermatozoide amorfo, d) Enrollado sobre si, e) Sin cabeza.



## 6.2. Efecto embriotóxico y teratógeno de la descendencia de ratones machos tratados con Casiopeína III-Ea.

### 6.2.1. Efecto Embriotóxico

**Cuadro 7.** Parámetros reproductivos en ratones hembra preñadas por ratones macho de la cepa CD-1 tratados intraperitonealmente con Casiopeína III-Ea, por un periodo de 45 días.

Observación	Testigo(-)	Testigo (+) CdCl <sub>2</sub> 4 mg/kg	Cas III-Ea 0.40625 mg/kg (1/32 DL <sub>50</sub> )	Cas III-Ea 0.8125mg/kg (1/16 DL <sub>50</sub> )	Cas III-Ea 1.625 mg/kg (1/8 DL <sub>50</sub> )
Total de hembras	10	10	10	10	10
Hembras Preñadas	7	2	6	7	2
No. de hembras con fetos vivos	7	2	6	7	2
No. de implantes totales	85	15	78	100	27
Implantes/ camada ( X ± D.E)	12.14 ± 3.24	7.5 ± 4.95	13 ± 4.15*	14.29±3.15*	13.5 ± 6.36*
Total de fetos vivos (♀♂)	82 (28/54)	15 (3/12)	75 (22/53)	83 (40/43)	26(8/18)
Total de fetos muertos	1**	-	-	1	-
Fetos vivos/camada (%)	98.8	100	100	98.8	100
No. de reabsorciones	3	-	3	16	1
Reabsorciones/camada	0.43±0.79	-	0.50±0.55*	2.29±2.14	0.50±0.71*
Reabsorciones tempranas/ camada	2	-	1	15	-
Reabsorciones tardías / camada	1	-	2	1	1
Parto adelantado	-	-	1	4	-
Peso/camada(g) ( X ± D.E)	28.84 ± 4.11	21.90 ± 7.64	32.08 ±5.99*	27.21±10.69*	33.40±2.69*

\* P < 0.05 vs. Testigo, con prueba "t" de Student.

\*\* Muertes por canibalismo.

X: Media. D. E: Desviación Estándar.

(-) No presente el efecto.



En el cuadro 7, se puede observar que solo 2 hembras se encontraban gestantes de las 10 que se aparearon con los machos tratados con 1.625 mg/kg de Cas III-Ea, cabe resaltar que este mismo efecto mostró el grupo del testigo positivo, mientras que los demás tratamientos no presentaron alguna diferencia con el grupo negativo. Por otra parte el número de implantes y peso por camada no se vieron afectados ya que no hay una diferencia significativa comparada con el testigo negativo, al igual que el número de reabsorciones por camada para las dosis de 1/32 y 1/8 de Cas III-Ea, excepto para la dosis de 1/16 de Cas III-Ea la cual presentó un incremento, donde las camadas con este factor representan más del 15%, así como el mayor número de partos adelantados.

### 6.2.2. Efecto Teratogénico

Las malformaciones externas fetales que presentó la descendencia de los machos tratados con Cas III-Ea, se presentan en el cuadro 8. En este caso, los embriones con anomalías se pusieron en un solo grupo, incluyendo aquellos que presentaron una malformación macroscópica y los que presentaban alguna otra anomalía física. Cabe mencionar que en un mismo embrión pudo presentar más de una malformación y a la vez alguna otra anomalía.

Dentro de las más frecuentes fueron los miembros rotados manifestando una diferencia estadísticamente significativa (Fig. 5). Para la dosis de 1.625 mg/kg mostró el mayor porcentaje de fetos con anomalías (65%), parpados abiertos (15%), y piel frágil (31%). Para los siguientes tratamientos se observó, que mientras disminuye la concentración del fármaco, algunas de las anomalías aumentaron, como por ejemplo las extremidades delanteras y traseras cortas, extremidades delanteras y traseras plegadas, siendo este tipo de degeneraciones las más comunes para la dosis de 1/16 DL<sub>50</sub>.



**Cuadro 8.** Malformaciones externas fetales descendientes de machos tratados durante 45 días con Casiopeína. (El porcentaje se muestra entre paréntesis)

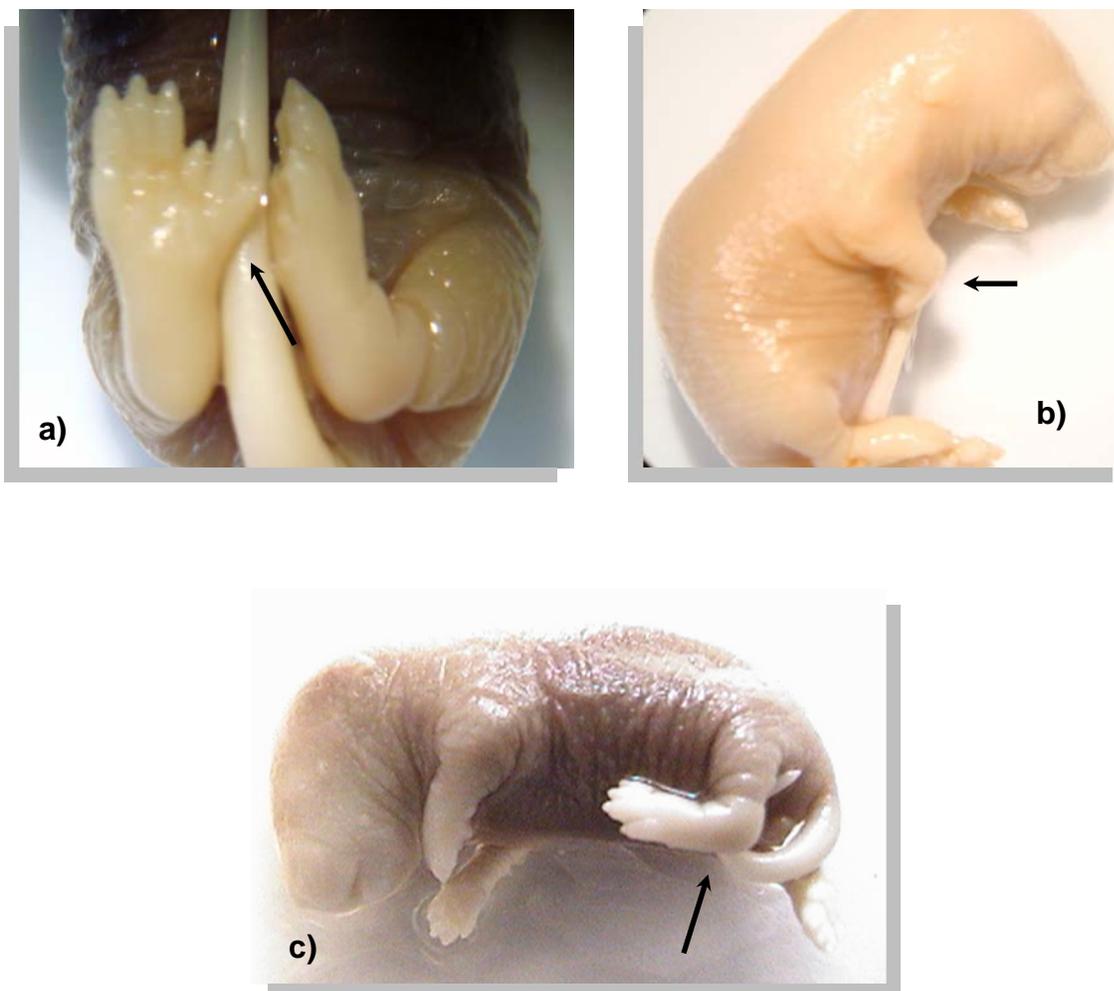
Observación	Testigo (-)	Testigo (+) CdCl <sub>2</sub> 4 mg/kg	Cas III-Ea 0.40625 mg/kg (1/32 DL <sub>50</sub> )	Cas III-Ea 0.8125mg/kg (1/16 DL <sub>50</sub> )	Cas III-Ea 1.625 mg/kg (1/8 DL <sub>50</sub> )
No. fetos con anomalías	18/82 (22)	8/15(53)	40/75 (53)	37/83 (45)	17/26 (65)
Párpados abiertos	3/82(4)	1/15(7)	3/75(2)*	4/83 (5)	4/26 (15)*
Amorfo	-	-	-	1/83 (1)	-
Cola en forma de gancho.	3/82(4)	2/15(13)	2/75 (2)*	4/83 (4)	-
Cráneo aplastado.	2/82(2)	-	-	-	-
Polidactilia	-	-	1/75(1)	-	-
Extremidades delanteras cortas.	-	-	2/75(3)	1/83 (1)	-
Extremidades traseras cortas.	-	-	3/75(4)*	3/83 (4)*	-
Extremidades delanteras plegadas.	-	-	-	1/83 (1)	-
Extremidades traseras plegadas.	-	-	-	1/83 (1)	-
Miembros rotados.	13/82(16)	6/15(40)	35/75 (47)*	29/83 (35)*	17/26 (65)*
Piel delgada y frágil.	-	-	-	5/83(6)*	8/26(31)*

\* P <0.05 vs. Testigo Negativo, con prueba "Z" de diferencia de proporciones.

(-) No presento el efecto.

En el cuadro 9 se observan las malformaciones esqueléticas examinadas de los fetos de hembras preñadas por machos tratados con Casiopeína III-Ea. La osificación tardía en la dosis de 0.40625 mg/kg afectó al 67% de los fetos examinados, en la dosis de 1.625 mg/kg hubo un 50% de fetos afectados siendo estadísticamente significativo. En el caso de falanges distales, proximales, metacarpos (extremidades delanteras) y falanges medias (extremidades traseras) no presentaron malformaciones significativas. La presencia de esternobras asimétricas, rudimentarias y grieta/doble apariencia; así como la presencia de cráneos aplastados también son las malformaciones esqueléticas más abundantes (Fig. 6).

