

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD



Casa abierta al tiempo

EFECTO CITOTOXICO *IN VIVO* DEL CLORANFENICOL EN
ESPERMATOZOIDES DE CONEJO DOMESTICO

(Oryctolagus cuniculus)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRIA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A :

BIOL. JESUS ARTURO GONZALEZ MANDUJANO

DIRECTOR DR. MIGUEL BETANCOURT RULE

ASESORES: DRA. CONCEPCION GUTIERREZ RUIZ

M. en C. DEMETRIO AMBRIZ GARCIA

MEXICO, D. F.

MAYO, 1999.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

Agradezco profundamente al Dr. Miguel Betancourt, la acertada dirección de esta Tesis y la paciencia que me brindó en esta etapa.

A la Dra. Concepción Gutiérrez y al M. en C. Demetrio Ambriz, asesores de este trabajo, por su estímulo y orientación constante.

Por permitirme el uso del Analizador Hamilton-Torne Motility, agradezco al Laboratorio de Manejo de Gametos y Embriones del Departamento de Biología de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

Dedico este trabajo a:

Mi madre por su amor y comprensión,
Por ser mi guía y mi orgullo.

Mis hermanos Tere, Jorge, Mary Carmen y Gilberto
por su cariño y respeto.
Mis queridos sobrinos Mariana, Daniel y Mauricio.

Jorge Maldonado, por su amistad y respaldo en todo momento,
porque conoce el valor de la lealtad.

A familiares y amigos por su paciencia y apoyo incondicional,
por comprender el significado de la honestidad.

A mis compañeros de la Maestría
y del Laboratorio de Biología Celular,
por los todos los momentos compartidos.

Agradezco a las siguientes personas su valiosa colaboración por contribuir a este trabajo:

María Eugenia Chavarría
Hector Zallas
Alejandro López
Yvonne Docolumb
Eduardo Casas
Irma Jiménez
Lourdes Gallardo
Rebeca García
Lourdes Pérez
Guadalupe Maldonado
Lilia Mandujano
Elizabeth Martínez

Los días inútiles son como una costra
de mugre sobre el alma.
Hay una asfixia lenta que sonrío,
que olvida, que se calla.
¿Quién me pone estos sapos en el pecho
cuando no digo nada?.....

.....Hay un hombre que cae días y días
de pie, desde su cara,
y siente que en su pecho van creciendo
muertes y almas.
Un hombre como yo que se avergüenza ,
que se cansa,
que no pregunta porque no pregunta
ni quiere nada.
¿Qué viene hacer aquí tanta ternura fracasada?
¡Díganle que se vaya!

Jaime Sabines (1950)

RESUMEN

El cloranfenicol fue aislado de *Streptomyces venezuelae* en 1947, mostrando una amplia y efectiva acción antibacteriana. Su efecto bacteriostático está mediado por la inhibición de la síntesis de proteínas a través de la unión reversible con la subunidad ribosomal 50 S, impidiendo la entrada del ARNt al sitio aceptor en el ribosoma, lo que también puede ocurrir en eucariontes.

Desde 1948 este antibiótico se produjo en cantidades suficientes para uso clínico generalizado, sin embargo, en 1958 se hizo evidente que puede causar pancitopenia en médula ósea y anemia aplásica.

Debido a que durante la espermatogénesis, se presentan altas tasas de síntesis de proteínas tanto en la división celular como en la diferenciación, en este trabajo se planteó como objetivo, determinar el efecto del cloranfenicol en la espermatogénesis de conejos domésticos, evaluando la viabilidad y morfología espermática, así como el patrón de velocidad y la reacción acrosomal.

El cloranfenicol fue administrado en dosis de 0 (control), 29, 112 y 145 mg/kg de peso en conejos Nueva Zelanda Blanco (*Oryctolagus cuniculus*), de ocho meses de edad. Se emplearon tres conejos por dosis. El antibiótico se administró por vía oral disuelto en la ración diaria de agua durante dos semanas. Las muestras de semen se obtuvieron a través de una vagina artificial 7 días antes de la primera toma del fármaco, 1 y 7 días después de iniciado el tratamiento y cada dos semanas hasta el día 77, para cubrir todas las etapas de la espermatogénesis. La viabilidad y la morfología se evaluaron bajo el microscopio óptico y la reacción acrosomal bajo el microscopio de fluorescencia. La velocidad y el tipo de desplazamiento se registraron en un analizador automatizado (Hamilton - Thorne).

Los datos fueron analizados por medio de la prueba de Kruskal-Wallis teniendo como límite de confianza una $p \leq 0.05$, presentando daño producido por el cloranfenicol con una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control los parámetros de viabilidad y morfología. La dosis media (112 mg/kg) tuvo mayor efecto que la dosis más alta (145 mg/kg), debido probablemente, a un incremento en la tolerancia al antibiótico. Aunque no hubo diferencia significativa en la reacción acrosomal espontánea e inducida, en ambas se aprecia cierta tendencia de daño en el primer tercio del tiempo total del estudio. No se encontró diferencia significativa en ninguno de los parámetros evaluados con respecto a la velocidad y desplazamiento de los espermatozoides. En viabilidad, morfología y reacción acrosomal, no se observó una respuesta con relación a la dosis, ni efecto respecto al tiempo, lo que hace suponer que no hay un daño acumulativo del fármaco en los conejos, proponiéndolo como un antibiótico temporalmente tóxico.

INDICE

	Página
I. INTRODUCCION.....	1
II. JUSTIFICACION.....	13
III. HIPOTESIS.....	13
IV. OBJETIVOS.....	13
V. MATERIAL Y METODOS.....	14
VI. RESULTADOS.....	20
VII. DISCUSION.....	33
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	46
ANEXO.....	52

I. INTRODUCCION

Uno de los beneficios de la vida moderna es el cúmulo de sustancias que el hombre tiene a su disposición para mejorar y mantener una buena calidad de vida, sin embargo algunas de éstas también coadyuvan en su deterioro y destrucción, sustancias a las cuales se les ha llamado xenobióticos. En este último caso, no sólo se afecta a los individuos que los reciben, sino tendrán injerencia en sus descendientes. Un fenómeno que actualmente causa controversia y discusión en la comunidad científica es la disminución paulatina de la calidad y del número de espermatozoides en el ser humano (Adamopoulos y col., 1996), como consecuencia, entre otras cosas, del consumo y abuso de una gran variedad de sustancias químicas y aunque no todas son potencialmente tóxicas, existen algunas que si lo son bajo condiciones específicas. Lo importante no es desacreditarlas ni prohibirlas, sino más bien conocerlas en extenso para tener control y uso adecuado, potenciando sus cualidades y disminuyendo los riesgos.

Algunos de los xenobióticos más estudiados son los antibióticos, desde su descubrimiento por Fleming en 1928 (Delaat, 1979) a la fecha, se ha avanzado en la comprensión de sus mecanismos de acción, producción comercial, su adecuada y oportuna prescripción. Estas sustancias derivadas de seres vivos, son capaces de aniquilar a los microorganismos de dos maneras: destruyéndolos de manera directa e inmediata (acción bactericida) e impidiendo que se multipliquen o se desarrollen (efecto estático), ya por inhibición competitiva o por interferencia en la síntesis de proteínas. Estos se clasifican de acuerdo a su composición química, su fuente, su valor terapéutico y sus límites de actividad sobre distintos tipos de organismos (Delaat, 1979).

Para que un tratamiento antimicrobiano sea eficaz debe cumplir dos requisitos, destruir al agente responsable de la infección y ser inocuo para el paciente. En algunos casos no pueden cumplirse ambas condiciones y deben asumirse ciertos riesgos con el tratamiento o recurrir a otras formas terapéuticas.

En la actualidad se conocen diversos antibióticos que son tóxicos en diferente grado para el hombre, como la geneticina y la higromicina (McDaniel y Schultz, 1993). Otro ejemplo, que es el objeto de estudio de esta investigación, es el cloranfenicol (CAF), el cual producido de manera natural por *Streptomyces venezuelae*, fue aislado en 1947 y de él se extrajo una sustancia cristalina a la que se le llamó cloromicetina. Después de determinar la fórmula estructural y prepararlo sintéticamente, el antibiótico se probó en animales y humanos (Goodman y col., 1982), empleándose en brotes de tifus y otras infecciones, con resultados favorables.

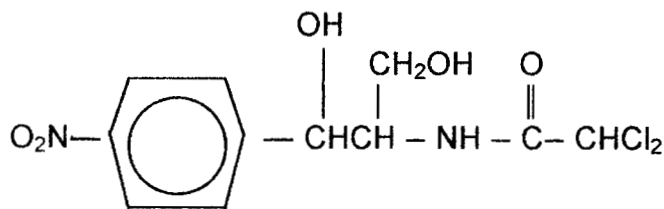
Propiedades físicas

El CAF es un polvo fino, cristalino, blanco; de sabor amargo, termoestable, poco soluble en agua, pero fácilmente soluble en la mayoría de disolventes orgánicos. El polvo se mantiene estable al aire y en solución acuosa no se altera aunque hierva durante cinco horas (Sumano y Ocampo, 1988).

Propiedades químicas

Es un derivado del ácido dicloroacético, constituido por un grupo nitroaromático en su molécula, único producto químico de origen natural que contiene este grupo (Goodman y col., 1982). Se define como 2, 2-Dicloro-N-[2-hidroxy-1- (hidroximetil) -2- (4-nitrofenil) etil] acetamida (Merck y Co., 1989) y su peso molecular es de 323 Da.

Fórmula estructural:



La actividad antibacteriana la proporciona el grupo D-treopropanediol, y el grupo aromático posiblemente representa la porción tóxica de la molécula, con débil efecto antimicrobiano (Sumano y Ocampo, 1988).

Mecanismo de acción

El CAF posee un espectro amplio de actividad antimicrobiana, es principalmente bacteriostático y ataca tanto a bacterias gramnegativas como a grampositivas, limitando además el crecimiento de las rickettsias.

En procariontes inhibe la síntesis general de proteínas, mientras que en células eucariontes inhibe, preferencialmente, la síntesis de proteínas mitocondriales (Rosenkranz, 1988). El fármaco penetra en las células bacterianas, probablemente por un proceso de difusión facilitada. Actúa ligándose reversiblemente a la subunidad ribosomal 50 S, impidiendo que el extremo del ARNt que contiene aminoácidos, se ligue a uno de sus sitios de unión en el ribosoma. Las uniones peptídicas se impiden mientras el fármaco permanece ligado al ribosoma (Goodman y col., 1982).

Farmacocinética

El CAF, compuesto no ionizado y altamente liposoluble, se absorbe rápidamente del tracto gastrointestinal, alcanzando en dos horas las concentraciones plasmáticas máximas; la vida media del fármaco promedio en plasma es de 2.5 horas, encontrándose concentraciones terapéuticas de 5 µg/ml en el plasma aún después de 8 horas. Este antibiótico se distribuye con facilidad en los líquidos corporales, obteniéndose niveles altos en hígado y riñones. Alcanza fácilmente concentraciones terapéuticas en el líquido cefalorraquídeo, bilis y leche, pasando además la barrera placentaria y el humor acuoso. El CAF y sus metabolitos se excretan rápidamente por la orina y heces, éstas reciben el medicamento por vía hepática. Sólo cerca del 10% del CAF administrado se excreta en la orina como antibiótico activo (Goodman y col., 1982; Sumano y Ocampo, 1988).

Biotransformación

El CAF es metabolizado principalmente por reducción del grupo nitro y conjugación glucorónica. En general, se sugiere que la mayor parte del CAF y sus metabolitos se reabsorben en el intestino y pasan a la circulación sanguínea, siendo excretados por vía biliar (Sumano y Ocampo, 1988). En el humano sus metabolitos son: el CAF-nitroso, producido en el hígado; el dihidro-CAF y dihidro-CAF base, ambos transformados por metabolismo bacteriano del intestino; CAF-glucorónico y CAF-base son excretados en orina, y el CAF-alcohol es únicamente encontrado en orina de neonatos (Robbana-Barnat y col., 1997).

Efectos negativos

El uso del CAF, solo o combinado, debe limitarse a ciertas infecciones tales como fiebre tifoidea, meningitis ocasionada por *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*, y en tratamientos contra abscesos cerebrales e intraabdominales ocasionados por bacterias anaerobias. Otro caso más en que debe prescribirse es en la brucelosis, en pacientes alérgicos a la tetraciclina.

Su restricción se debe a que se han detectado reacciones por hipersensibilidad, como erupciones cutáneas y fiebre; efectos tóxicos menores posteriores a la administración oral como son: náuseas, vómitos, sabor desagradable, diarrea e irritación perineal, y por último, daños tóxicos graves en células eritropoyéticas.

En 1948 se producían grandes cantidades de CAF, diez años después, se comprobó que podía causar discrasias sanguíneas serias y fatales como pancitopenia en médula ósea y anemia en sangre periférica (Goodman y col., 1982).

Ahora se sabe que estos efectos tóxicos en el hombre son ocasionados por dos clases de patologías con características distintas. La primera está caracterizada por alteraciones en sangre periférica, disminución de hemoglobina e incremento de hierro plasmático. Sin embargo estos daños son reversibles al suspender el tratamiento, pero

si éste continúa puede producir leucemia cuya frecuencia y severidad tiene relación con la dosis.

La segunda afecta directamente a la médula ósea causando pancitopenia, hecho que puede presentarse por hipersensibilidad al CAF, y aunque la frecuencia no tiene relación con la dosis, es más común que se presente en pacientes que se sometieron en numerosas ocasiones al antibiótico o se expusieron a tratamientos prolongados. En este tipo de patología, donde el número de casos es menor, el daño es irreversible provocando la muerte cuando la aplasia en médula ósea es total o desarrolla leucemia aguda en pacientes que se recuperan de la aplasia. En todos los casos en que la anemia continúa, las lesiones provocadas persisten en distintas generaciones celulares modificando el genoma, explicando así la ocurrencia de la leucemia. Por tanto Robbana-Barnat y col. (1997) sugieren que los dos tipos de patologías en humanos implican mecanismos de acción diferentes del antibiótico, el primero relacionado con la toxicidad inmediata y el segundo con la genotoxicidad.