En la figura 5 se observan algunos ejemplos de las alteraciones externas que fueron encontradas en los fetos descendientes de los machos tratados con Casiopeína III-Ea.



**Figura 5.** Malformaciones observadas en fetos obtenidos de hembras apareadas con machos tratados con Cas III-Ea. a) Feto con dos dedos demás en extremidad inferior (Polidactilia), b) Extremidad anterior corta y rotada, c) Cola en forma de gancho y miembro inferior rotado.

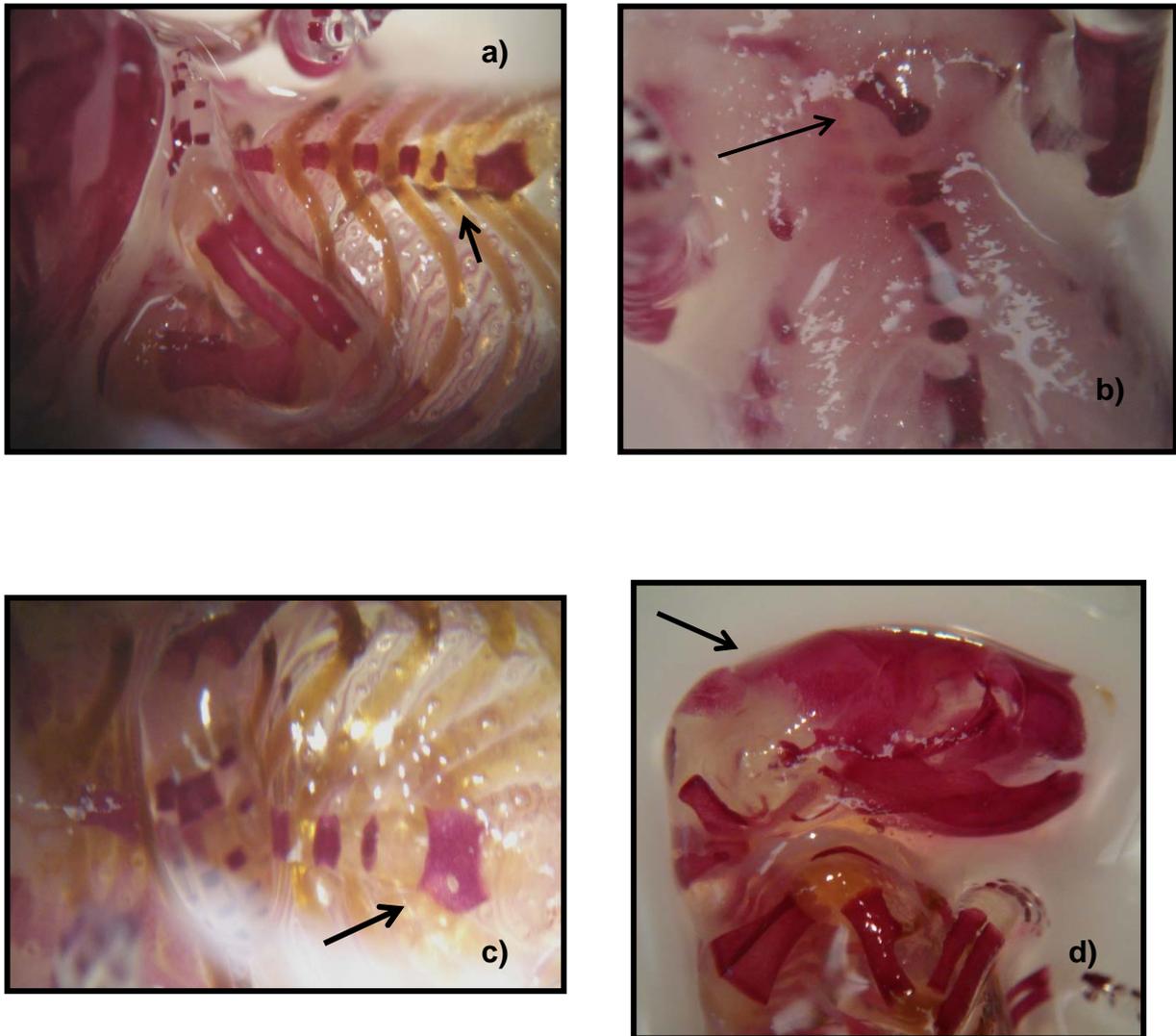


**Cuadro 9.** Malformaciones esqueléticas en fetos descendientes de ratones macho CD-1, tratados con Casiopeína III-Ea durante 45 días. (El porcentaje se muestra entre paréntesis)

Observación	Testigo (-)	Testigo (+) CdCl <sub>2</sub> 4 mg/kg	Cas III-Ea 0.40625 mg/kg (1/32 DL <sub>50</sub> )	Cas III-Ea 0.8125mg/kg (1/16 DL <sub>50</sub> )	Cas III-Ea 1.625 mg/kg (1/8 DL <sub>50</sub> )
No. de fetos examinados / camada	21/7	6/2	18/6	21/7	6/2
No. de fetos con osificación tardía	2/21(10)	3/6(50)	12/18(67)*	5/21(24)	3/6(50)*
<b>Extremidades delanteras</b>					
Falanges distales	-	-	-	-	-
Falanges medias	1/21(5)	-	-	-	-
Falanges proximales	1/21(5)	-	1/18(6)	-	-
Metacarpos	-	-	-	-	-
<b>Extremidades traseras</b>					
Falanges distales	-	-	-	-	-
Falanges medias	2/21(10)	-	-	-	-
Falanges proximales	1/21(5)	-	-	4/27(15)	-
Metacarpos	-	-	-	-	-
<b>Anormalidades Esqueléticas</b>					
No de fetos con anomalías (%)					
<b>Esternebras</b>					
Asimétricas	9/21(43)	5/6(84)	11/18(61)*	14/21(67)*	3/6(50)
Forma de pesa	1/21(5)	1/6(17)	2/18(11)	2/21(10)	3/6(50)*
Asimétrica / Forma de pesa	4/21(19)	1/6(17)	6/18(33)*	6/21(29)	1/6(17)
Desplazadas	-	-	5/18(28)*	2/21(10)	-
Rudimentarias	8/21(38)	1/6(17)	5/18(28)	11/21(52)*	6/6(100)*
Bifurcada	5/21(24)	3/6(50)	1/18(6)	4/21(19)	-
Grieta/ Doble apariencia	5/27(24)	1/6(17)	12/18(66)*	12/21(57)*	4/6(67)*
Ausencia	-	-	-	-	-
<b>Cráneo</b>					
Aplastado	5/21(24)	4/6(67)	12/18(66)*	9/21(43)*	3/6(50)*
<b>Vertebras</b>					
Ausentes	-	-	-	-	-
<b>Costillas</b>					
Corta	2/21(10)	2/6(33)	1/18(6)	2/21(10)	1/6(17)
Extra	-	-	-	-	-
Ausencia	-	-	2/18(11)	1/21(5)	-

\* P <0.05 vs. Testigo, con prueba "z" de diferencia de proporciones.

(-) No presento el efecto.



**Figura 6.** Malformaciones esqueléticas observadas en fetos obtenidos de hembras apareadas con machos tratados con Cas III-Ea. Se puede observar el esternón de los fetos en las figuras a, b y c. a) Quinta esternebra en forma de pesa, b) Primera esternebra desplazada y c) Sexta esternebra osificación tardía. d) Cráneo aplastado.



## 7. DISCUSIÓN

Varios estudios han reportado efectos tóxicos y carcinogénicos inducidos en humanos por la exposición a ciertos metales, esto es principalmente por metales de transición como el zinc, hierro, cobre, cobalto y manganeso los cuales son esenciales en los sistemas biológicos (Valko *et al.*, 2005), además de participar en el control de varios procesos metabólicos, regulación de oxígeno, estabilizadores de macromoléculas y en concentraciones altas algunos de ellos presentan propiedades genotóxicas (Rodríguez y Altamirano, 2006).

Debido a que la mayoría de los fármacos utilizados en la quimioterapia presentan en su estructura química un centro metálico, exhiben una alta toxicidad, pudiendo provocar lesiones graves, deterioro de la calidad de vida e incluso la muerte del organismo (DiSaia y Creaman, 2002).

Una gran variedad de compuestos antineoplásicos han sido estudiados en animales por sus efectos, incluyendo agentes alquilantes, antimetabólicos, antibióticos y otros tipos. Muchos de estos agentes antineoplásicos actúan específicamente en la síntesis de ADN, transcripción, en la formación del huso mitótico u otros procesos específicos del ciclo celular. En vista de su actividad en contra de las células que están en el proceso de división (Szabo, 1986), pueden desencadenar procesos como apoptosis o necrosis (Fajardo, 2007). A partir de aquí surge la necesidad de estudiar los efectos secundarios como consecuencia de la administración de dichos fármacos durante las diversas etapas de vida de un organismo, principalmente durante la etapa reproductiva.

Con la finalidad de conocer los efectos de la Casiopeína III-Ea se evaluó su capacidad para producir reprotoxicidad en ratones macho sexualmente maduros de la



cepa CD-1 tratados a diferentes dosis por un periodo de 45 días, periodo importante para el análisis de células gaméticas (espermatozoides).