A pesar de los hallazgos descritos, dos sucesos en los años setenta incrementaron el uso del CAF: la aparición de cepas de *H. influenzae* resistentes a la ampicilina y el conocimiento de su efectividad sobre las bacterias anaerobias.

Con el interés de conocer más profundamente sobre los daños provocados por este antibiótico, varios investigadores se dieron a la tarea de experimentar sus efectos adversos bajo diversas condiciones, distintos tipos celulares y organismos.

En Bacterias.

Estudios *in vitro* en ADN bacteriano, utilizando CAF y su metabolito CAF-nitroso, demostraron que el primero no resulta dañino y el segundo tiene efecto sobre la molécula, distorsionando la hélice y rompiendo la cadena. (Skolimowski y col., 1981, 1983).

En estudios *in vivo* no hay nada contundente, ya que dependiendo de las cepas, hubo o no daño nuclear. En aquellas que sí lo hubo, no se relacionó directamente con el fármaco, más bien el daño que el ADN sufre espontáneamente no es reparado, ya que para esto requiere de síntesis de proteínas de *novo*, misma que es inhibida por el antibiótico (Rosenkranz, 1988). Satta y col. (1979) completan la información, afirmando que el CAF inhibe el fenómeno SOS, mecanismo de respuesta ante agentes agresivos, que se activa cuando el ADN bacteriano es dañado.

En cultivos de células de mamíferos.

Se ha comprobado que el CAF tiene efecto sobre la viabilidad, el bloqueo de la síntesis de DNA e inhibición mitótica en células sanguíneas humanas. Respecto a lo anterior, Yunis y col. (1980) comprobaron que el metabolito CAF-nitroso es más agresivo que el CAF solo, ya que al colocar distintas concentraciones del metabolito inhibe síntesis de proteínas, inhibe irreversiblemente el crecimiento de células sanguíneas de ratón y en linfocitos humanos ocasiona arresto celular en fase G₂ y un incremento en la mortalidad. No hay duda que el CAF es inductor de aberraciones cromosómicas y que es responsable de incrementar el intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos de diversas especies animales, pero en linfocitos humanos existe controversia, ya que mientras algunos los trabajos lo niegan (Rosenkranz, 1988) los estudios de Mitus y Coleman (1970) y Sasaki y Tonomura (1973) lo sostienen.

Mitus y Coleman (1970) cultivaron leucocitos de individuos sanos en medios con CAF, reportando que los cromosomas de estas células presentaron vacuolización intracromosomal entre otras anormalidades y que estos resultados eran similares a los encontrados en muestras de pacientes que habían recibido altas dosis del antibiótico. Por su parte Sasaki y Tonomura (1973) reportaron que linfocitos de pacientes con anemia de Fanconi fueron más susceptibles a rupturas cromosómicas en presencia de cafeína y CAF, y hacen mención de hallazgos en otros estudios donde se demuestra que inhibe la reparación de este tipo aberraciones cromosómicas, inducidas por rayos X.

En 1991 Sbrana y col. encontraron que el CAF en relación a la dosis induce un incremento en el intercambio de cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas en cultivos de linfocitos humanos y de hámster. Por otro lado Catalan y col. (1993) observaron un incremento en el intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos de bovino, a dosis de 5 µg/ml del antibiótico y no así a dosis de 10, 20 y 40 µg/ml.

Con el objetivo de conocer la participación de esta sustancia y la de sus seis metabolitos en el cuadro anémico en el hombre, Lafarge-Frayssinet y col. (1994) experimentaron en linfocitos humanos, encontrando que el CAF, por sí mismo, resulta menos tóxico que tres de sus metabolitos, como el CAF-nitroso, el dihidro-CAF y el dihidro-CAF base. Tres años después, el mismo grupo de investigación en un estudio similar, utilizó linfocitos y células de médula ósea humana, hallando en general semejanza con sus resultados anteriores (Robbana-Barnat y col. 1997), ya que en ambos tipos celulares el mayor efecto tóxico se dio con los dos primeros metabolitos mencionados, siendo los linfocitos los más susceptibles de daño.

Martelli y col. (1991) comprobaron la genotoxicidad del CAF en cultivos de hepatocitos humanos y de roedores, observando fragmentación de la cadena de ADN, aunque en concentraciones 25 veces más que la dosis máxima terapéutica.

Respecto a estudios *in vitro* en gametos, se ha demostrado que el CAF además de inhibir la maduración de ovocitos de anfibios y ratones, altera el orden de cromosomas durante la segregación de la primera división mitótica de la ovogénesis, incrementando el riesgo de aneuploidías (Shemerling y Skoblina, 1978; Beermann y Hansmann, 1986).

En el desarrollo.

En esta línea de investigación se detectó profundo daño teratogénico en equinodermos. Hagström y Lönning (1973) probaron distintas dosis de CAF en cigoto de erizo, encontrando, desde un retraso en las etapas del desarrollo larval, malformaciones o ausencia del esqueleto, hasta la inhibición de la diferenciación celular.

Lalliér (1966) reporta que probando 1 mg/ml de *D*-threo-CAF, 1 mg/ml de *L*-threo-CAF y thiofenicol en cigotos de erizo, encuentra al primero responsable de favorecer la vegetalización (diferenciación de estructuras entomesodérmicas), al segundo de inhibir el desarrollo y al tercero de retrasarlo, aunque el thiofenicol en concentraciones de 3 mg/ml. Es importante remarcar que responsabilizan directamente al grupo nitrobenzeno de la inhibición de dicho desarrollo.

Estudios en peces realizados por Anderson y Battle (1966), encontraron también daño teratogénico acompañado de anomalías cromosómicas y/o mitóticas; y en mamíferos se observó desarrollo anormal en ratas con 9 y 11 días de gestación (Rosenkranz, 1988).

In vivo.

En ratones, se han detectado aberraciones cromosómicas en médula ósea, pero no así en espermatogonias y espermatozoides (Rosenkranz, 1988). Sin embargo, en estas células el CAF incrementó el número de aberraciones cromosómicas, pero inducidas por la potenciación del efecto alquilante del antibiótico a otros químicos.

En ratones se conoce su efecto letal sobre el período premeiótico y no en el postmeiótico de la espermatogénesis. Además, administrado a ratones adultos fue responsable de una alta incidencia de aberraciones cromosómicas, como rompimientos cromáticos y rearrreglos cromosómicos en sus descendientes (F_1) (Rosenkranz, 1988).

Queda confirmada la participación del CAF sobre el efecto directo o indirecto en el ADN bacteriano; su potenciación a otros químicos y su sensibilidad preferencial a ciertos tipos celulares, cepas y especies animales; su efecto teratogénico en equinodermos y peces; su participación sobre la viabilidad, inhibición mitótica y aberraciones cromosómicas en linfocitos, células de médula ósea y hepatocitos, tanto en el hombre como en otros animales, siendo dos de sus seis metabolitos (CAF-nitroso y dihidro-CAF) más potentes que el CAF por sí solo. De igual manera se confirma que en gametos, inhibe la maduración de ovocitos en vertebrados, y en cuanto a

espermatozoides en ratones, causa mutaciones letales en etapas premeióticas y aberraciones cromosómicas en individuos de la primera generación de ratones machos expuestos a su tratamiento.

A principio de los años ochenta crece el interés por la toxicidad reproductiva, ya que no bastaba conocer el daño que ciertos xenobióticos ocasionaban al individuo, sino el efecto que estos provocaban en la descendencia y el grado en que pudieran comprometer la fertilidad. En los últimos 20 años este interés se ha incrementado como lo demuestran los trabajos de Russell y col. (1992), Anitha y col. (1994), Kamiguchi y col. (1995), Rosselli y col. (1995), Young y col. (1995), Witt y Bishop (1996).

Partiendo de la base que la toxicidad reproductiva es importante y que como se menciona en los antecedentes del CAF, falta corroborar su posible efecto en gametos masculinos durante la espermatogénesis, proceso largo y lento con una alta tasa de síntesis de proteínas susceptibles de ser dañadas por el fármaco. Por tanto es objetivo de este trabajo tratar de responder a tal incógnita a través de un modelo experimental *in vivo* en un estudio horizontal.

Es relevante para este estudio determinar si el CAF atraviesa la barrera hemato-testicular, para lo cual no se tienen evidencias directas en investigaciones previas. Sin embargo, se sabe que moléculas de 150 de PM pasan fácilmente a través de dicha barrera y que ésta presenta una permeabilidad similar a la barrera de las glándulas mamarias, de la hemato-cerebral y del humor acuoso (Ratcliffe y col., 1993).

Algunos investigadores han utilizado una gran variedad de compuestos como posibles espermatotóxicos en estudios *in vivo*, comprobándose su efecto en la mayoría de ellos. Estas sustancias que llegan a los gametos y atraviesan la barrera hemato-testicular varían en sus pesos moleculares desde los 243 Da - como la citarabina- hasta los 543 Da - como la adriamicina (Ratcliffe y col., 1993).

Como ya se mencionó, el CAF tiene un peso molecular de 323 Da, se afirma que pasa la barrera hematoencefálica, la barrera placentaria y el humor acuoso, que se le ha encontrado en leche y en bilis (Goodman y col., 1982). Estos datos sugieren que el CAF sí atraviesa la barrera hemato-testicular, debido a su peso molecular y a que, como se ha demostrado, pasa otras barreras fisiológicas con permeabilidad semejante.

Al estudiar diversos agentes tóxicos y sus efectos sobre la reproducción en machos, se han empleado conejos, ratas y ratones (Ratcliffe y col., 1993). Para los fines de este estudio se consideró que el más conveniente era el conejo doméstico, *Oryctolagus cuniculus*, debido a que la muestra de semen se obtiene con una técnica relativamente sencilla sin sacrificar al animal, permitiendo una continuidad del estudio en el mismo conejo, para observar los cambios de celulares espermáticas en las distintas fases de la espermatogénesis (Fig. 1) y/o el probable efecto acumulativo del fármaco. La espermatogénesis en esta especie, dura de 38 a 41 días según Alvariño, (1993) o 48 días según Sharpe (1994).

Este proceso comienza cuando una espermatogonia se divide en células, unas quedan en reserva para nuevos ciclos y otras evolucionan hasta células haploides. De 16 espermatocitos de primer orden se originan 49 espermátidas de las 64 que deberían formarse, lo que demuestra que en esta fase de reducción cromática existe una pérdida espermática del 25 % (Garner y Hafez, 1984).

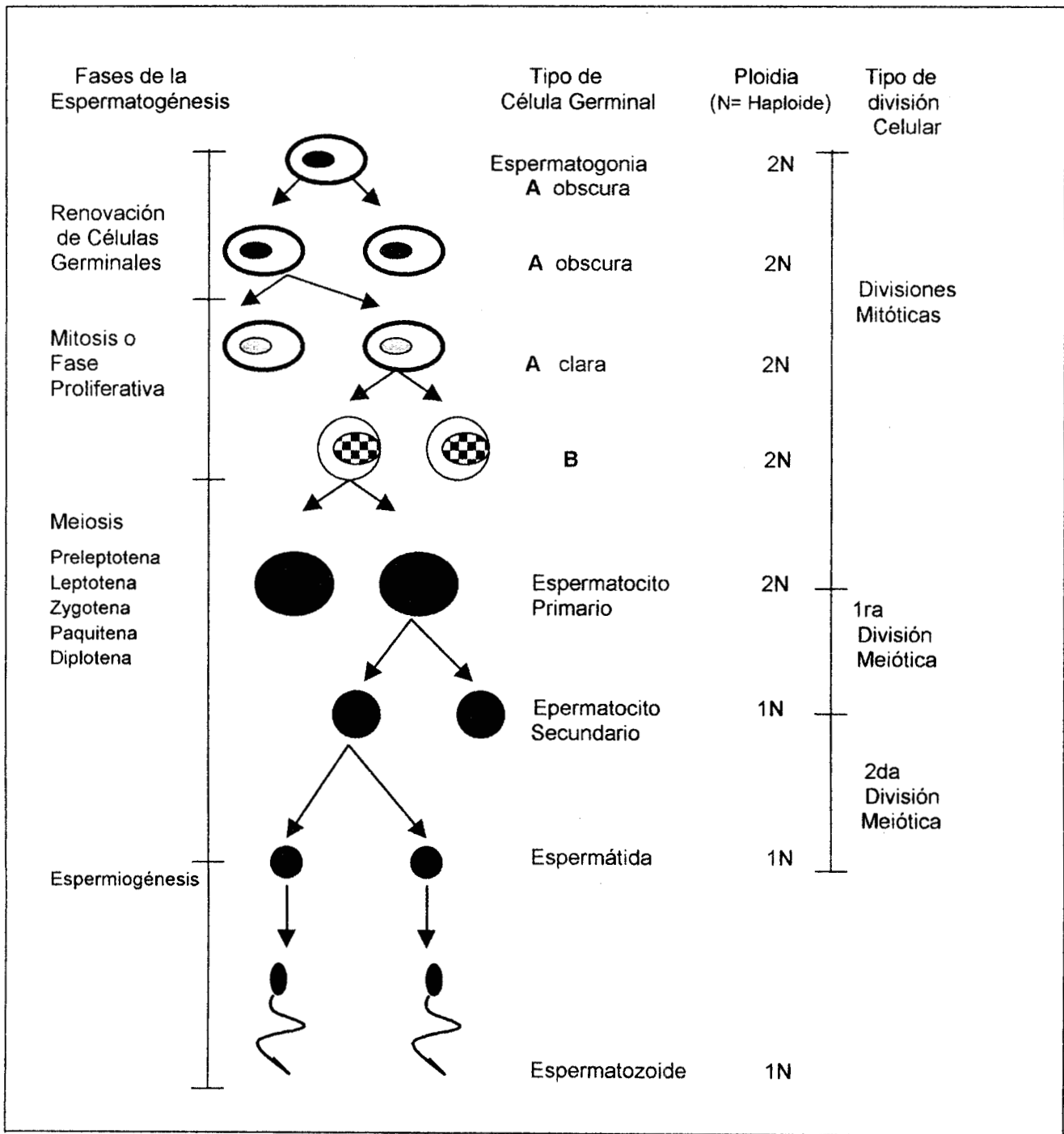


Figura 1. Esquema de la espermatogénesis. Tomado de Matsumoto A.M. 1996.