Los resultados obtenidos muestran que la toxicidad inducida en los ratones macho por la administración intraperitoneal de Cas III-Ea durante 45 días, tiene un efecto dosis-respuesta; es decir el porcentaje de mortalidad de individuos aumenta conforme se incrementa la dosis, mientras que la ganancia de peso disminuye conforme aumenta la dosis, estos efectos concuerdan con lo descrito por Bocanegra (2006), en donde se trabajo con Cas III-ia en ratón macho CD-1. Además este mismo efecto se presenta en hembras gestantes tratadas con Cas III-Ea en dosis de 1/4, 1/8, 1/16 de la DL50 (Camargo *et al.*, 2009).

La función principal del sistema reproductivo masculino es la producción de espermatozoides capaces de fertilizar un óvulo y producir descendencia sana (Altamirano *et al.*, 1996). Defectos funcionales y físicos en el sistema reproductivo en el macho o en la hembra tales como; errores en la diferenciación de las células germinales antes de la fecundación, donde disminuye la calidad y cantidad de gametos, logran producir defectos después de la fecundación (Wyrobek *et al.*, 1997).

Para llevar a cabo las funciones reproductivas normales en el macho, se requiere de una comunicación entre el sistema nervioso central y el hipotálamo u órganos receptores bajo su buen funcionamiento de todas las hormonas que participan (Jüppner, 2000). Sustancias tóxicas pueden simular compuestos endógenos (como las hormonas) actuando como agonistas o antagonistas, de esta manera pueden ser citotóxicas o activa a los compuestos tóxicos. Algunas sustancias toxicas pueden tener efectos indirectos mediante la inhibición de las enzimas clave (Branch, 2004).



En cuanto al porcentaje de fertilidad (Cuadro 4), evaluado en ratones macho tratados con Cas III-Ea se encontró una disminución, debido a que el número de hembras preñadas disminuyó conforme aumento la dosis, ya que para la dosis de 1.625 mg/kg (1/8 DL<sub>50</sub>) solo se obtuvo un 20% de hembras preñadas, algunas investigaciones revelan que al existir un daño en el espermatozoide es factible que haya una reducción en la fertilización del huevo o en la implantación o en el desarrollo después de la implantación (Bateman, 1984; Klemmt y Scialli, 2005).

Se ha examinado la relación entre el daño en el ADN del espermatozoide humano y la incapacidad de fertilización, detectándose la dificultad para concebir en varones que presentaban lesiones en el ADN mayor al 30%, y cuando el grado de la lesión en el ADN sobrepasa el 40%, la probabilidad de conseguir un embarazo es mínima (Agarwal y Allamaneni, 2005).

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron, sin embargo, que el número de implantaciones no presentaba una diferencia significativa con respecto al testigo negativo, esto tal vez se deba a que en el ratón basta con una pequeña cantidad de espermatozoides en buenas condiciones para que se pueda llevar a cabo la fertilización de manera óptima (Francis *et al.*, 1990).

Por otro lado, se encontró un incremento en el número de reabsorciones en la dosis de 1/16 DL<sub>50</sub> de Cas III-Ea. En otro estudio donde se trabajó con hembras gestantes con esta misma casiopeína mostró, que el porcentaje de reabsorciones fue superior al 60% en las camadas obtenidas en dosis de 0.81251 mg/kg (1/16 DL<sub>50</sub>) y 3.25mg/kg (1/4 DL<sub>50</sub>) (Camargo *et al.*, 2009), este efecto pueden ser probablemente el resultado de algún daño o mutación letal en el ADN de las células germinales durante la etapa de



gametogénesis del espermatozoide, tales cambios en el material genético del espermatozoide pueden ser letales, afectando la supervivencia o el desarrollo de los embriones, y provocar la muerte prematura de los descendientes en una etapa temprana o descenso en el peso (García, 1998; Álvarez, 2002; Agarwal y Allamaneni, 2005; Campell y Rees, 2007). Lo cual podría indicar que la casiopeína de manera indirecta induce genotoxicidad en las células germinales masculinas, ya que Sermet *et al.* (2006) encontró que la Cas III-ia en dosis de 6.17 y 3.085 mg/kg resultó ser genotóxica *in vivo*, mientras que la casiopeína III-Ea también ha mostrado una alta genotoxicidad en células HeLa (Alemón *et al.*, 2007).

Se encontró que la viabilidad espermática inducida por la Cas III-Ea mostró una diferencia estadísticamente significativa en la mayoría de los tratamientos. Dicho efecto puede atribuirse a la dosis y a que los espermatozoides tienen niveles despreciables de antioxidantes, debido probablemente a su poco contenido de citoplasma, haciéndolos incapaces de reparar el daño inducido por las EROS, perdiendo los sistemas enzimáticos citoplasmáticos que se requieren para cumplir con esta reparación (Gil *et al.*, 2007).

Por esta razón, los radicales libres y los ERO han sido asociados con el estrés oxidante y se han involucrado en numerosas funciones en el momento de la reproducción. Algunos autores definen al estrés oxidante como un desequilibrio bioquímico ocasionado por la producción excesiva de radicales libres, los cuales exceden la capacidad antioxidante de un organismo o por una disminución en la respuesta homeostática de las células o tejidos, provocando daño oxidativo a las biomoléculas (Jeulin *et al.*, 1989; Agarwal y Allamaneni, 2005; Córdova *et al.*, 2009).

Los tejidos que conforman al testículo y principalmente los espermatozoides producen y exportan especies reactivas de oxígeno (ERO) al medio extracelular, de las



cuales la mayoría son producidos por las mitocondrias, por el alto contenido de lípidos como los ácidos grasos poliinsaturados en sus membranas plasmáticas y su pequeño volumen del citoplasma (Córdova *et al.*, 2009). Situación que hace a sus membranas susceptibles al daño peroxidativo por especies reactivas, tales como peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), el anión superóxido ( $-O_2^-$ ) y el radical hidroxilo ( $-OH$ ).

La membrana espermática es muy sensible a los efectos del oxígeno y a los radicales libres, por lo que cuenta con enzimas como la glutatión peroxidasa/reductasa y la catalasa, cuya función es destruir los ERO para mantener el equilibrio en las células al existir cualquier variable en los agentes antiperoxidantes protectores que se encuentran en el espermatozoide y su ambiente (Jeulin *et al.*, 1989; Córdova *et al.*, 2009; Selvakumar *et al.*, 2006), o bien una constitución diferente en la membrana. Los EROS también producen una peroxidación de ácidos grasos, lo cual origina una permeabilización de la membrana plasmática y acrosomal; en pocas palabras, produce verdaderos agujeros en la membrana espermática conduciendo a una pérdida de la viabilidad, motilidad y capacidad fecundante del espermatozoide (Gil *et al.*, 2007; Shen y Choon, 2000).

Castañeda *et al.* (2004) encontró que la viabilidad espermática se reduce cuando se administra intraperitonealmente Cas II-gly en dosis de 1.1 y 2.2 mg/kg (1/4 y 1/8 de la  $DL_{50}$ ). Otros estudios realizados con Cas III-Ea donde se evaluó el efecto citotóxico mediante la exposición de linfocitos y células HeLa a diferentes concentraciones, tanto en su forma oxidada como reducida en presencia de Ácido Ascórbico (ASC), mostraron que la fracción de supervivencia celular fue menos del 10% después de ser reducido el cobre por ASC (Alemón-Medina *et al.*, 2007).

Lo cual muestra que este compuesto produce un daño por radicales libres, producto de las reacciones óxido-reducción de tipo Fenton y Haber- Weiss en que puede



participar el cobre (Alemón-Medina *et al.*, 2006; Córdova *et al.*, 2009). El daño producido por las especies reactivas de oxígeno (ERO) pueden llegar a modificar el potencial de membrana con cambios subsecuentes en la permeabilidad y por lo tanto, liberación de factores apoptogénicos provocando la muerte celular (De Vizcaya-Ruiz *et al.*, 2000). Lo que nos indicaría que la Cas III-Ea está afectando la viabilidad espermática debido a la liberación excesiva de radicales libre ocasionando toxicidad celular.

Para que un espermatozoide sea capaz de fecundar a un ovocito ha de unir una serie de requisitos, entre ellos tener motilidad progresiva. Dicho parámetro ha sido y seguirá siendo el más utilizado para evaluar la calidad del espermatozoide. Así mismo, la motilidad es una manifestación de viabilidad espermática y de integridad celular (Muiño, 2008), esta función espermática involucra una serie de procesos químicos, electroquímicos y mecánicos que pueden en algún momento ser influenciados por el ambiente en que se desarrollan.

Los espermatozoides adquieren la capacidad de motilidad a su paso durante la etapa de maduración por el epidídimo después de haber sido liberados hacia los túbulos seminíferos donde son inmóviles y sin capacidad para fecundar, en que por medio de contracciones se expulsan hacia los túbulos rectos y a la red testicular, por una corriente de líquido testicular, hasta llegar al conducto epididimario (Comhaire, 1993; Aragón, 1998; Muiño, 2008; Patton y Thibodeau, 2008). Se sabe que algunas sustancias tóxicas pueden penetrar la barrera epididimal ocasionando una modificación en la concentración de sustancias que se encuentran en sus fluidos (sodio, cloro, potasio, proteínas, etc.), de esta forma se altera la función del epidídimo y produce un medio inadecuado para que se lleve a cabo la maduración y el desarrollo de la capacidad de motilidad del espermatozoide, teniendo como consecuencia una disminución en su motilidad y fertilidad (Corona, 2000; Guyton, 2006; Wein *et al.*, 2008).



Las mitocondrias representan la central energética del espermatozoide, y suministran energía en forma de adenosin trifosfato (ATP), el cual es producido en la pieza media del espermatozoide, los brazos de dineína, que realmente son moléculas ATPasa, degradan el ATP, liberando la energía que a su vez inducen el movimiento deslizante entre los dobletes microtubulares del flagelo, provocando que se formen una secuencia de deslizamientos en forma de onda, experimentando un movimiento rotacional y característico, de esta manera se logra el movimiento del flagelo (Comhaire, 1993; Gilbert, 2003; Muiño, 2008; Patton y Thibodeau, 2008).