Ya en el epidídimo (órgano de concentración y almacenamiento espermático), los espermatozoides sufren el proceso de maduración, durante el cual además de presentar cambios morfológicos como reducción acrosomal y eliminación de la gota citoplasmática, fisiológicamente adquieren motilidad y capacidad fecundante. El paso por el epidídimo dura de 8 a 10 días, dos en la cabeza, dos en el cuerpo y de 5 a 6 días en la cola. Como ya se señaló anteriormente, en el epidídimo se produce el almacenamiento de espermatozoides, donde las reservas totales se distribuyen de la manera siguiente: cabeza y cuerpo 14%, cola 80% y, extraepididimariamente, 6% en el conducto deferente.

II. JUSTIFICACION

En México, a diferencia de países desarrollados, el CAF aún tiene gran demanda, prescribiéndose ampliamente sin control a pesar de sus efectos hematotóxicos, mutagénicos y carcinogénicos. Lo anterior obedece, por un lado, a que se puede adquirir sin receta médica y por otro, a que es antibiótico de elección para enfermedades específicas y de alta frecuencia en nuestro país como tifoidea e infecciones respiratorias.

Es probable que los efectos del CAF observados en células somáticas y en ovocitos ocurran en los gametos masculinos, por lo que es de suma importancia comprobar el efecto de este antibiótico en la diferenciación y morfofisiología espermática.

III. HIPOTESIS

Con base en el conocimiento de que el CAF inhibe la síntesis proteínas, se espera que los espermatozoides de conejo expuestos a este fármaco durante su desarrollo, presenten alteraciones en su fisiología y morfología.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Determinar *in vivo* la espermatotoxicidad del CAF en el conejo doméstico.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Detectar si existe relación entre las dosis del CAF ingeridas por los conejos y las características de los espermatozoides en cuanto a: densidad, viabilidad, velocidad y tipo de desplazamiento, morfología y reacción acrosomal.
2. Determinar la existencia del efecto espermatotóxico acumulativo del CAF.

V. MATERIAL Y METODOS

Fármaco

Cloranfenicol levógiro micromizado (Pharmacia & Upjohn - México)

Animales y Tratamiento

Durante el estudio se emplearon doce conejos domésticos (*Oryctolagus cuniculus*) Nueva Zelanda Blancos, potencialmente fértiles de 8 meses de edad promedio \pm D.E. 1.3, y con un peso de 3 a 4 kg, Todos fueron aclimatados y adiestrados durante 3 meses previos al estudio en el bioterio, mantenidos a una temperatura de 22°C y de 60-70 % de humedad relativa. Se alimentaron con pastillas (Conejina E.F. de Purina) y agua *ad libitum*.

Se utilizaron tres dosis de CAF base además del grupo control, empleándose tres conejos en cada tratamiento. El antibiótico se administró por vía oral disuelto en la ración diaria de agua durante 15 días. De acuerdo al agua ingerida por los conejos, las dosis diarias administradas fueron: 0 (control), 29 (baja), 112 (media) y 145 (alta) mg/kg de peso.

Las muestras de semen se obtuvieron a través de una vagina artificial 7 días antes de la administración del fármaco, 1 y 7 días después de iniciado el tratamiento y cada dos semanas hasta completar 11 (día 21, 35, 49, 63 y 77), para cubrir todas las etapas de la espermatogénesis. La muestra se trasladó a temperatura ambiente al laboratorio, donde se mantuvo en una incubadora (Lab-Line Instruments, Inc.) en atmósfera de CO₂ al 5% y temperatura de 37°C. Los conejos se mantuvieron sexualmente activos por medio de colección de semen una vez a la semana.

De la muestra de semen de cada conejo, se tomaron 23 μ l para las pruebas de motilidad inicial, densidad, viabilidad, morfología (parámetros microscópicos), velocidad y tipo de desplazamiento (parámetros computarizados). El resto de la

muestra, más del 90% del volumen, se utilizó para llevar a cabo la capacitación espermática y la reacción acrosomal.

Volumen

Antes que cualquier otro parámetro se midió el volumen de la muestra de semen en tubos graduados.

Motilidad inicial

Se colocaron 3 μ l en un portaobjetos para observar la muestra al microscopio óptico. En este caso se anotó la proporción aproximada de espermatozoides móviles (0%- 100%).

Densidad

En un tubo eppendorf que contenía 495 μ l de ácido acético al 2%, se depositó 5 μ l de semen (dilución 1:100). De esta mezcla, perfectamente homogénea, se colocaron 10 μ l en una cámara Neubauer para el conteo de espermatozoides.

Viabilidad y Morfología

En un portaobjetos se depositaron 10 μ l de eosina Y (Merck) al 1% (Adelman y Cahill, 1989) y 5 μ l de semen, se mezclaron y se colocó un cubreobjetos. Bajo el microscopio óptico, durante los primeros 15 min se evaluó la viabilidad y durante los 15 min siguientes la morfología. En ambos casos se contaron 100 células.

Velocidad y Tipo de desplazamiento

La muestra se depositó en un tubo eppendorf con 100 μ l de medio Brackett descrito por Brackett y Oliphant (1975) y modificado por Rebeca García (comunicación personal) (ver Anexo). Se incubó durante 2 horas, se homogeneizó y se colocaron 5 μ l en la cámara Makler la cual se introdujo en el Analizador Hamilton Thorn Motility que contiene el programa IVOS-10 (Integrated Visualizing Optical System).

Con este equipo y el programa correspondiente se evaluó la velocidad curvilínea (VCL) - distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de todos los puntos registrados en la unidad de tiempo ($\mu\text{m/s}$), la velocidad lineal (VSL) - velocidad medida en línea recta entre el primer y el último punto registrado, la velocidad de trayectoria promedio (VAP) - velocidad de trayectoria ajustada con base a la original, la frecuencia de cruce de batimiento (BCF) - frecuencia con que la cabeza cruza la trayectoria ajustada del espermatozoide, amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) - distancia que existe entre la trayectoria original y la ajustada, linealidad (LIN) - relación entre VSL/VCL que indica la trayectoria recta en particular del espermatozoide y elongación - valor que está en relación con la forma de la cabeza del espermatozoide.

Capacitación espermática

Se lavó la muestra (Bonilla y col., 1996) y se colocó en un tubo de centrifuga, agregando de 4 a 5 ml de medio Brackett modificado (MBM) a 37°C , se resuspendió suavemente con una pipeta Pasteur y se centrifugó a 650 g durante 10 min. Se retiró el sobrenadante que contenía el plasma seminal y se agregaron 3 ml de MBM, se resuspendió y centrifugó nuevamente a 650 g durante 10 min. El sobrenadante fue retirado y el paquete celular se llevó a 1 ml con MBM, se resuspendió y se pasaron $20\ \mu\text{l}$ a un tubo eppendorf con $380\ \mu\text{l}$ de Ac. acético al 2% (dilución 1:20). De esta mezcla se pasaron $10\ \mu\text{l}$ a la cámara Neubauer para el conteo y ajuste de 15×10^6 espermatozoides, llevándolos posteriormente a un volumen final de $500\ \mu\text{l}$ de MBM por pozo, e incubándolos a 37°C durante 6 h, metodología adaptada de Bonilla y col. (1994).

Para cada muestra de semen se prepararon dos pozos, el primero, para evaluar la reacción acrosomal espontánea y el segundo, para la reacción acrosomal inducida. Se usaron dos cajas de plástico Nunc (Nuncion, Dinamarca) de 4 pozos por ensayo. Todo los medios, reactivos y materiales que estuvieron en contacto con los espermatozoides, se encontraban a 37°C .

Evaluación de la reacción acrosomal con la tinción doble (Hoechst-Lectina fluorescente)

Concluido el tiempo de la capacitación espermática, se pudo continuar con la evaluación del porcentaje de espermatozoides que llevaron a cabo la reacción acrosomal (Berger, 1990).

Para evaluar la reacción acrosomal, la muestra de semen se dividió en dos fracciones. A la primera se le agregaron 10 μ l de una solución de progesterona (Sigma) (500 μ g/ml) como inductor, teniendo una concentración final en el pozo de 10 μ g/ml y se incubó a 37°C durante 30 min. La segunda se dejó sin progesterona para evaluar la reacción acrosomal espontánea. A las dos porciones se les agregaron 5 μ l de una solución de Hoechst 33258 (Sigma) (100 μ g/ml) para tener una concentración final de 1 μ g/ml y se incubaron 8 min a 37°C (a partir de este momento y hasta finalizar la técnica, cada paso se realizó en penumbra). Después de resuspender, se centrifugaron 80 μ l de la solución de espermatozoides a 550 g durante 10 min. en 200 μ l de polivinilpirrolidona-40 (PVP-40) (Sigma) al 2% en PBS. Se recortó el tubo por encima del paquete celular, para asegurar la eliminación del Hoechst y de la PVP-40. Los espermatozoides se fijaron con 50 μ l de etanol frío, se resuspendieron suavemente y se dejaron reposar algunos minutos, posteriormente se hizo el frotis en un portaobjetos. Después que la preparación se secó, se colocaron 20 μ l de lectina de chícharo conjugada con isotiocianato de fluoresceína (PSA-FITC) (Sigma) (200 μ g/ml en PBS) sobre el portaobjetos y se colocó un cubreobjetos, incubando a 37°C durante 15 min en una atmósfera húmeda. Se removió el cubreobjetos y el exceso de lectina lavando con agua destilada.

Se dejaron secar las preparaciones a 37°C. Se colocó una gota de glicerol al 90% sobre el portaobjetos y encima de ésta un cubreobjetos. A continuación se evaluó la viabilidad de los espermatozoides en un microscopio de fluorescencia (Zeiss) a una longitud de onda de 360 nm, seguida de la evaluación de la reacción acrosomal espontánea e

inducida de los espermatozoides vivos del mismo campo, a una longitud de onda de 495 nm. Las observaciones se realizaron a 400 aumentos y en cada preparación se analizaron 100 espermatozoides.

Análisis estadístico

En conjunto, se compararon los cuatro grupos de estudio (control y concentraciones de CAF) en todos los parámetros, analizados por medio de la prueba de Kruskal-Wallis. Aquellos que dieron diferencia estadísticamente significativas fueron entonces contrastados las tres dosis del CAF con el control, para determinar con cual presentaba diferencia. El límite de confianza fue de $p \leq 0.05$.

En los casos en que hubo duda de diferencias entre los datos antes de cualquier tratamiento con CAF (tiempo 0), se compararon entre sí por medio de la prueba de U de Mann-Whitney, con una $p \leq 0.05$ para descartar diferencias.

El diseño experimental (Fig. 2) se presenta para considerar la idea global y condensada del método a seguir en este estudio, las técnicas utilizadas y los parámetros evaluados.

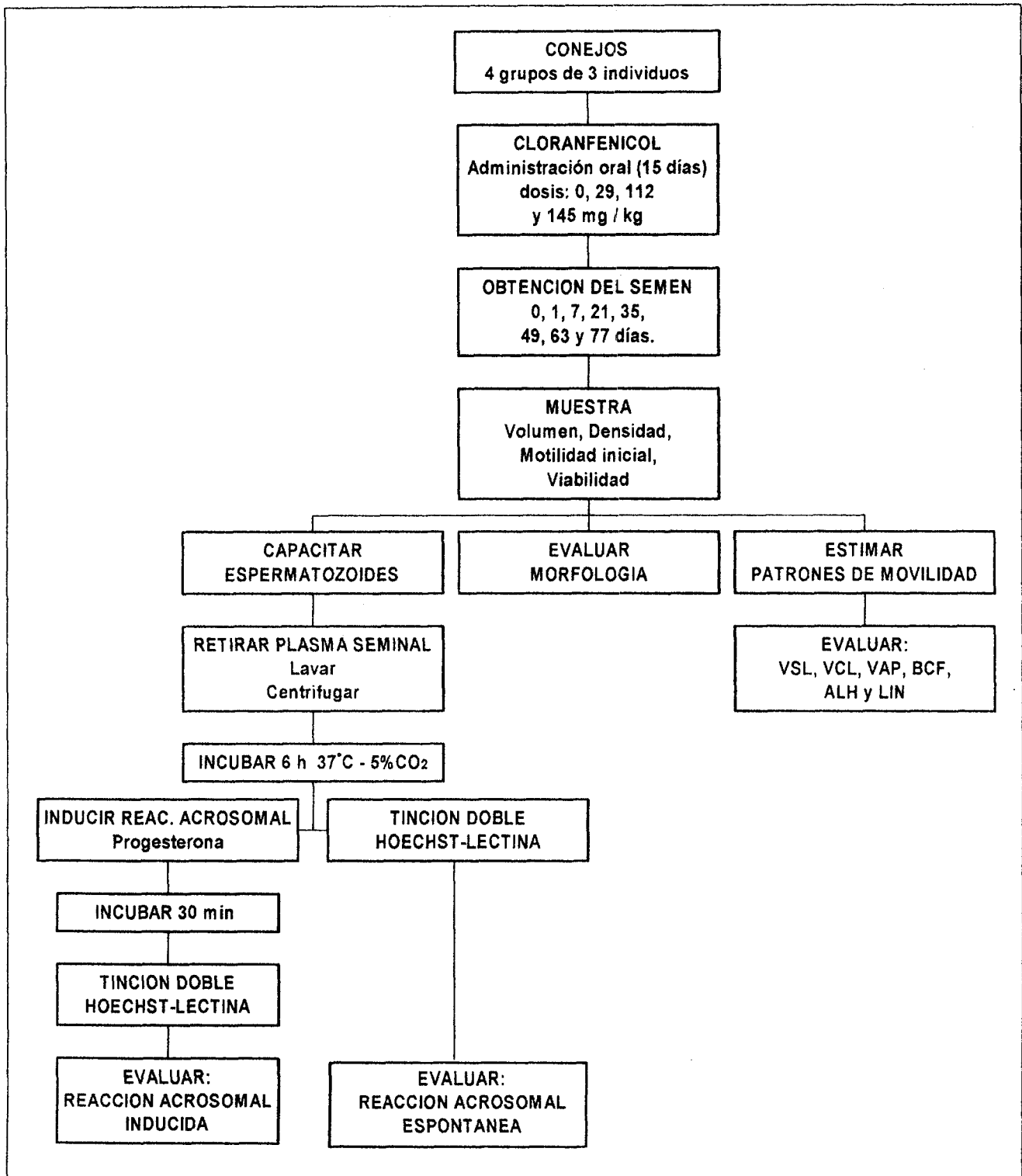


Figura 2. Diseño Experimental

VI. RESULTADOS

Tratamiento

Existió un efecto de la palatabilidad del agua con el CAF, por lo cual su ingestión fue variable en conejos de distintos tratamientos, pero homogénea en cada animal durante los 15 días de dosificación del antibiótico. Las dosis promedio administradas por día fueron: 29, 112 y 145 mg/kg (Cuadro 1).

Cuadro 1. CAF administrado por conejo (mg/kg) durante 15 días. La administración diaria promedio de la dosis baja fue de 29 mg/kg, de la dosis media 112 mg/kg y de la dosis alta 145 mg/kg. La administración total promedio fue para cada dosis 430, 1685 y 2185 mg/kg, respectivamente.

días	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	\bar{X}	D.E.
conejo																	
3	29	22	22	25	25	23	23	25	25	25	25	39	33	25	25	26	4
4	25	25	25	25	25	25	25	25	50	39	25	25	25	25	49	29	9
10	26	22	22	30	30	30	28	28	24	24	40	40	40	40	40	31	7
																29	
5	136	101	101	105	105	102	102	125	125	125	125	125	125	153	133	119	16
8	105	105	60	43	ND	ND	82	82	94	94	157	157	154	154	192	114	45
11	112	110	110	105	99	99	105	105	113	113	115	99	99	90	90	104	8
																112	
6	125	125	125	125	125	125	125	125	204	174	125	125	125	125	230	141	34
7	192	226	226	119	119	128	173	174	174	154	154	160	160	162	105	162	36
12	150	138	138	83	64	64	139	139	145	145	160	160	160	160	160	134	34
																145	

ND = No Determinado

Los 12 conejos se clasificaron por números aleatorios en cuatro grupos: control (0 mg/kg), dosis baja (29 mg/kg), dosis media (112 mg/kg) y dosis alta (145 mg/kg).

Antes, durante y después del tratamiento, a todos los conejos se les evaluó su estado de salud, así como la consistencia de sus excretas, debido a la evidencia de que en algunos animales y en el hombre (Goodman y col., 1982; Sumano y Ocampo, 1988) provoca náuseas, vómito y diarrea.

En ningún momento hubo señales de deterioro físico de los animales, ni rastro alguno de vómito y diarrea. En cuanto al peso corporal durante todo el estudio, la variación fue entre 0.1 y 0.8 kg en 11 conejos y uno tuvo aumento de 0.12 kg (Cuadro 2). Con respecto al comportamiento del peso por grupo al finalizar el tratamiento de 15 días, fue variable; tanto en el grupo control como en el de dosis baja hubo un conejo que mantuvo su peso, uno con ganancia de 0.1 kg y otro con 0.2 kg, que no son significativos. En el grupo de dosis alta, un conejo mantuvo su peso y otro ganó 0.2 kg, mientras que el tercero perdió 0.1 kg. El grupo de dosis media fue el más heterogéneo, con un conejo de 0.4 kg de ganancia y los otros dos con pérdida de 0.1 y 0.3 kg. Por la dispersión de los datos y los pocos kilogramos de pérdida o ganancia en los grupos, no es posible atribuir estas variaciones al CAF.

Cuadro 2. Grupo al que pertenecen y peso corporal (kg) de los conejos durante el estudio. Se aprecia que no hubo diferencia significativa en la variación del peso, por tiempo del tratamiento, ni por efecto de la concentración del CAF.

GRUPO	CONEJO	ANTES T	MITAD T	FIN T	D T* ¹	FIN E* ²
Control	1	3.4	3.4	3.5	3.6	3.7
	2	3.6	3.5	3.6	3.8	4.0
	9	3.5	3.6	3.7	3.8	4.0
Dosis baja	3	3.5	3.5	3.6	3.6	3.8
	4	4.0	4.0	4.0	4.3	4.6
	10	3.0	3.1	3.2	3.3	3.4
media	5	3.7	3.7	4.1	4.0	4.5
	8	3.8	3.6	3.5	3.8	4.2
	11	3.6	3.5	3.5	3.6	3.7
alta	6	3.6	3.8	3.8	4.0	4.4
	7	3.7	3.5	3.6	3.8	4.0
	12	3.1	3.1	3.1	3.2	3.3

T = Tratamiento; D = Después; E = Estudio

*1 > cuatro semanas después

*2 > diez semanas después

222860

Motilidad inicial

Para poder evaluar los demás parámetros de la muestra, fue condición que ésta no presentara una motilidad inicial menor del 70%, hecho que no ocurrió ya que todas las muestras estuvieron entre el 75 y 95%.

Volumen de semen y Densidad esperamática

A continuación se presentan los datos, por intervalos y promedio, del volumen (Cuadro 3) y densidad por ml (Cuadro 4) de semen eyaculado por conejo durante todo el estudio.

Cuadro 3. Volumen de semen eyaculado por conejo durante el estudio, por intervalos y promedio.

GRUPO	CONEJO	VOLUMEN (ml)		
		INTERVALO	$\bar{X} \pm D.E. I$	$\bar{X} \pm D.E. II$
Control	1	0.25 - 0.5	0.34±0.11	0.47 + 0.21
	2	0.30 - 0.6	0.41±0.11	
	9	0.25 - 1.0	0.66±0.24	
Dosis baja	3	0.25 - 0.75	0.41±0.17	0.48 + 0.18
	4	0.25 - 0.8	0.49±0.22	
	10	0.40 - 0.75	0.52±0.14	
media	5	0.40 - 1.0	0.66±0.19	0.62 + 0.19
	8	0.30 - 0.9	0.57±0.21	
	11	0.40 - 1.0	0.62±0.19	
alta	6	0.30 - 0.7	0.49±0.15	0.47 + 0.19
	7	0.30 - 0.6	0.41±0.11	
	12	0.25 - 1.0	0.51±0.27	

N = 8 eyaculados

$\bar{X} I$ = Promedio por conejo; $\bar{X} II$ = Promedio por tratamiento

Cuadro 4. Densidad espermática/ml (δ) por conejo durante el estudio, por intervalos y promedio.

GRUPO	CONEJO	δ (millones / ml)		
		INTERVALO	$\bar{X} \pm D.E. I$	$\bar{X} \pm D.E. II$
Control	1	295 - 840	586+166	526 + 220
	2	295 - 645	428+144	
	9	165 - 1055	564+307	
Dosis baja	3	84 - 770	390+230	418 + 270
	4	60 - 1115	584+351	
	10	92 - 520	301+159	
media	5	480 - 1120	874+204	852 + 476
	8	390 - 2620	1102+725	
	11	295 - 775	581+148	
alta	6	375 - 970	688+177	484 + 236
	7	425 - 615	557+59	
	12	70 - 310	207+88	

N = 8 eyaculados

$\bar{X} I$ = Promedio por conejo; $\bar{X} II$ = Promedio por tratamiento

Aunque se aprecia numéricamente distintos valores para volumen y densidad en la dosis media, estadísticamente no hay diferencia significativa para ambos parámetros.

De los indicadores microscópicos, la viabilidad y la morfología presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre el control y el grupo de dosis media, mientras que la RAE y RAI, únicamente mostraron tendencia a incrementar el porcentaje de espermatozoides reaccionados de conejos del grupo de dosis media. En cuanto a los computarizados, se encontraron diferencias significativas en todas las dosis con respecto al control ($p \leq 0.05$) en BCF y LIN. Los análisis de éstos parámetros se presentan a continuación.

Viabilidad

Como se aprecia en la figura 3, en la mayoría de los ensayos la viabilidad fue mayor en el control que en los grupos experimentales. Aunque la dosis media representó el caso extremo, ésta y la dosis baja mostraron un comportamiento similar; descendiendo la viabilidad para el día 7, alcanzando los valores más bajos el día 21, recuperándose hacia los días 35, 49 y 63 para posteriormente volver a disminuir hacia el 77. Los datos de la dosis alta se comportaron de manera irregular y distinta a las otras dosis, sin embargo, estuvieron por debajo del control, a excepción del día 21.

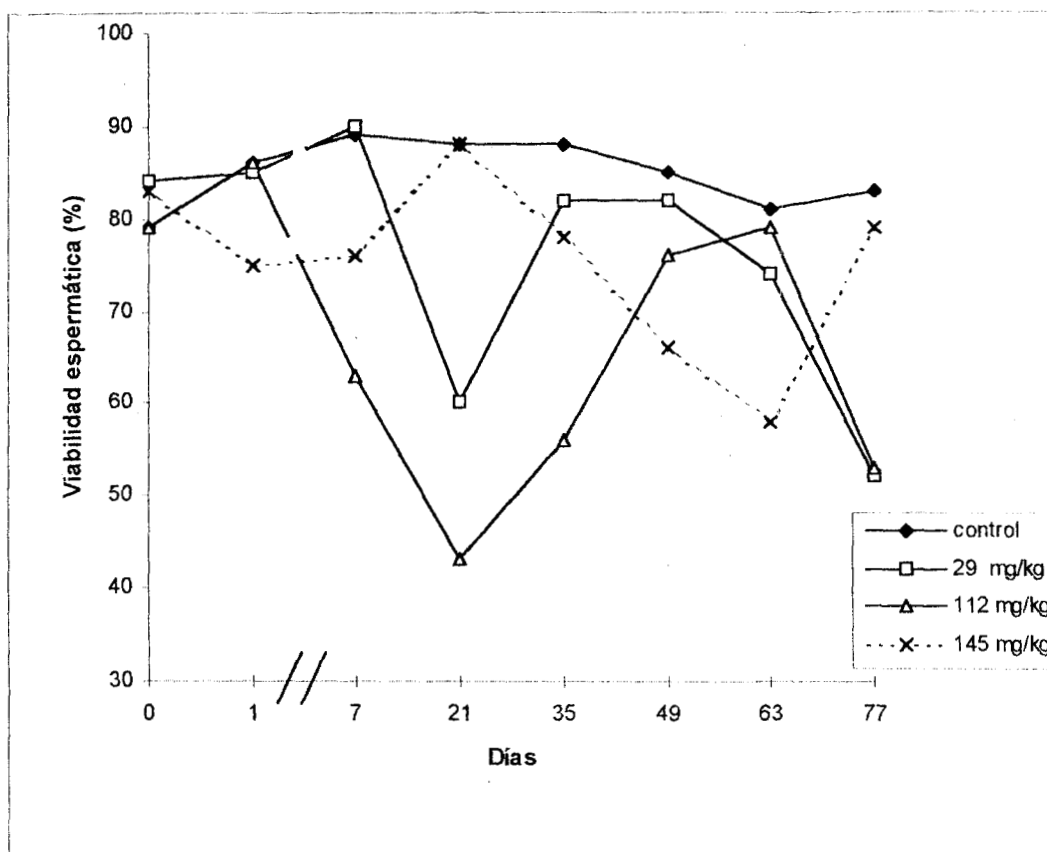


Figura 3. Efecto del CAF sobre la viabilidad de espermatozoides eyaculados de conejos en 8 ensayos, durante y después de la ingestión de tres distintas dosis, en un periodo de 15 días. Cada punto representa la mediana de tres conejos. En las tres dosis de CAF se encontró diferencia estadísticamente significativa con una $p < 0.05$ con respecto al control, por medio de la prueba de Kruskal-Wallis. En el tiempo 0, antes de cualquier tratamiento con CAF, las muestras de los conejos no mostraron diferencias con una $p > 0.05$ a través de la prueba de U de Mann-Whitney.

222860

Morfología

Se consideraron como anormales aquellos espermatozoides con alteraciones en cabeza, parte media y flagelo. En cuanto a cabezas anormales observadas se pueden mencionar los macro, micro y bicéfalos; en parte media, principalmente se detectaron con curvatura entre su parte terminal y comienzo del flagelo, y de éste último se observaron algunos enrollados y biflagelados.

En el porcentaje de morfología normal (Fig. 4), sólo la dosis media mostró diferencia estadísticamente significativa con respecto al control, apreciándose un decremento a partir del día 21 hasta el 49, recuperándose para los días 63 y 77.

Para detectar cual de las tres partes - cabeza, parte media o flagelo - presentan mayor número de anomalías, se graficaron sus valores por separado. Para cabeza y flagelo (Figuras 6 y 7) los datos permanecen sin grandes variaciones durante el estudio, mientras que las anomalías de la parte media (Fig. 5) aumentan significativamente hacia el día 49 en el grupo de dosis de media. Por tanto, las anomalías de la parte media son responsables del decremento de la morfología normal espermática.