Las Casiopeínas® tienen otro mecanismo de acción el cual afecta la función mitocondrial. Estudios realizados en mitocondrias aisladas han mostrado que inducen daño en la respiración mitocondrial en dos formas: inhibiendo enzimas y abriendo los canales de K<sup>+</sup>, lo que induce un colapso del potencial de membrana y logrando inhibir la fosforilación oxidativa, de este modo afectan la síntesis de ATP (Hernández-Esquivel *et al.*, 2006; García, 2007), por lo que la disminución observada en el porcentaje de motilidad espermática al administrar 0.40625 mg/kg (1/32 DL<sub>50</sub>), 0.8125mg/kg (1/16 DL<sub>50</sub>) y 1.625 mg/kg (1/8 DL<sub>50</sub>) de Cas III-Ea a ratones macho, también puede ser explicada por un desorden en la función mitocondrial del espermatozoide inducido por las especies reactivas que generan las Casiopeínas®, lo cual puede ocasionar que los sistemas enzimáticos captadores de especies reactivas de oxígeno disminuyan (Alemón-Medina *et al.*, 2006) dañando a la membrana y que sea menor la destrucción de ERO, perturbando también la producción de ATP y por ende la movilidad espermática (Gagnon *et al.*, 1991; Selvakumar *et al.*, 2006; Córdova *et al.*, 2009).



Esto concuerda con otros resultados expuestos por Bocanegra (2005), donde se presenta una disminución en la motilidad al tratar machos con Cas III-ia por 60 días. Otros compuestos metálicos como el tetraóxido y pentaóxido de vanadio ( $V_2O_4$ ,  $V_2O_5$ ) al ser generadores de especies reactivas de oxígeno producen este mismo resultado (Altamirano-Lozano *et al.*, 1996; Aragón, 1998).

Para una interacción normal del espermatozoide con el microambiente del tracto genital femenino y con las envolturas del ovocito, además de tener motilidad progresiva, los espermatozoides han de ser morfológicamente normales. Cualquier anomalía que afecte algún atributo del espermatozoide puede dificultar su migración a través del tracto genital de la hembra, impidiendo la unión con el ovocito. A medida que aumenta la proporción de espermatozoides anormales, desciende la capacidad de fecundar (Muiño, 2008).

Varios compuestos químicos como antibióticos y otros fármacos han mostrado que sus niveles de concentración son iguales en sangre que en el semen de los individuos expuestos a ellos, provocando alteraciones en las células germinales ya sea por la absorción o el enlace químico que tienen estas sustancias (Klemmt y Scialli, 2005), alterando los procesos de proliferación, división y diferenciación, aumentando el porcentaje de anomalías en estructura y función de los espermatozoides (Wyrobek, 1975; Branch, 2004; Domínguez *et al.*, 2009).

En animales utilizados en el laboratorio, se ha observado que los niveles basales de malformaciones espermáticas, pueden variar ampliamente dependiendo de la especie, en ratones específicamente para la cepa CD-1, se tiene valores basales de 6.40 a 7.08 % (Wyrobeck, 1983; Wyrobeck *et al.*, 1984).



Como se observa en los resultados el porcentaje de alteraciones morfológicas en los espermatozoides, que causó la administración de Cas III-Ea a machos de la cepa CD-1 durante los 45 días de tratamiento, resultó ser superior al citado anteriormente y estadísticamente significativo con respecto al testigo negativo, dentro de las más frecuentes que se hallaron fue enrollado en sí y cabeza de banana.

La etapa, en la que los espermatozoides son más susceptibles por la exposición crónica a un compuesto químico o mutágeno ambiental es: la postmeiótica (cuando las células se encuentran en etapa de espermatocitos y espermátidas), ya que cambios o alteraciones durante esta etapa pueden llegar a producir espermias maduros con algún daño genético como, por ejemplo: 1) empaquetamiento anormal de la cromatina, 2) inducción de apoptosis (tras la salida del espermatozoide a los túbulos seminíferos), 3) generación de radicales libres de oxígeno, 4) inducción de aberraciones cromosómicas hereditarias. Este tipo de daño persiste en el espermatozoide, por lo que las alteraciones morfológicas del espermatozoide observadas son el producto de la acumulación de alteraciones genéticas en los espermatozoides (Marchetti *et al.*, 1997; Shen y Choon, 2000; Agarwal y Allamaneni, 2005; Olsen *et al.*, 2005; Selvakumar *et al.*, 2006; Morales *et al.*, 2007; Marchetti y Wyrobeck, 2008).

Sun y Martin (2006) reportaron que la incidencia de aberraciones cromosómicas, aumenta significativamente con el porcentaje de espermatozoides morfológicamente anormales, además sugiere que la teratozoospermia (como la motilidad anormal y baja concentración de espermias) es un marcador de la espermatogénesis anormal, por lo que existe una relación entre la morfología del espermatozoide y anormalidades genéticas.



Olsen *et al.* (2005), indico que el estrés oxidativo también puede desempeñar un papel crítico en la inducción de anomalías en los espermatozoides, ya que no sólo ataca a la membrana, debido a la vulnerabilidad de los gametos, sino que también son más susceptibles al daño del ADN (desnaturalización y fragmentación) durante la espermatogénesis o en la maduración epididimaria, bajo estas circunstancias los espermatozoides que se liberan en la espermiación, son inmaduros y generadores de una producción excesiva de ERO, produciendo de este modo una inhibición en el metabolismo oxidativo, glucólisis, y aunado a una inactivación enzimática pudiendo generar efectos negativos, alterando la integridad genómica del ADN de los espermatozoides (Shen y Choon, 2000; Agarwal y Allamaneni, 2005; Selvakumar *et al.*, 2006; Gil *et al.*, 2007; Córdova *et al.*, 2009).

En estudios anteriores realizados con Cas III-Ea se ha encontrado que presenta una interacción con el ADN al inducir fragmentación del mismo en células HeLa (Serment-Guerrero *et al.*, 2006), en linfocitos humanos (Alemón-Medina *et al.*, 2007) y en células sanguíneas de ratón (Camargo *et al.*, 2009) usando la técnica de electroforesis unicelular (“ensayo cometa”). Otras Casiopeínas® pertenecientes a esta familia como la Cas III-ia también inducen daño al ADN de células de testículo, corazón, riñón, bazo, hígado de ratón macho CD-1 (Cermeño, 2007).

En algunas ocasiones la presencia de espermias anormales indica que el proceso de espermatogénesis fue afectado por alteraciones en el ADN testicular (Altamirano-Lozano *et al.*, 1996; Odeigah, 1997; Aragón, 1998; Selvakumar *et al.*, 2006), lo que indicaría que los efectos de la Casiopeína III-Ea interfieren con la integridad propia del ADN o con la expresión del genoma, y que las anomalías espermáticas sean consecuencia de mutaciones génicas.



Se sabe que algunos agentes químicos cuando producen un daño genético en las células germinales tanto maternas como paternas, este puede ser transmitido a la siguiente generación y la descendencia portadora de este daño puede llegar a manifestar alguna malformación (Álvarez, 2002).

El ADN del espermatozoide aporta la mitad del material genético a la descendencia y es necesario para la fecundación, el desarrollo del embrión y para el correcto desarrollo fetal y postnatal (Pérez, 2009), de aquí la importancia que tienen la integridad estructural y funcional no sólo del ovocito sino también del espermatozoide (Álvarez, 2007).

Por lo cual, la estructura nuclear espermática protege la integridad genómica del espermatozoide, durante el transporte del genoma paterno a través del tracto reproductor masculino y femenino; evitando que el genoma espermático sea dañado por condiciones estresantes como la oxidación. Así como también es necesario, un correcto empaquetamiento de la cromatina espermática para la reprogramación del genoma paterno y una apropiada organización de los genes que serán expresados en los primeros estadios del desarrollo embrionario. El efecto biológico del daño nuclear de los espermatozoides depende del grado de daño presente y de la capacidad del ovocito de repararlo. La fecundación de ovocitos en metafase II con espermatozoides con alteraciones del ADN (modificaciones en los nucleótidos y/o fragmentación en las cadenas del ADN) pueden conducir a modificaciones en el desarrollo del embrión, fallos en la implantación, o a un aumento en la tasa de abortos (Álvarez, 2007; Gil *et al.*, 2007; Pérez, 2009).



Algunos de los tratamientos de Cas III-Ea, no solo afecto las funciones reproductivas del macho, si no también causo malformaciones morfológicas en su descendencia tales como; parpados abiertos y miembros rotados, lo cual se debe probablemente a que este antineoplásico este dañando alguna de las estructuras funcionales del espermatozoide que intervienen en el desarrollo del embrión o bien sea alguna de mutación genética como consecuencia de la fertilización por espermatozoides afectados por la exposición a la casiopeína durante la espermatogénesis , ya que en estudios anteriores con esta misma casiopeína, se reporta una disminución en el índice mitótico, e inducción de aberraciones cromosómicas en células de medula ósea de ratón macho en dosis de 3.38 mg/kg (  $\frac{1}{4}$  de su  $DL_{50}$ ) (Beltrán y Trinidad, 2009) y Bocanegra (2005) encontró que la Cas III-ia induce mutaciones dominantes al observar un incremento en la frecuencia de reabsorciones tempranas y tardías en dosis de 1.75 mg/kg. Por otro lado Álvarez (2002), reporta que al administrar Ciclofosfamida a ratones macho de la cepa CD-1, durante 60 días, los embriones obtenidos después de la cruce con hembras sin tratamiento presentaron un incremento en la proporción de embriones de menor tamaño, lo que ha sido reportado como consecuencia de mutaciones puntuales y trisomias.

Las aberraciones cromosómicas pueden producirse en la línea germinal de cualquiera de los progenitores por un error de la meiosis o la fecundación, o surgir en las primeras etapas del embrión por errores de la mitosis, las consecuencias de la presencia de células con aberraciones cromosómicas en los embriones en desarrollo no se conoce aun, sin embargo, algunos autores postulan que estas pueden inducir malformaciones embrionarias, defectos en el nacimiento o producir cáncer postnatal y las más graves inducen mutaciones letales que provocan la interrupción precoz del desarrollo (Álvarez, 2002; Larsen y Larsen, 2003).



En las mutaciones letales dominantes el daño es inducido en el material genético en el desarrollo de las células germinales de los machos, no afecta su habilidad al fecundar (Shelby *et al.*, 1993), pero se sabe que algunos efectos mutagénicos están acompañados por un retardo en el ciclo celular y que pueden manifestarse como pérdida de una de las primeras divisiones celulares o muerte, cuando un gran número de estas células mutantes son incapaces de sobrevivir (Álvarez, 2002; Callen, 2009; [Langman](#) y [Sadler](#), 2009), pueden originar una anormalidad morfológica, ya que disturbios durante el ciclo celular como; la citotoxicidad y genotoxicidad de un compuesto reducen el número de células, muchas de ellas necesarias para llevar a cabo un desarrollo morfológico a buen término (Szabo, 1998).

El desarrollo normal de los embriones de los mamíferos es un proceso biológico complejo, en donde a pesar de la delicada sincronización, de los numerosos eventos, pueden ocurrir algunos errores en las diferentes etapas de este proceso (Altamirano, 2006).

Estas alteraciones pueden ser los defectos congénitos; los cuales se deben a la interacción entre la dotación genética del embrión y el entorno en el que se desarrolla. La información básica para el desarrollo esta codificada en genes, pero el genotipo está sujeto a influencias ambientales que pueden participar en el fenotipo observado, en algunos casos la información genética se expresa con independencia del entorno, por lo que ciertas estructuras son especialmente susceptibles a una gran variedad de lesiones, independientemente del tiempo o tipo de exposición a cualquier mutágeno (Polifka *et al.*, 1996; Callen, 2009).



Algunos agentes teratógenicos pueden actuar a diferentes niveles como; alteración en la integridad de los ácidos nucleicos, inhibición enzimática, la proliferación, evaginación, emigración, reabsorción y crecimiento, junto a otros que no son más que movimientos morfogénéticos, en algunos casos se manifiestan como malformaciones macroscópicas en el momento del nacimiento, mientras que en otros casos desde el punto de vista morfológico son microscópicas y conllevan a deficiencias funcionales que se manifiestan con posteridad (Palomero *et al.*, 1998; Altamirano, 2006; Callen, 2009).

En cuanto al análisis de las malformaciones esqueléticas de la descendencia de los machos tratados con Cas III-Ea (Cuadro 8), se encontró que la osificación tardía afectó a más del 50 % descendencia de los machos tratados con 0.40625 y 1.625 mg/kg, dichas dosis también presentaron el mayor porcentaje de malformaciones craneales, costillas cortas y ausencia de las mismas. El tipo de alteraciones observadas en las esterneras principalmente fueron; rudimentarias, asimétricas, grieta/ doble apariencia, lo cual puede atribuirse a varios factores uno de ellos es que los espermatozoides de los machos tratados con estas dosis sufrieron algún daño, de esta manera los espermatozoides que lograron fecundar originaron embriones con malformaciones esqueléticas.

El esqueleto es un sistema que se forma a partir de células capaces de producir condromucoproteínas. A nivel del tronco y extremidades estas surgen de la parte medial del somita o esclerotomo, mientras que a nivel cefálico participa el paracordal o los somitas occipitales y material de la parte profunda de los arcos branquiales, por lo que es una formación con importante capacidad prospectiva, de ahí que las alteraciones de su desarrollo sean muy diversificadas y afecten al componente musculo-esquelético (Palomero *et al.*, 1998; Larsen y Larsen, 2003; [Langman](#) y [Sadler](#), 2009).



Desde el punto de vista somático se pueden considerar malformaciones del esqueleto axial, craneal y de las extremidades; estas se atribuyen principalmente a factores genéticos (alteraciones genéticas o mutaciones espontaneas) y ambientales (exposición a xenobióticos) durante el periodo de postimplantación, además de considerar algunas malformaciones esqueléticas generalizadas, las cuales se presentan por alteración del proceso de osificación o a por alteraciones del propio organismo (Polifka *et al.*, 1996; Palomero *et al.*, 1998; Tyl *et al.*, 2007). La osificación retardada o tardía es un término general que se refiere a una disminución en la cantidad de hueso mineralizado en comparación con lo esperado para una determinada edad y es quizás el hallazgo más común en estudios de toxicología del desarrollo (Carney y Kimmel, 2007).

La formación embrionaria y el desarrollo en los mamíferos se encuentran regidos también por una serie de señales entre las células epiteliales superficiales y las células subyacentes mesenquimales que dirigen la formación de apéndices y otras estructuras. Las moléculas de señalización actúan como determinantes en el desarrollo de estas estructuras, entre estas moléculas se incluyen proteínas morfogenéticas óseas, factores de transcripción y proteínas, las mutaciones en estas moléculas han sido vinculadas a determinadas displasias esqueléticas y defectos de las extremidades (Larsen y Larsen, 2003; Tyl *et al.*, 2007; [Langman](#) y [Sadler](#), 2009).

Otro factor posible por el cual se pueden generar malformaciones en los embriones posiblemente sea por las especies reactivas de oxígeno, ya que los espermatozoides defectuosos son una fuente generadora de EROS, dando lugar a una serie de patologías durante el desarrollo (Kovacic y Somanathan, 2006) es decir, provocan en los embriones un cambio en el metabolismo, de esta forma sus niveles de actividad enzimática antioxidante son bajos, induciendo alteraciones en el entorno, causando una



disminución o el cese de la proliferación celular (Hansen, 2006), llegando a promover la apoptosis; y una inmadurez en las defensas antioxidantes naturales de la célula (probablemente el glutatión reducido (GSH)) (Alemón-Medina *et al.*, 2006) durante la organogénesis, de esta manera produciendo malformaciones a cualquier nivel ya sea morfológico o esquelético, lo que nos indicaría que de cierta forma, que el tratamiento con Casiopeína® produjo daño de manera indirecta.



## 8. CONCLUSIONES

- I. La Casiopeína III-Ea mostró tener un efecto tóxico en los ratones machos tratados con 1/16 y 1/8 de la  $DL_{50}$ , ya que indujo pérdida del peso corporal y mortalidad; lo cual puede deberse al balance entre la cantidad del compuesto presente y la capacidad de cada organismo para reparar el daño.
- II. La disminución de la fertilidad de los machos tratados con Casiopeína III-Ea, confirman el efecto reprotóxico que puede inducir en las células germinales masculinas.
- III. La Casiopeína III-Ea produce citotoxicidad en las células gaméticas de los machos, al reducir la viabilidad espermática.
- IV. En cuanto a las funciones reproductivas del macho tratado fueron afectadas, ya que indujo una disminución en la motilidad espermática, tal vez por un daño a la membrana y/o en las mitocondrias del espermatozoide, siendo ambas estructuras elementales para el movimiento flagelar.
- V. Indujo alteraciones morfológicas en los espermatozoides, probablemente por una variación en el ADN espermático o en su expresión genómica (mutaciones), alterando el proceso de espermatogénesis. Mostrando que la Casiopeína III-Ea es capaz de interactuar con las células germinales y afectarlas directamente.
- VI. Al inducir malformaciones morfológicas y esqueléticas en la descendencia de los machos tratados, refleja una susceptibilidad al antineoplásico, al fecundar con espermias afectados, propiciando una posible deficiencia metabólica y en la proliferación celular de los embriones, impidiendo su desarrollo normal, por lo cual nos permite concluir que la Casiopeína III-Ea, también es un agente teratogénico aunque actúa de cierto modo indirectamente.



## 9. REFERENCIAS

- ♣ Agarwal, L. A. y Allamaneni, S. S. R. (2005). Alteraciones de la cromatina espermática en la etiopatogenia de la infertilidad masculina. *Rev. Int. Androl.* 3(1):31-37.
- ♣ Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (2004). Resumen de Salud Pública: Cobre. 50(8):1-8.
- ♣ Alberts, B., Denisse, B. y Lewis, J. (1999). Introducción a la biología celular. Control del ciclo celular y muerte. Ed. Omega, España. pp. 54,288.
- ♣ Alemón- Medina, R., Breña-Valle, M., Muñoz-Sánchez, J., García-Mora, M. y Ruiz-Azuara, L. (2007). Induction of oxidative damage by copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas®). *Cancer Chemother. Pharmacol.* 60:219–228.
- ♣ Alemón-Medina, R., Muñoz-Sánchez, J., Ruiz-Azuara, L. y Mendiola-Cruz, M.T. (2006). Determinación de la actividad oxidativa de las Casiopeínas®: Cas II-gly, Cas III-ia y Cas III-Ea en células HeLa. En: *2do Congreso Nacional de Química Médica*. Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. Facultad de Química, UNAM. México.
- ♣ Altamirano, B. A. (1994). Manual de manejo de animales de laboratorio. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México.
- ♣ Altamirano, L. M. (2006). Alteraciones reproductivas y del desarrollo inducidas por metales: el vanadio como ejemplo. En: *Tópicos de Genética*. Ed. Sociedad Mexicana de Genética. México. pp. 237-256.
- ♣ Altamirano-Lozano, M., Álvarez-Barrera, L., Basurto-Alcantara, F., Valverde, M. y Rojas, E. (1996). Reprotoxic and genotoxic studies of vanadium pentoxide in male mice. *Teratog. Carcinog. Mutag.* 16:7-17.
- ♣ Altamirano-Lozano, M., Roldán-Reyes, E., Bonilla, E. y Betancourt, M. (1997). Effect of some metal compounds on sperm motility *in vitro*. *Med. Sci. Res.* 25:147-150.