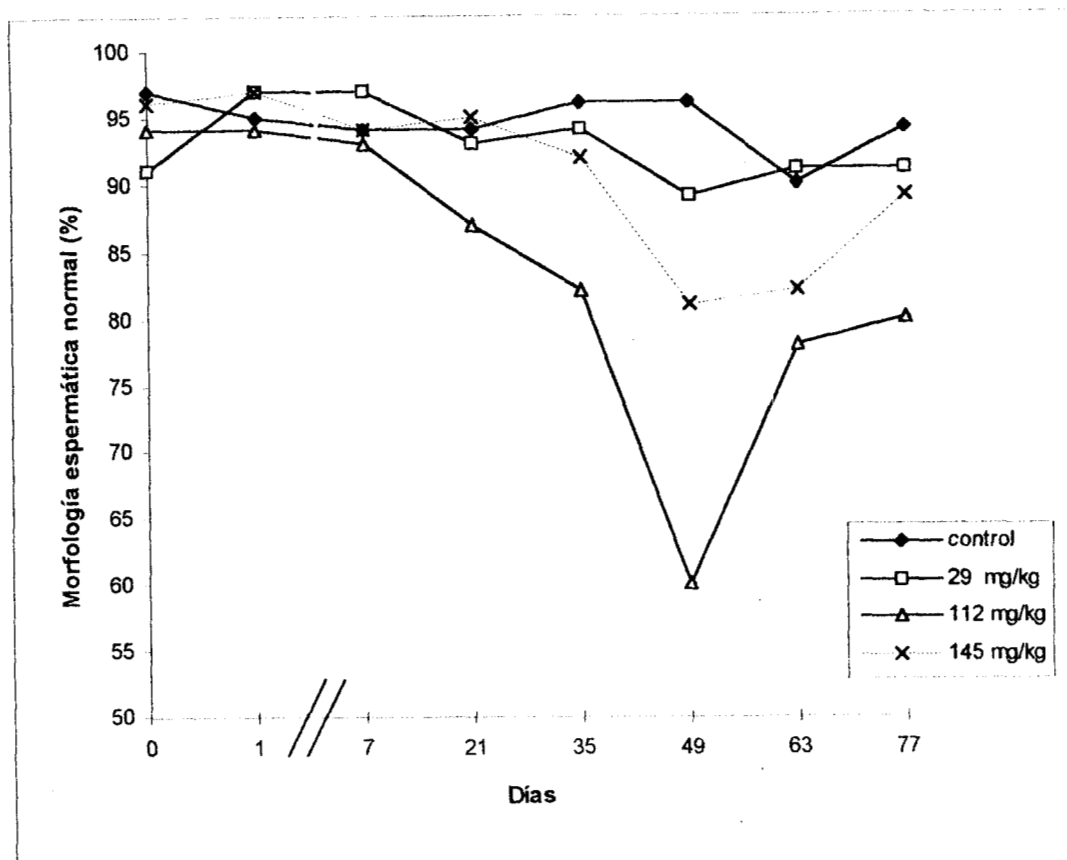


Figura 4. Efecto del CAF sobre la morfología normal de espermatozoides eyaculados de conejos en 8 ensayos, durante y después de la ingestión de tres distintas dosis, en un periodo de 15 días. Cada punto representa la mediana de tres conejos. De las tres dosis de CAF sólo se encontró que la de 112 mg/kg presenta diferencia estadísticamente significativa con una $p < 0.05$ con el control, por medio de la prueba de Kruskal-Wallis. En el tiempo 0, antes de cualquier tratamiento con CAF, las muestras de los conejos no mostraron diferencias con una $p > 0.05$ a través de la prueba de U de Mann-Whitney.

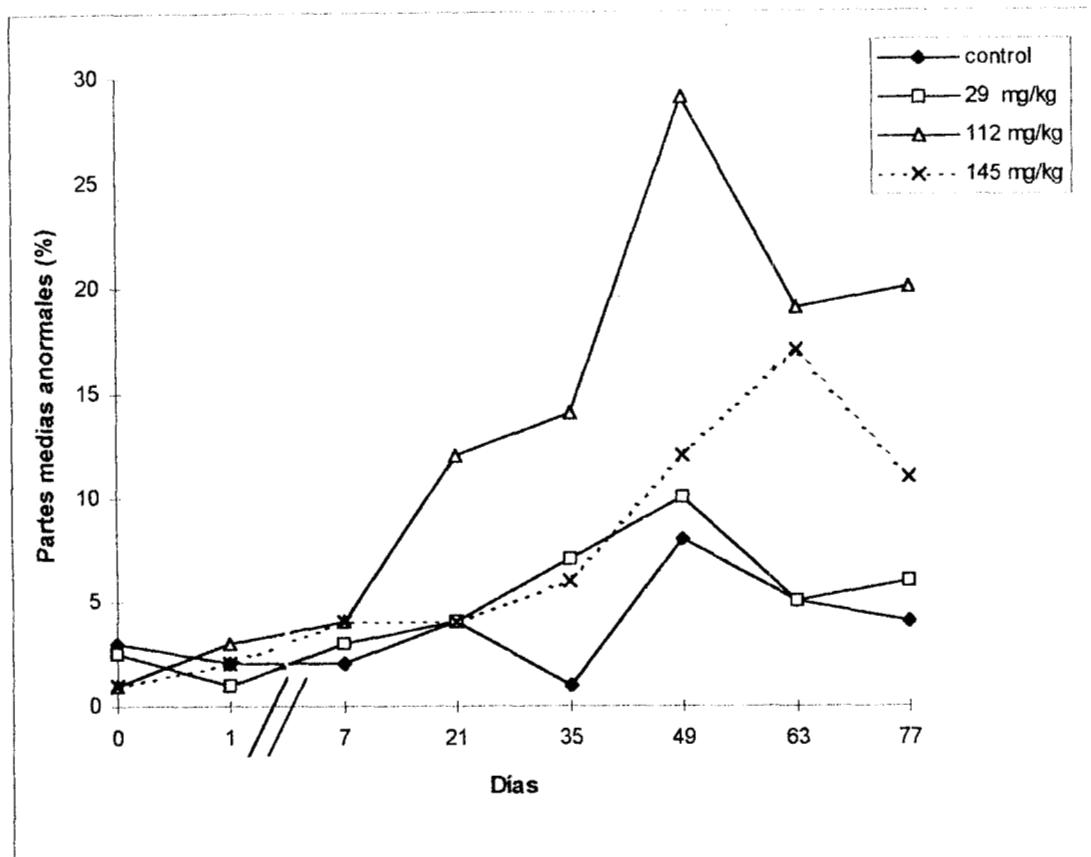


Figura 5. Efecto del CAF sobre anomalías en las partes medias de espermatozoides eyaculados de conejos en 8 ensayos, durante y después de la ingestión de tres distintas dosis, en un periodo de 15 días. Cada punto representa la mediana de tres conejos. De las tres dosis de CAF sólo se encontró que la de 112 mg/kg presenta diferencia estadísticamente significativa con una $p < 0.05$ con respecto al control, por medio de la prueba de Kruskal-Wallis. En el tiempo 0, antes de cualquier tratamiento con CAF, las muestras de semen no mostraron diferencias con una $p > 0.05$ a través de la prueba de U de Mann-Whitney.

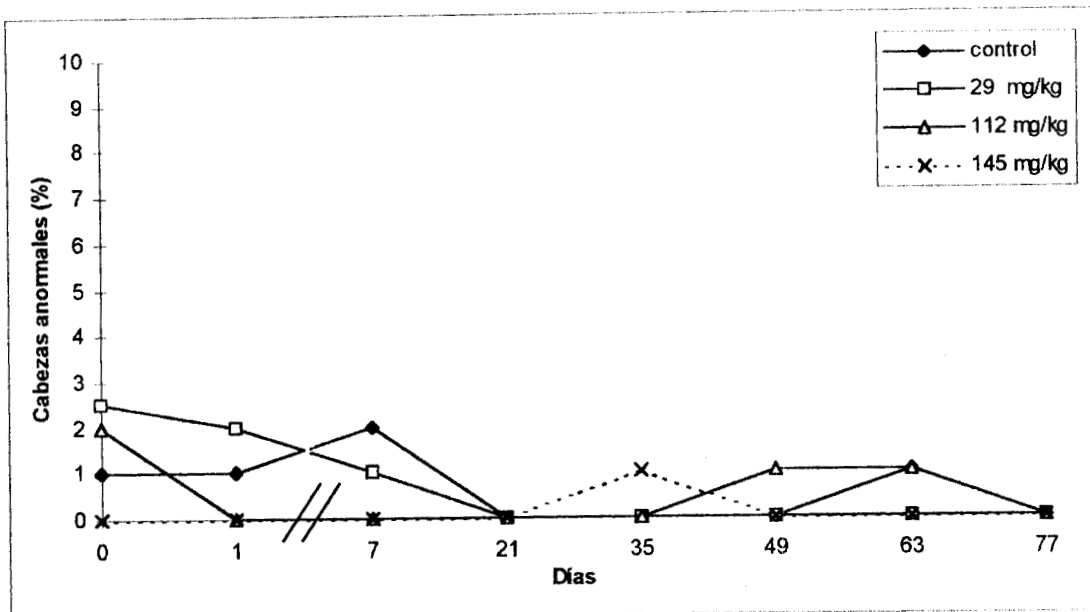


Figura 6. Efecto del CAF sobre anomalías en cabezas de espermatozoides eyaculados de conejos en 8 ensayos, durante y después de la ingestión de tres distintas dosis, en un periodo de 15 días. Cada punto representa la mediana de tres conejos.

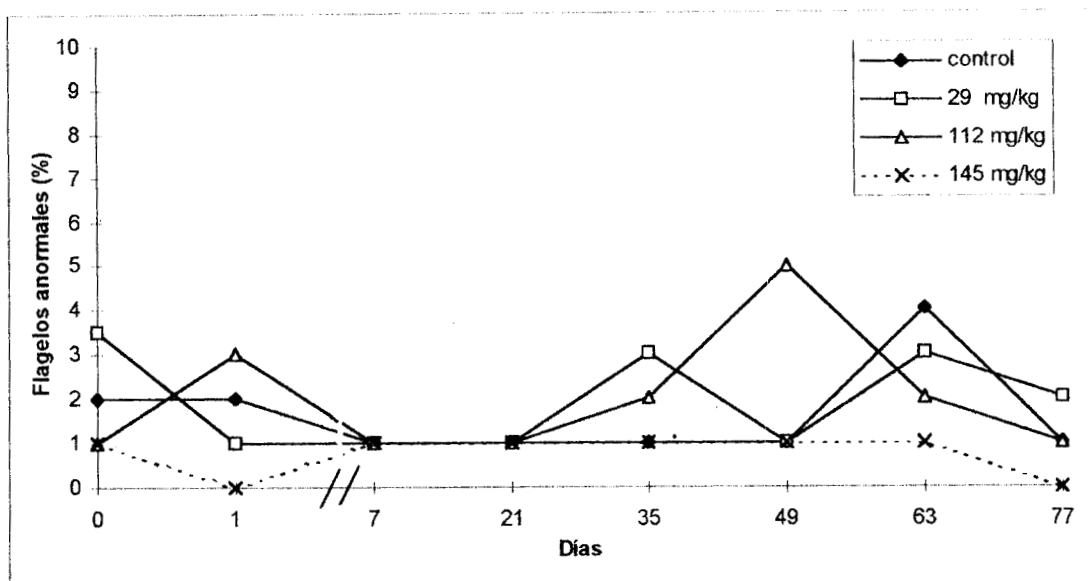


Figura 7. Efecto del CAF sobre anomalías en flagelos de espermatozoides eyaculados de conejos en 8 ensayos, durante y después de la ingestión de tres distintas dosis, en un periodo de 15 días. Cada punto representa la mediana de tres conejos.

En las figuras 8 y 9 se presentan las gráficas de la RAE y RAI, y a pesar de que no mostraron diferencias estadísticamente significativas dada la dispersión de los datos, es posible adjudicarle al CAF las tendencias observadas. En ambos casos hay un aumento considerable en el porcentaje de espermatozoides reaccionados para el día 21 en la dosis media.

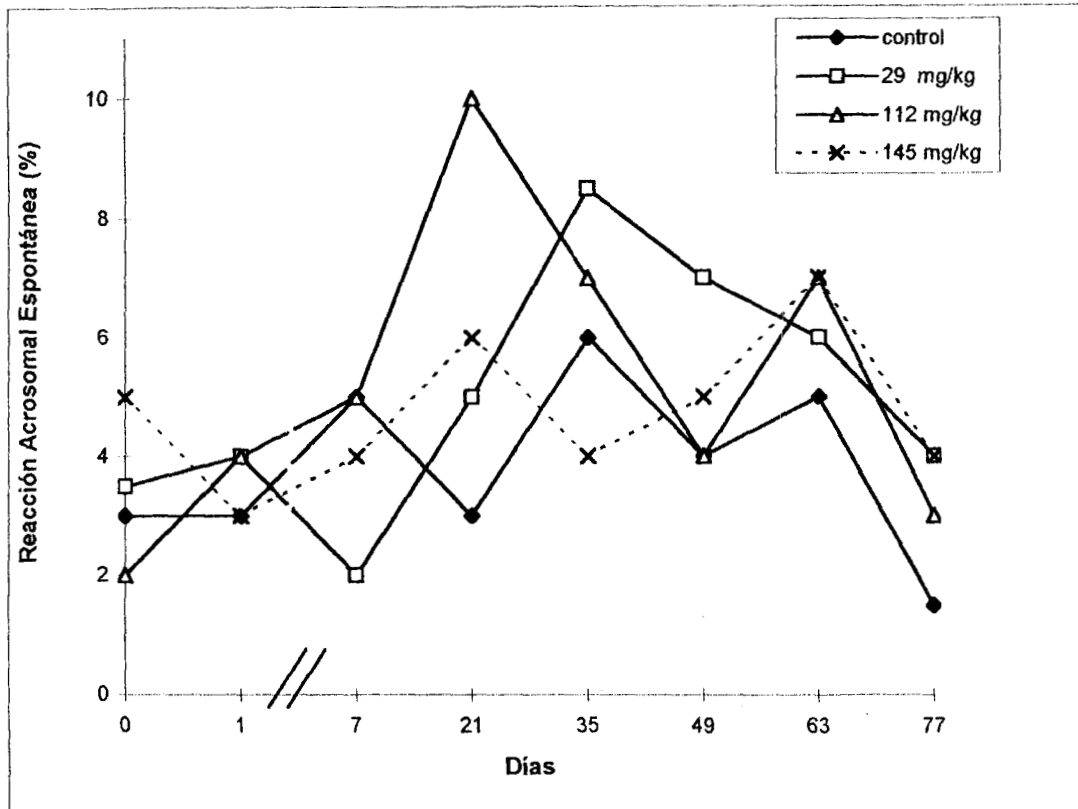


Figura 8. Efecto del CAF sobre la reacción acrosomal espontánea de espermatozoides eyaculados de conejos en 8 ensayos, durante y después de la ingestión de tres distintas dosis, en un periodo de 15 días. Cada punto representa la mediana de tres conejos. En el tiempo 0, antes de cualquier tratamiento con CAF, las muestras no mostraron diferencias con una $p > 0.05$ a través de la prueba de U de Mann-Whitney.