- ♣ Álvarez, B. L. (2002). Estudio en relación entre los efectos genotóxico y teratogénicos de la ciclofosfamida *in vivo*. Tesis de Doctorado. Facultad de estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México.
- ♣ Álvarez, G. J. (2007). Aplicaciones clínicas del estudio de fragmentación del ADN espermático. *Rev. Int. Androl.* 5(4):354-363.
- ♣ Álvarez, R. J. y Medellín, R. A. (2005). *Mus musculus*. Vertebrados superiores exóticos en México: diversidad, distribución y efectos potenciales. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto U020. Instituto de Ecología. UNAM. México. pp. 1-7.
- ♣ 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*. New York, U.S.A. pp. 165-294.
- ♣ Aragón, M. A. (1998). Reprotoxicidad inducida por tetraóxido de vanadio en el ratón macho CD-1. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México.
- ♣ Aragón, M. A. (2003). Toxicidad reproductiva del vanadio (IV) en el ratón macho. Tesis de Doctorado. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México.
- ♣ Araya, M., Olivares, M. y Pizarro, F. (2005). Efectos del cobre en el ser humano. En: Torres P. J. C. (Eds.). *Cobre, Medio Ambiente y Salud, aportes a la ciencia*. Ed. Instituto de Innovación en Minería Y Metalurgia. México. pp. 66-78.
- ♣ Bateman, A. F. (1984). The dominant lethal assay in the male mouse. En: Kilbey, B. J., Nichols, W. y Ramel, C. (Eds.). *Handbook of mutagenicity test procedures*. 2ª ed. Ed. Elsevier Science. New York, U.S.A. pp. 37-38.
- ♣ Beltrán, M. R. y Trinidad, F. M. A. (2009). Evaluación del índice mitótico (IM) y la frecuencia de aberraciones cromosómicas (AC) en células de la medula ósea de ratón CD-1 tratadas con Casiopeína III- Ea (Cas III-Ea). Informe de laboratorio Integral de Biología VI. Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN). Facultad de estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México.



- ▲ Bernardi, S., Brogliatti, G. y Oyarzabal, M. I. (1999). Diferencias de fertilidad en ratones seleccionados por peso. Trabajo de Investigación. *Analecta Veterinaria*. 19:11-17.
- ▲ Bocanegra, A. D. (2005). Toxicología reproductiva inducida por la Cas III-ia en ratones macho de la cepa CD-1. Tesis Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México.
- ▲ Bocanegra-Astivia, D. y Altamirano-Lozano, M. (2006). Efecto teratogénico causado por la Casiopeína III-ia en embriones y fetos de ratón cepa CD-1. En: *2do Congreso Nacional de Química Médica*. Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN) .Facultad de estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México. pp. 28-31
- ▲ Bonilla, E., Altamirano, L. M., Casas, E., Fierro, R., Ducolomb, Y. y Betancourt, M. (2001). Identificación de reprotóxicos en el laboratorio. En: Velázquez, J. (Ed.). *Biología de la Reproducción II*. PUIS-UNAM, UAM. México. pp. 55-73.
- ▲ Bonilla, E., Amador, A. y Betancourt, M. (1994). *In vitro* capacitación of pig spermatozoa in a protein-free medium supplemented with histidine and cysteine. *Med. Sci. Res.* 22:725-726.
- ▲ Boulikas, T., Alevizopoulos, N., Ladopoulou, A., Belimezi, M., Pantos, A., Chistrofis, P. y Roberts, M. (2007). Cap. 9: Anticancer Therapeutics. En: Missailidiss S. (Ed.). *The Cancer Clock*. Ed. John Wiley & Sond Ltd. U.S.A. pp. 175-196.
- ▲ Branch, S. (2004). Reproductive System. En: Hodgson, E. (Ed.). *A Textbook of Modern Toxicology*. 3ªed. Ed. John Wiley & Sons, Inc. U.S.A. pp. 343-349.
- ▲ Bravo, E., Tovar, A., Ruiz, M., Ruiz-Rodríguez, L. y Moreno-Esparza, 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®*. Facultad de Química. UNAM. México. pp. 1-9.



- ▲ Bravo, G. M. E. (1998). Evaluación antineoplásica de compuestos de coordinación de cobre (Casiopeínas®) en modelo tumoral murino. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México.
- ▲ Callen, W. P. (2009). Ecografía en obstetricia y Ginecología. 5° ed. Ed. Elsevier Masson. Barcelona, España. pp. 282-284.
- ▲ Camargo, S. A., García, Z. P., Altamirano, B. A., Hernández, M. R. y Altamirano, L. M. (2009). Efectos de la Casiopeína III-Ea en el desarrollo embriológico y fetal en ratón. En: *Congreso Nacional de Genética*. Unidad de Investigación en genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN). Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. Xalapa, Veracruz.
- ▲ Campell, N. A. y Reece, R. J. (2007). Biología. 7°ed. Ed. Panamericana Médica. España. pp. 267.
- ▲ Carney, E. W. y Kimmel, C. A. (2007). Assessment: delayed ossification and wavy ribs. *Birth Defects Research. (Part B)* 80:473–496.
- ▲ Carson, B. L., Ellis III, H. V. y McCain, J. I. (1987). Toxicology and biological monitoring of metals in humans; including feasibility and need. Ed. Lewis Publishers, Inc. pp. 93-97.
- ▲ Castañeda, P. A., Aragón-Martínez, A. y Altamirano-Lozano, M. A. (2004). Toxicidad reproductiva masculina de la Casiopeína II-gly. En: *Primer Congreso Nacional de Química Médica*. Oaxaca, Oaxaca. pp. 135-138.
- ▲ Cermeño, G. J. R. (2007). Estudio del efecto genotóxico inducido *in vivo* por la Casiopeína II-gly y por la Casiopeína III-ia. Tesis de licenciatura. UNAM. México. pp. 25-38.
- ▲ Chabner, B. A. y Longo, D. L. (2006). *Cancer Chemotherapy & Biotherapy: principle and practice*. Ed. Lippincott William & Wilkins. U. S. A. pp. 45, 70.
- ▲ Chi-Jen, L., Lee, L. H. y Cheng, H. L. (2003). Development and evaluation of drugs from laboratory through licensure to market. Ed. C.R.C. Press Inc. U.S.A. pp. 1-16.



- ▲ Clark, G. W., Brater, C. D. y Jhonson, A. R. (1993). *Farmacología Médica*. Ed. Mosby. España.
- ▲ Comhaire, F. H. (1993). Methods to evaluate reproductive health of the human male. *Reprod. Toxicol.* 7:39-46.
- ▲ Córdova, I. A., Ruiz, L. C. G., Córdova, J. C. A., Córdova, J. M. S., Guerra, L. J. E., Rodríguez, D. B. E. y Arancibia, S. K. (2009). Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática. *Ciencias Veterinarias. Rev. Complut.* 3 (1):1-38.
- ▲ Corona, M. M. A. (2000). Efecto reprotóxico y genotóxico producido por arsenato de sodio a ratones macho CD-1. Tesis de Licenciatura. UNAM. México. pp. 1-33.
- ▲ Cunningham, G. J. (2003). *Fisiología Veterinaria*. 3ª ed. Ed. Elsevier. España. pp. 420-425.
- ▲ De Vizcaya-Ruiz, A., Rivero-Muller, A., Ruiz-Ramírez, L., Lass, G. E. N., Kelland, L. R., Orr, R. M. y Dobrata, M. (2000). Induction of apoptosis a novel cooper-based anticancer compound, Casiopeína II, in L1210 murine leukemia and CH1 human ovann carcinoman cells. *Toxicology in Vitro.* 14:1-5.
- ▲ Didier, L. y Debrat, C. (2004). *Quimioterapia Anticancerosa*. 2º ed. Ed. Masson, S.A. Barcelona, España. pp. 1-10.
- ▲ DiSaia, P. J. y Creasman, W. T. (2002). Principios básicos de la quimioterapia. En: *Oncología y Ginecología Clínica*. 6ª ed. Ed. Elsevier Science. Madrid, España. pp. 501-519.
- ▲ Domínguez, A., Tamayo, M., Pérez, I. Y., Salas, H., Pérez, O., y Batista, A. (2009). Evaluación citotóxica y genotóxica del adyuvante AFCo1 por el ensayo de morfología de la cabeza del espermatozoide en ratón NMRI. *VacciMonitor.* 18(3):13-17.
- ▲ Fajardo, M. B. (2007). Estudio del efecto de la Casiopeína III-ia sobre el ADN de células de mamíferos tratadas *in vitro*. Tesis de Licenciatura. UNAM. México. pp. 1-38.