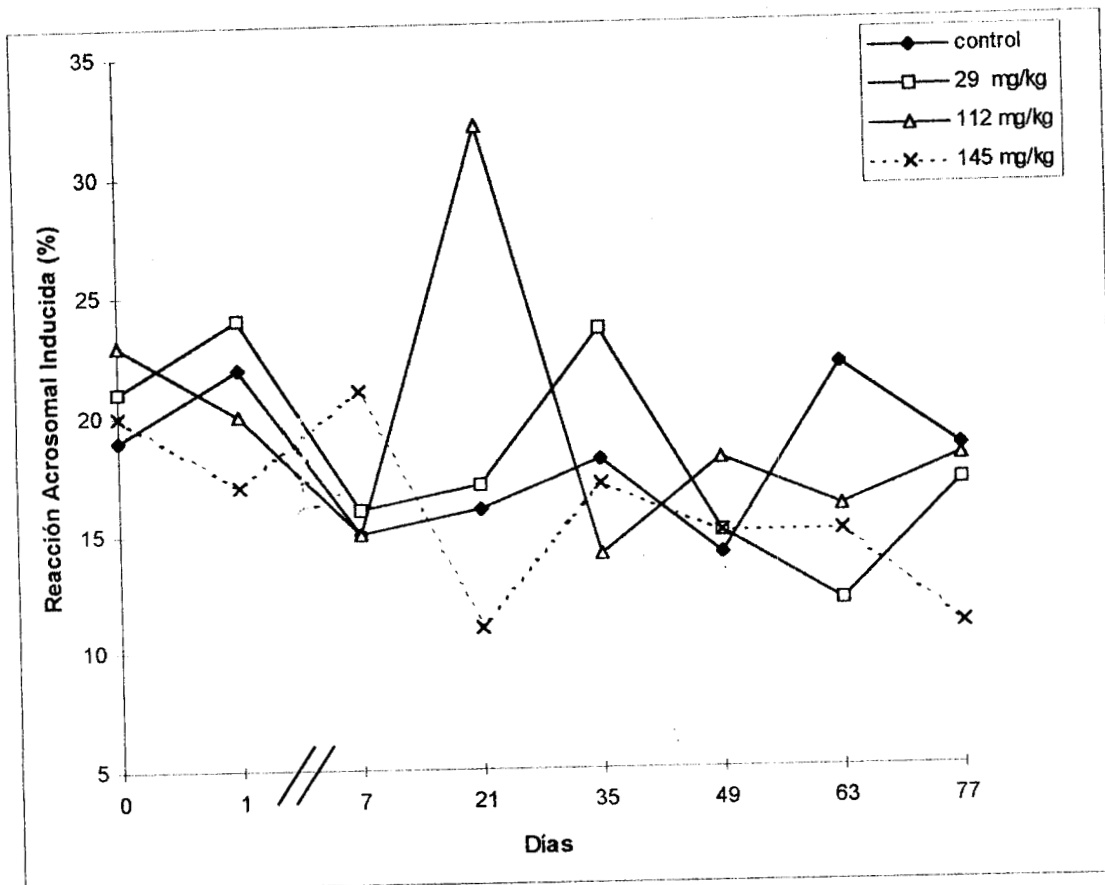


Figura 9. Efecto del CAF sobre la reacción acrosomal inducida de espermatozoides eyaculados de conejos en 8 ensayos, durante y después de la ingestión de tres distintas dosis, en un periodo de 15 días. Cada punto representa la mediana de tres conejos. En el tiempo 0, antes de cualquier tratamiento con CAF, las muestras no mostraron diferencias con una $p > 0.05$ a través de la prueba de U de Mann-Whitney.

En la figura 10 se observan las frecuencias de cruce de batimiento de los espermatozoides (BCF) de todos los grupos, en cada uno de los ensayos. Lo que se observa desde el inicio, es que los datos de los tratamientos con las distintas dosis del CAF se encuentran por debajo del control, así como también es evidente que cada grupo mantiene una diferencia con respecto a los otros, durante todo el estudio.

Al inicio del ensayo no se detectó variabilidad en la BCF entre grupos (prueba U de Mann-Whitney) y sí diferencia estadísticamente significativa (prueba Kruskal-Wallis), aunque no se puede relacionar ni con el tiempo ni con la dosis del CAF.

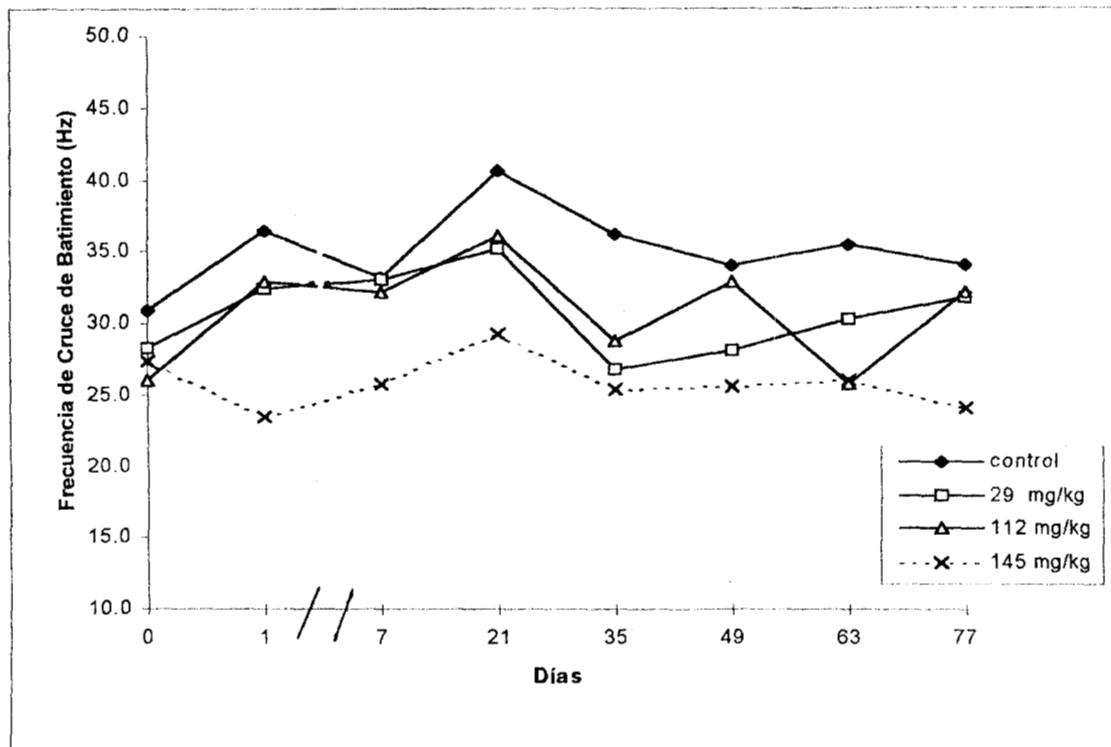


Figura 10. Efecto del CAF sobre la Frecuencia de cruce de batimiento (BCF) de espermatozoides eyaculados de conejos en 8 ensayos, durante y después de la ingestión de tres distintas dosis, en un periodo de 15 días. Cada punto representa la mediana de tres conejos. En las tres dosis de CAF se encontró diferencia estadísticamente significativa con una $p < 0.05$ con respecto al control, por medio de la prueba de Kruskal-Wallis. En el tiempo 0, antes de cualquier tratamiento con CAF, las muestras de los conejos no mostraron diferencias con una $p > 0.05$ a través de la prueba de U de Mann-Whitney.

Con respecto a la linealidad (Fig.11) existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos a lo largo del estudio, pero también se encontró variabilidad inicial con uno de los grupos experimentales (dosis alta), infiriéndose que las diferencias encontradas no son efecto del CAF sino producto de la variabilidad individual. Además, al igual que en la BCF no hay relación del posible efecto del CAF con alguna dosis o tiempo.

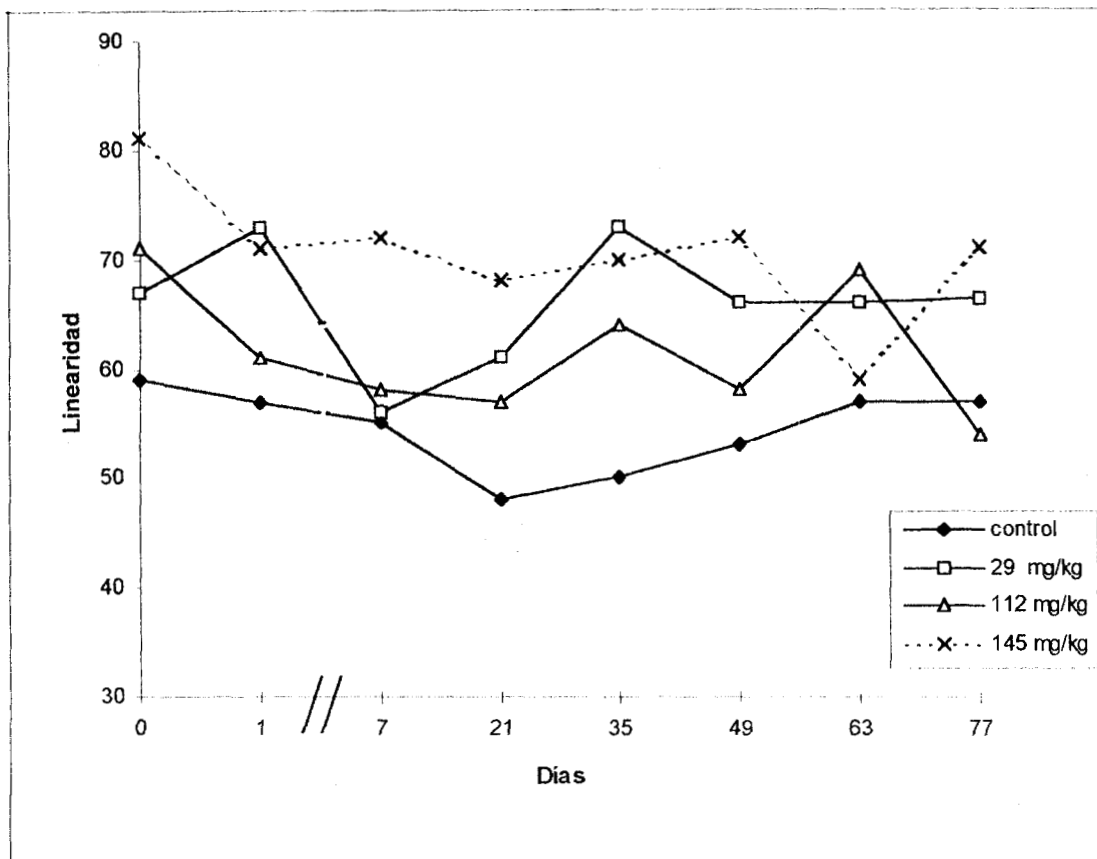


Figura 11. Efecto del CAF sobre la linealidad de espermatozoides eyaculados de conejos en 8 ensayos, durante y después de la ingestión de tres distintas dosis, en un periodo de 15 días. Cada punto representa la mediana de tres conejos. En las tres dosis de CAF se encontró diferencia estadísticamente significativa con una $p < 0.05$ con respecto al control, por medio de la prueba de Kruskal-Wallis. En el tiempo 0, antes de cualquier tratamiento con CAF, las muestras de los conejos no mostraron diferencias con una $p > 0.05$, excepto en la dosis de 145 mg/kg, bajo la prueba de U de Mann-Whitney.

Los parámetros VCL, VSL, VAP, y ALH no presentaron diferencias estadísticamente significativas.

VII. DISCUSION

La variedad de la ingesta del CAF fue dependiente del consumo de agua diaria de los conejos y esta varió de acuerdo al grupo. El control fue el más homogéneo y el menos, el grupo de dosis media, aunque en general el consumo de agua fue constante en todas las dosis. Jones (1982) especifica que la dosis terapéutica de CAF para especies pequeñas es de 25 a 50 mg/kg diarios, por lo que la dosis baja en este estudio corresponde a ésta, siendo las dosis media y alta 4 y 5 veces mayor a la terapéutica.

Ninguna dosis de CAF ingerida afectó la salud de los conejos, ya que no se observó ningún tipo de trastorno durante el tratamiento con las distintas dosis como se ha observado en otros animales: diarrea en terneras por administración intramuscular de 50 mg/kg diarios; en perros, inapetencia con 150 mg/kg dos tomas orales al día, y anorexia, desnutrición, pérdida de peso y mortalidad por ingestión de 253 mg/kg por día; disminución de ingesta de alimento y agua, y pérdida de peso en gatos con 50 mg/kg, cada 12 horas por vía oral (Jones, 1982; Humphreys, 1990).

Fue de suma importancia que ninguna muestra haya presentado un porcentaje de motilidad espermática inicial inferior al 75%, indicando en principio una buena y homogénea calidad de las muestras de semen antes de comenzar cada ensayo.

El volumen de semen de los conejos osciló entre 0.25 y 1 ml con un promedio de $0.51 \pm D.E. 0.20$ coincidiendo con Alvariño (1993) quien establece intervalos de 0.4 a 1ml con promedio de 0.97, y Solis (1996) de 0.3 a 0.8ml con promedio de 0.75. En la densidad hay discrepancia, ya que en este estudio se observaron valores de 60 a 1120×10^6 espermatozoides/ml (una excepcional de 2620), con un promedio de $572 \times 10^6 \pm D.E. 355$, mientras Alvariño (1993) encuentra densidades que van de 50 a 350×10^6 /ml, con un promedio 310, y Solis (1996) de 15 a 1000×10^6 de espermatozoides/ml con un promedio de 261.

De todos los indicadores evaluados, el volumen de semen y la densidad espermática fueron los que más variaron de eyaculado a eyaculado, de un tiempo a otro, y de conejo a conejo. Por tal motivo, las variaciones de sus datos no permiten relacionarlas con el CAF.

La manera de explicar los resultados en cuanto a la viabilidad, morfología y reacción acrosomal es relacionándolos con las etapas de diferenciación y desarrollo de los espermatozoides. La espermatogénesis es diferente en cada especie, tanto en duración total como duración del ciclo espermatogénico, tipo del ciclo (Fig. 12) y número de etapas que lo conforman. En el conejo, la espermatogénesis (Cuadro 5) consta de ocho etapas, es de tipo segmental, tiene una duración total de 48 días y su ciclo espermatogénico es de 10.3 días (tiempo que tarda una determinada célula, dentro del desarrollo a espermatozoide, en recorrer las ocho etapas, por ejemplo, es lo que tarda A_1 en llegar A_8 o R_1 a E_4) (Sharpe, 1994). Un dato que se debe resaltar es que la producción de espermatozoides se da de manera constante y en oleadas (Garner y Hafez, 1984) (Fig. 13).

Cuadro 5. Diversas etapas de diferenciación de un espermatozoide de conejo. Espermatogénesis adaptada de Sharpe R.M. 1994.

E T A P A S								DURACION						
I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII							
A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	10.3 días						
B ₁	B ₂	I P ₁ ₁	I P ₁ ₂	I L ₁	I L ₂	I Z ₁	I Z ₂	10.3 días						
I P ₁	I P ₂	I P ₃	I P ₄	I P ₅	I P ₆	I P ₇	II	10.3 días						
R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄	10.3 días						
T ₁	T ₂	T ₃						4.6 días						
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>Ep₁</td> <td>Ep₂</td> <td>Ep₃</td> <td>Ep₄</td> <td>Ep_{n...10}</td> <td>10 días</td> </tr> </table>								Ep ₁	Ep ₂	Ep ₃	Ep ₄	Ep _{n...10}	10 días	
Ep ₁	Ep ₂	Ep ₃	Ep ₄	Ep _{n...10}	10 días									

FASE
 P I = preleptotena
 L = leptotena
 Z = zigotena
 P = paquítena

CELULA GERMINAL
 A = espermatogonias o y c
 B = espermatogonias B
 I = espermatocito primario
 II = espermatocito secundario

R = espermátida redonda
 E = espermátida alargada
 T = espermátida testicular
 Ep = espermatozoide epididimario

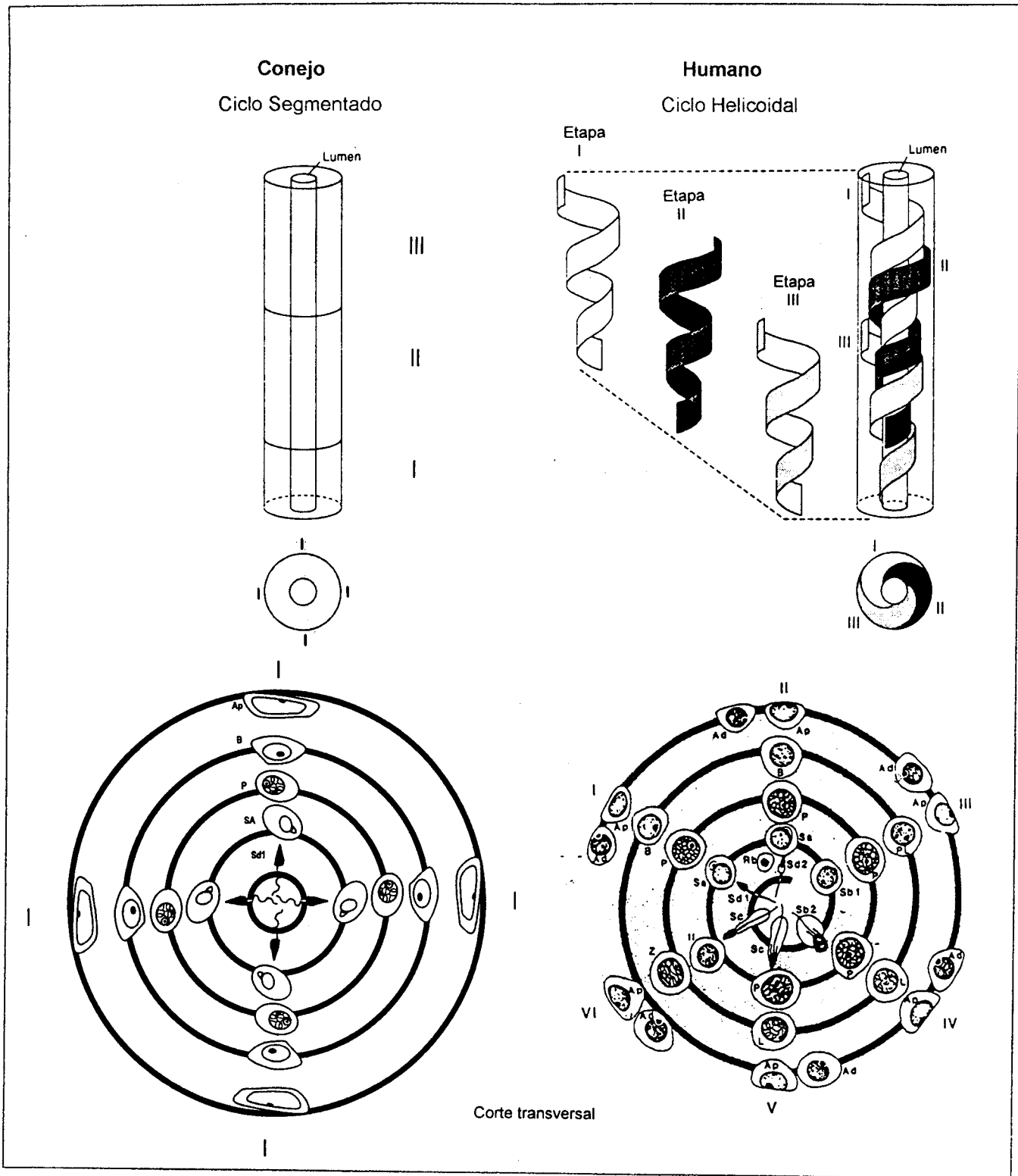


Figura 12. Ciclo espermatogénico tipo segmentado y helicoidal. Adaptados de Matsumoto, A.M. 1996 y Sharpe R.M. 1994.

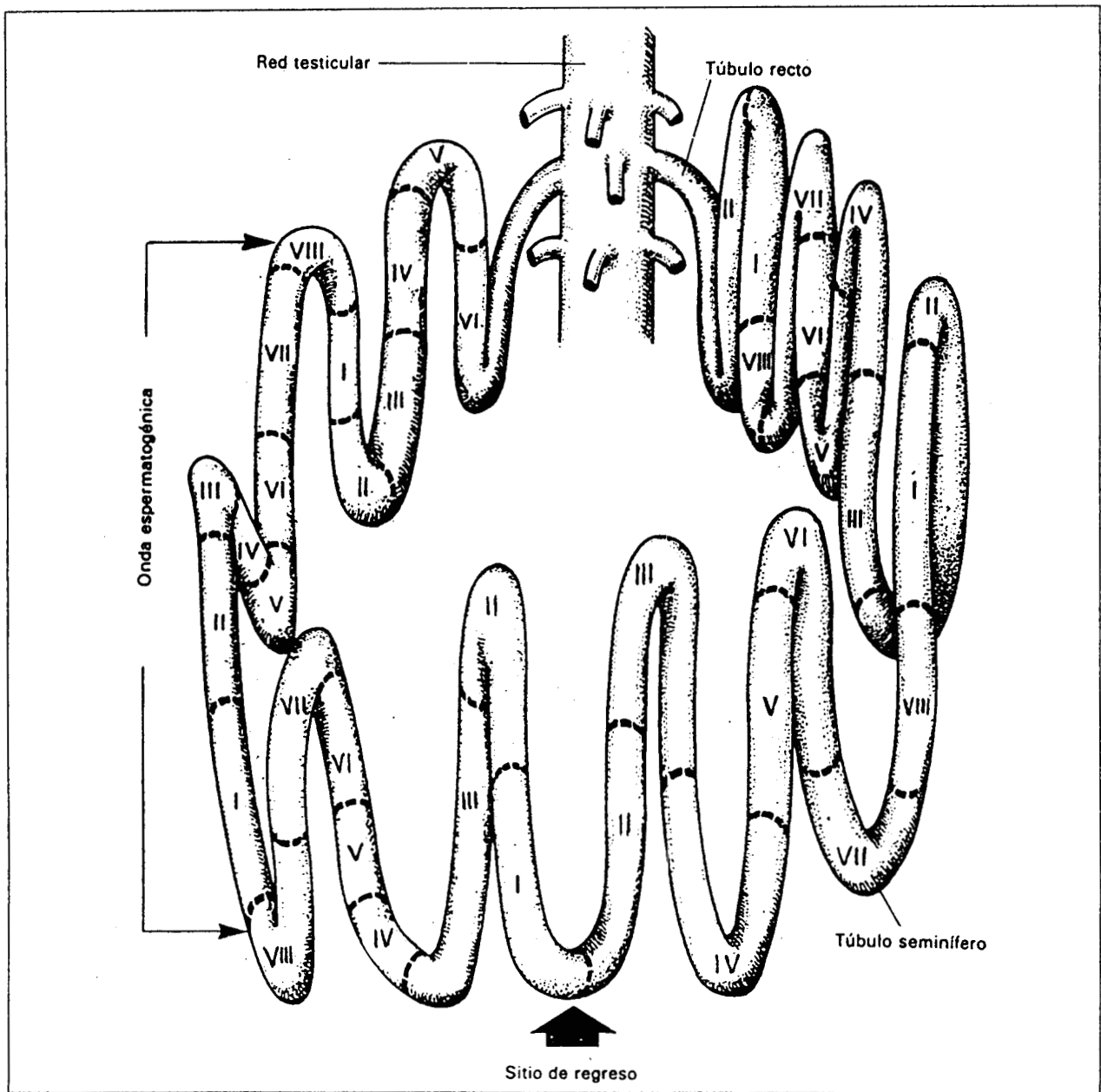


Figura 13. Representación esquemática de la onda espermatogénica del conejo. Adaptado de Garner D.L. y Hafez E.S.E. 1984.

Con base en el cuadro anterior y tomando en cuenta los 15 días de tratamiento, se proponen los posibles tipos de células germinales y el tiempo en que estas estuvieron en contacto con el antibiótico (Cuadro 6). No se descarta la posibilidad, que en cada muestra de semen existan algunos espermatozoides de otras fases (porcentaje mínimo) del ciclo anterior.

Cuadro 6. Tipos de células germinales de la espermatogénesis y días que estuvieron en presencia del CAF.

Día de ensayo (toma muestra)	Espermatozoides que estaban en	Células Germinales en contacto con el CAF	Días en presencia del CAF
1	Ep ₁₀ + v. Deferente	Ep ₁₀	1
7	Ep ₄	Ep ₄ — Ep ₁₀	7
21	R ₃	R ₃ — Ep ₅	15
35	P ₁	P ₁ — R ₄	15
49	A ₆	A ₆ — P ₂	15
63	Cels. Germinales	CG — A o B	15 (CG) 8 (A o B)
77	Cels. Germinales	A	15 (CG) 0.5 (A)

Viabilidad

El hecho de que la viabilidad de los espermatozoides fue afectada, concuerda con el trabajo de Yunis y col. (1980), donde reportan incremento en la mortalidad de células sanguíneas humanas con el metabolito CAF-nitroso. En este mismo parámetro se aprecia una relación dosis-respuesta si se toma en cuenta únicamente la dosis baja y media, es decir a mayor CAF ingerido menor viabilidad (Fig. 3).

La disminución más extrema de la viabilidad de los grupos de conejos con dosis baja y media hacia el día 21, parece estar relacionada con la fase de la espermatogénesis que va del tipo celular R₃ a Ep₅ (Cuadro 6), en la cual los gametos en proceso de diferenciación, presentan una mayor sensibilidad al antibiótico, hecho que se empieza a manifestar el día 7 (Fig. 3). La fase a la que se hace referencia en este día es a la espermiogénesis, donde además de cambios morfológicos drásticos, las células sexuales sufren reacomodo membranal, condensación nuclear y por tanto detención

temporal de síntesis proteica. En el día 77 donde se aprecia otra disminución importante en la viabilidad, los gametos obtenidos en este ensayo estuvieron en presencia del CAF durante largos periodos de tiempo como células germinales (A, B, E, etc.) mismas que se proponen como altamente sensibles al antibiótico.