- ▲ Feris, M. J., Fernández, J., Peña, Ch., Sánchez, J., Alarcón, T., Terrero, C., Coradin, H. y Puig, J. R. (1996). Principios y regulaciones en las investigaciones clínicas con nuevos medicamentos. ADOERBIO.002. 32(1):21-25.
- ▲ Foster, P. M. D. y Lamb IV, J. C. (1988). Physiology and Toxicology of Male Reproduction. Ed. Academic Press. USA. pp. 1-40,135-140.
- ▲ Francis, B. M, Rogers, J. M., Sulik, K. K., Alles, A. J., Elstein, K. H., Zucker, R. M., Massaro, E. J., Rosen, M. B. y Chernoff, N. (1990). Cyclophosphamide teratogenesis: evidence for compensatory response to induced cellular toxicity. Teratology. 42:473-482.
- ▲ Fuentes, P. F. M., Mendoza, Y. R. A., Rosales, F. A. L. y Cisneros, T. R. A. (2008). Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: Ratón. Centro Nacional de Productos Biológicos. Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú. pp. 7, 10-31.
- ▲ Gagnon, C., Iwasaki, A., De Lamirande, E. y Kovalski, N. (1991). Reactive oxygen species and human spermatozoa. En: Robaire, B. y Ann, N. (Eds.). *The Male Germ Cell: spermatogonium to fertilization*. Academ. Sci. 637:436-444.
- ▲ García, G. A. M. (1998). Efectos teratogénicos de la exposición a pesticidas. Departamento de medicina preventiva y salud pública. Valencia, España. 460:22.
- ▲ García, O. L. E. (2007). Estudio de los efectos tóxicos agudos de las Casiopeínas III-ia y IIgly en perros. Tesis de Maestría. UNAM. México. pp. 1-16.
- ▲ García, P. P. (2003). Cap.: 40 Fármacos Antineoplásicos. En: *Farmacología en Enfermería*. Ed. DAE. Universidad de Castilla-La Mancha. España. pp. 500-509.
- ▲ García-Rodríguez, M. C., Pérez-Flores, G., Santiago-Moreno, Y. y Altamirano-Lozano, M. (2006). Estudio de los efectos genotóxicos y citotóxicos del cisplatino en ratones adultos y en el desarrollo embrionario y fetal, comparados con las Casiopeínas IIgly y III-ia (Un nuevo grupo de agentes antineoplásicos). En: *2do Congreso Nacional de Química Médica*. Unidad de Investigación en Genética y



- Toxicología Ambiental (UNIGEN). Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. México.
- ▲ Gil, V. M. A., Cardona, M. W. D. y Cavidad, J. A. P. (2007). Muerte embrionaria temprana: ¿Tiene influencia el factor masculino? Arch. Esp. Urol. 60(9):1.057-1.068.
  - ▲ Gilbert, F. S. (2003). Fecundación el comienzo de un nuevo organismo. En: *Biología del Desarrollo*. 7ª ed. Ed. Medica Panamericana S.A. Buenos Aires, Argentina. pp. 197- 230.
  - ▲ Gracia-Mora, I., Ruiz-Ramírez, L., Gómez-Ruiz, C., Tinoco-Méndez, M., Márquez-Quiñones, A., De Lira, R. L., Marín-Hernández, A., Macías-Rosales, L. y Bravo-Gómez, M. L. (2001). Khigth'S move in the periodic table; from copper to platinum, novel antitumor mixed chelate copper compounds. Casiopeínas®; evaluated by an *in vitro* human and murine cancer cell line panel. Metal Based Drugs. 8(1):19-28.
  - ▲ Gunnar, N. (1998). Metales: propiedades químicas y toxicidad. En: Dufresne, B. A. (Ed.). *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo*. Ed. Ministro de Trabajo y Asuntos Sociales. Madrid, España. pp. 10-15.
  - ▲ Gutiérrez, B. J. y Salsamendi, A.L.C. (2001). Fundamentos de Ciencia Toxicológica. Ed. Díaz de Santos, S.A. Madrid, España. p.p. 181-189.
  - ▲ Gutiérrez, B. L. y López, A. (2001). Fundamentos de Ciencia Toxicológica. Ed. Díaz Santos. España. pp. 1-53.
  - ▲ Guyton, A. C. (1984). Tratado de Fisiología Médica. 6ªed. Ed. Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V. México. pp.645-690.
  - ▲ Guyton, A. C. (2006). Tratado de Fisiología Médica. 11ªed. Ed. Elsevier S.A. España. pp. 999.
  - ▲ Hansen, J. M. (2006). Oxidative stress as a mechanism of teratogenesis. Birth Defects Research. (Part C). 78:293–307.



- ▲ Hernández, E. L. (2004). La cardiotoxicidad de las Casiopeínas II y III. En: *Primer Congreso Nacional de Química Médica*. Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. México. pp. 33-34.
- ▲ Hernández-Esquivel, L., Marín-Hernández, A., Pavón, N., Carvajal, K. y Moreno-Sánchez, R. (2006). Cardiotoxicity of copper-based antineoplastic drugs casiopeinas is related to inhibition of energy metabolism. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 212:79-88.
- ▲ Instituto Nacional de Estadística, Geográfica e Informática. [Base de datos]. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa>.
- ▲ Jeulin, C., Soufir, J. C., Weber, P. W., Laval-Martin, D. y Calvayrac, R. (1989). Catalasa activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Res.* 24:185-196.
- ▲ Johnson, L., Welsh, T. H. y Wilker, C. E. (1997). Reproductive and endocrine toxicology. En: Glenn, S., Charlene, A., McQueen, A., Gandolf, J. (Eds). *Comprehensive Toxicology*. Pergamon. New York, U.S.A. pp. 5-5.1.
- ▲ Josep, M. A. y López, S. J. F. (1998). El Cáncer y su Prevención. Ed. Universidad de Barcelona. España. pp. 47-68.
- ▲ Jüppner, H. (2000). Role of parathyroid hormone- related peptide and Indian hedgehog in skeletal development. *Pediat. Nephrol.* 14:606-611.
- ▲ Klemmt, L. y Scialli, A. R. (2005). The transport of chemicals in semen. *Birth Defects Research. (Part B)*. 74:119–131.
- ▲ Kovacic, P. y Somanathan, R. (2005). Mechanism of teratogenesis: electron transfer, reactive oxygen species, and antioxidants. *Birth Defects Research. (Part C)*. 78:308–325.
- ▲ Langman, J. y Sadler, T. W. (2009). *Embriología Médica: con Orientación Clínica*. 10°ed. Ed. Panamericana Médica. Argentina. pp. 129-147.



- ▲ Larsen, W. D. y Larsen, W. J. (2003). Embriología Humana. 2ª ed. Ed. Elsevier España. pp. 23-30, 61-74.
- ▲ Macarulla, T., Ramos J. F. y Tabeno J. (2009). Comprender el Cáncer. Ed. Amat. España, Barcelona. pp. 7-16.
- ▲ Marchetti, F. y Wyrobek, A. J. (2008). DNA repair decline during mouse spermiogenesis results in the accumulation of heritable DNA damage. *DNA Repair* 7:572–581.
- ▲ Marchetti, F., Lowe, X., Bishop, J. y Wyrobek, A. J. (1997). Induction of chromosomal aberrations in mouse zygotes by acrylamide treatment of male germ cells and their correlation with dominant lethality and heritable translocations. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 30:410-417.
- ▲ Marín-Hernández, A., Gracia-Mora, I., Ruíz-Ramírez, L. y Moreno-Sánchez, R. (2003). Toxic effects of copper based antineoplastic drugs (Casiopéinas®) on mitochondrial function. *Biochem. Pharma.* 65:1979-1989.
- ▲ Markey, C. M. (2001). The development of acute toxicity in mouse study. *Biol. Repro.* 65:1215-1223.
- ▲ Medina, M. F., Arencibia, A. D. F., López, F. Y., Díaz, R. D., Sinfuentes, R. S. y Infante, B. J. F. (2009). Diseños experimentales para los estudios de toxicología preclínica en el instituto Finlay. *Toxicología Experimental. Revista Toxicológica*. [Base de Datos] Disponible en: <http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>. pp. 40-54.
- ▲ Mejía, R. O., Ruiz, M., Grimaldi, D. C., García, A. G., Ruiz, L. A., García, C. A. y Casadiego, A. C. (2006). Bases biológicas y patológicas humanas del metabolismo del cobre. *Ed. Universitas Médica*. 47(1):55-72.
- ▲ Morales, R., Lledó, B., Ortiz, J. A., Rodríguez, A. D., Fabregat, A. y Bernabeu, R. (2007). Fragmentación del ADN espermático y su implicación en la fertilidad. *Rev. Ibero. Fert.* 24(5):305-313.



- ▲ Morris, D., Kearsley, J. y Williams, C. (1998). Cancer: a comprehensive clinical guide. Ed. Horwood Academic Publishers. pp. 47-57.
- ▲ Muiño, O. R. (2008). Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino, mediante el uso de sistemas casa y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas. Tesis de Doctorado. Facultad de Veterinaria. Universidad Santiago de Compostela. España. pp. 4-16.
- ▲ Nasulewics, A., Mazur, A. y Opolski, A. (2004). Role of copper in tumor angiogenesis-clinical implications. Trace Elements Med. Biol. 18:1-8.
- ▲ Odeigah, P. G. C. (1997). Sperm head abnormalities and dominant lethal effects of formaldehede in albino rats. Mutat. Res. 389:141-148.
- ▲ Olsen, A. K., Lindeman, B., Wiger, R., Duale, N. y Brunborg, G. (2005). ¿How do male germ cells handle DNA damage? Toxicology and Applied Pharmacology. 207:S521 – S531.
- ▲ Organización Mundial de la Salud. (2003). Cooper in drink water. Documento de referencia para la elaboración de las Guías de la Salud, para la calidad del agua potable. (188):1-2.
- ▲ Organización Mundial de la Salud. (2009). Cáncer. Nota descriptiva N°297, Julio de 2008. D.F, México.
- ▲ Page, C. P., Curtis, M. J., Sutter, M. C., Walker, M. J. y Hoffman, B. B. (1998). Farmacología Integrada. Ed. Harcourt Brace. Madrid, España. pp. 553-564.
- ▲ Palomero, G., Vázquez, M. T., Vega, J. A., Naves, F. J. y Rodríguez, C. (1998). Lecciones de Embriología. Ed. Servicio de Publicaciones, Universidad de Oviedo. España. pp. 298, 358-369.
- ▲ Patton, K. T. y Thibodeau, G. A. (2008). Estructura y Función del cuerpo. Ed. Díaz de Santos, S.A. Madrid, España. p.p. 495.
- ▲ Pérez, C. M. (2009). Impacto del estrés térmico y del daño nuclear espermático en la viabilidad embrionaria y en la proporción de sexos en el ratón. Tesis de



- Doctorado. Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. España. pp. 13-51.
- ▲ Phillip, R. (2003). *Oncología Clínica: enfoque multidisciplinario para médicos y estudiantes*. 8° ed. Ed. Elsevier Science. Madrid, España. p.p. 146-160,160-197.
  - ▲ Pierce, A. B. (2005). *Genética; un enfoque conceptual*. 2° ed. Ed. Panamericana medica. Madrid, España. pp. 624-636.
  - ▲ Polifka, J. E., Rutledge, J. C., Kimmel, G. L., Dellarco, V. y Generoso, W. M. (1996). Exposure to ethylene oxide during the early zygotic period induces skeletal anomalies in mouse fetuses. *Teratology*. 53:1-9.
  - ▲ Powis, G. y Hacker, M. P. (1991) .*The toxicity of anticancer drugs*. Pergamon Press. U.S.A.
  - ▲ Pratt, W. B., Ruddonn, R. W., Ensiminger, W. D. y Maybaum, J. (1994). *The Anticancer Drugs*. 2ªed. Ed. Oxford-University Prices. New York, U.S.A. pp. 14-15.
  - ▲ Rodríguez, C. F. P., Castel, G. J. M., Guzmán, G. J. L., Delgado, P. M., Mena, G. Y., Alcalde, A. M. J. y González, R. P. (2003). *Bases de la Reproducción Animal*. Ed. Publicaciones Universidad Sevilla, Universidad de Córdoba, Universidad Huelva. España. pp. 69-76.
  - ▲ Rodríguez-Mercado, J. J. y Altamirano-Lozano, M. A. (2006). Vanadio: contaminación, metabolismo y genotoxicidad. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 22:173-189.
  - ▲ Rohen, E. y Lütjen-Decroll, M. (2008). *Embriología Funcional: una perspectiva desde la Biología del desarrollo*. 3ª ed. Ed. Medica panamericana. pp. 15-17.
  - ▲ Román, F. D. (1990). *Innovación y desarrollo farmacéutico*. Ed. Asociación Farmacéutica Mexicana A.C. México. pp. 35-63.
  - ▲ Ruano, A. J. M. y Calderón, E. C. A. (2001). *Principios de Quimioterapia Oncológica, Médico–Quirúrgico, Pediatría*. Ed. McGraw- Hill Interamericana. D.F., México. pp. 385-387.



- ▲ Ruiz-Azuara, L. y Gracia-Mora, I. (2006). Casiopeínas<sup>®</sup>, compuestos de Novo con actividad antineoplásica: un ejemplo de desarrollo de medicamentos en química médica. Simposio de Cáncer Básico. En: *2do Congreso Nacional de Química Médica*. Facultad de Química. UNAM. México.
- ▲ Ruiz-Azuara, L., Gracia-Mora, I., Moreno, E. L., Díaz, D., Gasyue, L., Huerta, L., Mayer, L., Ortiz, V. y Lomeli, C. (1991). The antitumor activity of several transition metal complexes. *Inorg. Bioch.* pp. 66-69.
- ▲ Sánchez, B. F., Gracia-Mora, I., Roldan-Reyes, E. y Ruiz-Azuara, L. (2006). Determinación de la capacidad genotóxica, citotóxica y citostática de las Casiopeína I-gli, II-gli y III-ia en linfocitos humanos en cultivo, Médula ósea y linfocitos de sangre periférica de ratón. En: *2do Congreso Nacional de Química Médica*. Facultad de Química. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México.
- ▲ Scialli, R. A. (1992). A clinical guide to reproductive and developmental toxicology. Ed. CRC Press Inc, U.S.A.
- ▲ Seed, J., Chapin, R. E., Clegg, E. D., Dostal, L. A., Foote, R. H., Hurtt, M. E., klinefelter, G. R., Makris, S. I., 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.
- ▲ Selvakumar, E., Prahalathan, C., Sudharsan, P. T. y Varalakshmi, P. (2006). Chemoprotective effect of lipoic acid against cyclophosphamide-induced changes in the rat sperm. *Toxicology.* 217:71–78.
- ▲ Serment-Guerrero, J., Reyes-Pérez, E. y Breña-Valle, M. (2006). Fragmentación de ADN por diferentes Casiopeínas<sup>®</sup>. En: *2do Congreso Nacional de Química Médica*. Departamento de Biología. Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. México.



- ▲ Sharpe, M. R. (1994). Regulation of spermatogenesis. En: *The Physiology of Reproduction*. 2ªed. Ed. Raven Press. Ltd. New York, U.S.A. p.p. 1363-1434.
- ▲ Shelby, D. H., Bishop, J. B., Mason, M. J. y Tidall, R. K. (1993). Fertility, reproduction and genetic disease: studies on the mutagenic effects of environmental agents on mammalian germ cells. *Environ. Health. Perspect.* 100:283-291.
- ▲ Shen, H. M. y Choon, N. (2000). Oxidative stress status. *Free Rad. Biol. & Med.* 28(4):529-536.
- ▲ Shing, J. H., Mori, C. y Shiota, K. (1999). Involvement of germ cell apoptosis in the induction of testicular toxicity following hydroxyurea treatment. *Toxicology Applied Pharmacology.* 155:139-149.
- ▲ Sigma cell culture. (1997). Technical information. Sigma Aldrich Copr. pp. 201.
- ▲ Skeel, R. T. (2007). *Handbook of Cancer Chemotherapy*. 7ª ed. Ed. Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, U.S.A. pp. 61-67.
- ▲ Suckow, A. M., Danneman, P. y Brayton, C. (2001). *The Laboratory Mouse*. Ed. CRC Press. U.S.A. pp. 10-22.
- ▲ Sun, F. K. E. y Martin, R. H. (2006). Is there a relationship between sperm chromosome abnormalities and sperm morphology? *Reproductive Biology and Endocrinology.* 4:1.
- ▲ Szabo, K. T. (1998). *Congenital Malformation in Laboratory and Farm Animals*. Ed. Academic Press, Inc. San Diego California, U.S.A. pp. 41,144,192,216,269.
- ▲ Taylor, M. y Dawson, J. S. R. (2003). *Lo Esencial de la Farmacología*. 2ªed. Ed. Elsevier. Madrid, España. pp. 2-19.
- ▲ Tovar-Huerta, S., Gracia-Mora, I. y Ruiz-Azuara, L. (2006). Evaluación antineoplásica de dos compuestos de coordinación mediante el empleo de modelos *in vitro*. En: *2do Congreso Nacional de Química Médica*. Unidad de Experimentación Animal (UNEXA). Departamento de Química Inorgánica y Nuclear. Facultad de Química. UNAM. México.



- ▲ Tovar-Tovar, A. y Ruiz-Azuara, 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®*. Facultad de Química. UNAM. México. pp. 83-89.
- ▲ Tovar-Tovar, A., Ruiz-Ramírez, L. Campero, A., Romerosa, A., Moreno-Esparza, R. y Rosales-Hoz, M. (2004). Structural and reactivity studies on 4,4'- dimethyl-2.2'- bipyridine acetylacetonate copper(II) nitrate (Casiopeína III-ia) with methionine, by UV-visible and EPR techniques. *Inorg. Biochem.* 98:1045-1053.
- ▲ Tyl, R. W., Chernoff, N. y Rogers, J. M. (2007). Altered axial skeletal development. *Birth Defects Research. (Part B)*. 80:451-472.
- ▲ Valko, M., Morris, H. y Cronin, M. T. D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry.* 12:1161-1208.
- ▲ Velasco, M. A. (2003). Introducción: concepto y sinopsis histórica de la farmacología. En: Velasco, M. A., San Román, B. S., Serrano, J. S. M., Martínez, S. R., Cavidad, T. M. I. (Eds.). *Farmacología Fundamental*. Ed. Mc Graw-Hill. Madrid, España. pp. 3-12.
- ▲ Wien, J. A., Kavoussi, R. L., Novick, C. A., Partin, W. A., Craig, M. D. y Petters, M. D. (2008). *Campell-Walsh: Urología*. 9ªed. Ed. Panamericana Medica. España. pp. 600-623.
- ▲ Wilson, G. J. (1997). Current status of teratology general principles and mechanisms derived from animal studies. En: Wilson, G. J. y Fraser, C. F. (Eds.). *Handbook of Teratology. Vol. 1. General principles and etiology*. Ed. Plenum Press. New York, U.S.A.
- ▲ Wyrobek, A. J. (1979). Changes in mammalian sperm morphology after x- ray and chemical exposure. *Genetics.* 92:105-119.
- ▲ 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72(11):4425-4429.
- ▲ Wyrobek, A. J. y Bruce, W. R. (1978). The induction of sperm shape abnormalities in mice and humans. *Chem. Mutag.* 5:257-285.
- ▲ Wyrobek, A. J., Watchmaker, G. y Gordon, L. (1984). Sperm morphology testing in mice. *Handbook of mutagenicity test procedures*. 2ªed. Ed. Elsevier. New York, U.S.A. pp. 739-750.
- ▲ 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.
- ▲ Zaragoza, P. O., Bahena, R. M., Díaz, B. C.E. y Madrid, M. V. (1997). Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud Pública México.* 39:451-462.