En cuanto a la dosis alta, a pesar de no presentar un comportamiento regular y con tendencia definida, todos sus valores estuvieron por debajo del control. Este comportamiento de los espermatozoides puede ser atribuido, como ya mencionó, a la variabilidad y sensibilidad individual de cada conejo.

Morfología

Es evidente que el porcentaje de espermatozoides con morfología normal (89%) según Dubiel y col. (1979): en Alvariano, 1993, fue alterado de manera significativa por la dosis media de CAF, observándose una disminución a partir del día 21 y manifestando el mayor daño el día 49, para posteriormente recuperarse, de manera parcial, hacia el día 77 (Fig. 4).

En relación con la espermatogénesis (Cuadro 6), los espermatozoides obtenidos el día 21, 35 y 49 estuvieron 15 días en contacto con el antibiótico, pero este contacto fue en distintas fases. Aquellos del día 21 estuvieron desde espermiogénesis hasta maduración en el epidídimo; los del día 35 permanecieron desde la fase de paquitena y espermatozocito secundario hasta inicios de espermiogénesis; los del día 49 estuvieron en contacto con el CAF desde células germinales hasta espermatogonias A o B. Con la información anterior se identifica, que en ninguno de los ensayos realizados en los días antes citados, las células comparten exactamente los mismos grados de desarrollo, ni el tiempo en contacto con el CAF, pero sí coinciden en que, independientemente del período en el que estaban, llegaron a la fase de espermiogénesis.

Considerando lo anterior, queda descartado el tiempo de exposición del antibiótico como factor determinante en las alteraciones de la morfología, pero no así el tiempo

que tardan en llegar a la fase antes mencionada, el número de metabolitos disponibles en ese momento y/o la actividad funcional de los mismos.

Otra manera de explicar el fenómeno se basa en ubicar, al inicio del estudio, a las células de las distintas etapas de la espermatogénesis en el epitelio seminífero, pudiendo tener las más cercanas a éste, mayor acceso a los metabolitos, introduciéndolos en ese momento, pero actuando, posiblemente, hasta y durante la espermiogénesis. Lo anterior coincide para los días 21, 35 y 49, donde las muestras de semen estuvieron expuestas al CAF durante 15 días (Cuadro 6).

En concreto, se observa una relación proporcional entre los días transcurridos después de la primera dosis (21,35 y 49) y el número de anomalías en parte media, la cual ya no se observa en los días 63 y 77.

Aunque sólo se encontró diferencia estadísticamente significativa en la dosis media del CAF con respecto al control durante todo el estudio, en morfología normal y en anomalías en parte media, la tendencia general de las muestras evaluadas el día 49, manifiesta que la dosis media produjo una mayor alteración que la dosis alta. Esto coincide con lo reportado por Catalan y col. (1993) quienes observaron en linfocitos de bovino, mayor incremento en el intercambio de cromátidas hermanas a dosis bajas (5 µg/ml), que a dosis altas (10, 20 y 40 µg/ml) de CAF.

El efecto menor a dosis más altas es debido, probablemente, a una respuesta homeostática del organismo, aumentando su tolerancia al fármaco y por consiguiente observándose valores de daño por debajo de los de dosis media y muy similares a los de dosis terapéuticas.

El grado de tolerancia de toda sustancia varía de un organismo a otro. En el caso específico del CAF existen especies bacterianas no tolerantes como *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* y *Salmonella sp.*, entre otras (Vázquez y col., 1990)

mientras que algunas cepas de *Rhizobium leguminosarum* si lo son (Vargas y col., 1992).

El que *O. cuniculus* sea tolerante para ciertas dosis de CAF puede explicarse de dos maneras. Primera, que al incrementar sus concentraciones, se acentúe la degradación de algunas proteínas y la síntesis de otras, provocando un aumento en el grado de tolerancia normal, inactivando al antibiótico o a sus metabolitos, reflejándose en la disminución de sus efectos. Lo anterior se basa en los resultados de Giard y col. (1996) quienes reportaron que en bacterias, para que adquieran la máxima resistencia al calor o al estrés oxidativo es necesario tanto la síntesis de proteínas específicas como la alteración o degradación de otras. Segunda, partiendo de que el propio CAF actúa como factor inhibitorio de la función de enzimas capaces de metabolizar un fármaco aplicado en animales, ocasionando una disminución en su capacidad anestésica después de administrarse en repetidas ocasiones (adquisición de tolerancia después de administraciones repetidas), se propone que después de determinada concentración de CAF ingerido, se favorezca la producción de alguna sustancia, o que se active determinado proceso metabólico que desencadene un incremento en la tolerancia (Nossaman y col., 1990).

Reacción Acrosomal

Aunque la reacción acrosomal espontánea y la inducida no mostraron diferencias significativas en relación con la dosis de CAF administrado, las tendencias en ambos casos es aumento en el porcentaje de espermatozoides reaccionados para la dosis media en el día 21, semejante a lo encontrado para la viabilidad. Para la reacción acrosomal el daño se relaciona, nuevamente, con la etapa de espermiogénesis y se reafirma que la dosis media es la de mayor toxicidad.

Motilidad

Como ya se mencionó, los parámetros de motilidad BCF y LIN, a pesar de que mostraron diferencias estadísticamente significativas, no tienen relación con la dosis o el tiempo de administración del CAF, debido a que estas diferencias se presentaron,

con respecto a la LIN, desde antes de la ingestión del antibiótico y que los datos de BCF corresponden a la variabilidad que presenta cada organismo.

Una manera de explicar los efectos ocasionados por el antibiótico en la viabilidad, morfología y reacción acrosomal, es que las células germinales acumulan ADN dañado, y al no poder ser reparado (por acción inhibitoria de la síntesis de proteínas por el CAF) las espermatidas o espermatozoides en proceso de maduración, experimentan alteraciones (Rosenkranz, 1988).

Al parecer, la mayoría de los daños del CAF en los parámetros ya mencionados fueron originados en fases postmeióticas, lo cual concuerda con Witt y Bishop (1996), donde reportan a un gran número de antineoplásicos como responsables de efectos diversos en células espermáticas en estas fases.

Ya que en ningún parámetro los efectos se incrementaron exponencialmente y si hubo recuperación, se puede deducir que el daño ocasionado por el antibiótico es temporal y no es acumulativo.

Perspectivas en humanos

Aunque la viabilidad y la morfología de los espermatozoides de los conejos fue alterada por el CAF durante la gametogénesis no se pueden generalizar estos resultados a los humanos, pero sí establecer un posible riesgo potencial para sus células germinales, con las limitaciones propias del estudio en animales experimentales. Además, tal vez de la pauta para asociar la hipótesis que formularon Sheehan y Sweeney (1982), donde postulan al CAF como responsable de causar pancitopenia en médula ósea al mismo tiempo que daño testicular a un paciente con neumonía, al cual se le administró conjuntamente ampicilina. Después de 12 días de tratamiento el paciente de 63 años murió, revelando en la autopsia pérdida del epitelio germinal.

Por lo anterior, el riesgo potencial en el hombre aunque no comprobado queda latente, mismo que podría ser más agresivo en la infancia y/o la pubertad; lo preocupante de

este hecho es que el CAF en nuestro país se utiliza sin control y además es frecuentemente prescrito para tratar diversas infecciones bacterianas en niños desnutridos de nuestro país (Betancourt y col., 1995)

Se ha comprobado que diversos medicamentos son espermatotóxicos como la ciclofosfamida, melfalan, clorambucil y trofosfamida entre otros anticancerígenos mutagénicos (Witt y Bishop, 1996) al igual que la acrilamida y el 1,3 – butadiona (Adler y col., 1996), así como antibióticos citotóxicos como la pirazinamida (Anitha y col, 1994), co-trimoxazol y gentamicina (Sheehan y Sweeney, 1982). Las investigaciones que conllevan a este tipo de información son importantes, porque además de dar a conocer cómo y a que nivel actúan los diferentes tóxicos, se pueden relacionar los efectos producidos por estos con la infertilidad masculina, además de poder explicar, de manera indirecta, parte de lo que aún se desconoce del complejo proceso espermatogénico.

PROPUESTAS

- Continuar experimentos con la misma especie, valorando únicamente viabilidad, morfología y reacción acrosomal, utilizando dosis entre 115 y 145 mg/kg de peso corporal.
- Los ensayos se deberán realizar siete días antes y siete después de la primera administración del antibiótico, sin ser necesario el de un día ulterior a la primera toma, para luego realizarlos cada quince hasta contabilizar 91 días posteriores al inicio de los tratamientos.
- Los espermatozoides obtenidos en cada ensayo, se deberán analizar no sólo a nivel de microscopio óptico sino también ultraestructural para poder detectar exactamente la causa de la malformación en la parte media y su ubicación dentro de ésta. Proponiendo con esta información, en donde y como afecta el CAF, ocasionando dicha alteración morfológica.
- También se deberá cuantificar el CAF o sus metabolitos en el líquido seminal, para al final del estudio detectar la presencia de éstos en tejido testicular.

CONCLUSIONES

- El CAF resultó espermatotóxico en el conejo doméstico, sobre la densidad, viabilidad y morfología espermática. El tratamiento con mayores efectos sobre estos parámetros fue la dosis media con 112 mg /kg.
- La viabilidad se vio disminuida para el día 21, con mayor efecto para la dosis media (112 mg /kg) con respecto a la dosis baja (29 mg /kg).
- Se incrementaron significativa y progresivamente las formas anormales de la parte media, del día 21 al 49, recuperándose hacia el día 77. Este efecto se aprecia en menor grado para la dosis alta (145 mg /kg) que para la media (112 mg /kg). Es posible que estos datos supongan una respuesta del organismo a incrementar su tolerancia al CAF.
- La reacción acrosomal espontánea e inducida, aunque no significativas, presentan una tendencia a estar alteradas en el día 21.
- La etapa postmeiótica de la espermatogénesis es la que se detectó como determinante para el desarrollo de los efectos del CAF, específicamente con referencia a la espermiogénesis.
- No se encontró una relación dosis-respuesta, ni un efecto acumulativo de los daños producidos por este fármaco.
- Se confirma que el CAF es un antibiótico temporalmente tóxico para las células germinales del conejo doméstico.

VIII. BIBLIOGRAFIA.

Adamopoulos, D.A., A. Pappa, S. Nicopoulou, E. Andreou, M. Karamertzanis, J. Michopoulos, V. Deligianni y M. Simou (1996) Seminal volume and total sperm number trends in men attending subfertility clinics in the greater Athens area during the period 1977 – 1993. *Hum. Reprod.*, 11: 1936 – 1941.

Adelman, M.M. y E.M. Cahill (1989) Atlas of sperm morphology. American Society of Clinical Pathologists. Chicago, EUA. pp. 99 - 100.

Adler, I.D. , D. Anderson, R. Benigni, U.H. Ehling, J. Laehdetie, F. Pacchierotti, A. Russo y A.D. Tates (1996) Synthesis report of the step project detection of germ cell mutagens. *Mutat. Res.*, 353: 65 – 84.

Alvariño, M.R. (1993) Control de la reproducción en el conejo. Mundi-Prensa. Madrid, España. 137 pp.

Anderson, P.D. y H.I. Battle (1966) Effects of chloramphenicol on the development of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Can. J. Zool.*, 45: 191 – 204.

Anitha, B., S. Sudha, P.M. Gopinath y G. Durairaj (1994) Genotoxicity evaluation of pyrazinamide in mice. *Mutat. Res.*, 321: 1 - 5.

Beermann, F. e I. Hansmann (1986) Follicular maturation, luteinization and first meiotic division in oocytes after inhibiting mitochondrial function in mice with chloramphenicol. *Mutat. Res.*, 160: 47 - 54

Berger, T. (1990) Pisum Sativum agglutinin used as an acrosomal stain of porcine and caprine stain. *Theriogenology*, 3: 689 - 695.

Betancourt, M., R. Ortiz, C. González, P. Pérez, L. Cortés, L. Rodríguez y L. Villaseñor (1995) Assessment of DNA damage in leukocytes from infected and malnourished children by single cell gel electrophoresis / comet assay. *Mutat. Res.*, 331: 65 – 77.

Bonilla, E., A. Amador y M. Betancourt (1994) In vitro capacitation of boar sperm in a protein-free medium supplemented with histidine and cysteine. *Med. Sci. Res.*, 22: 725 - 726.

Bonilla, E., R. Velasco, E. Casas, Y. Ducolomb y M. Betancourt (1996) Inhibition of the pig sperm acrosome reaction by a decapacitation factor from pig seminal plasma. *Med. Sci. Res.*, 24: 75 - 77.

Brackett, B.G. y G. Oliphant (1975) Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 12: 260 - 274.

Catalan, J., C. Moreno y M. V. Arruga (1993) Sister-chromatid exchanges induced by chloramphenicol on bovine lymphocytes. *Mutat. Res.*, 319: 11 - 18.

Delaat, A. Agentes antimicrobianos y pruebas de sensibilidad. En: *Microbiología Interamericana*. D.F. México. pp. 197 – 204, 1979.

Garner, D.L. y E.S.E. Hafez .Espermatozoide. En: *Reproducción e inseminación artificial en animales*, Interamericana. D.F. México. pp. 160 – 180, 1984.

Giard, J.C., A. Hartke, S. Flahaut, A. Benachour, P. Boutibonnes e Y. Auffray (1996) Starvation induced multiresistance in *Enterococcus faecalis* JH2-2. *Current Microbiol.*, 32: 264 – 271.

Goodman, A., L.S. Goodman y A. Gilman. Quimioterapia de las enfermedades microbianas. En: *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, Panamericana, D.F. México. pp. 1168 – 1175, 1982.

Hagström, B.E. y S. Lönning (1973) The sea urchin egg as a testing object in toxicology. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 32, Suppl. 1: 6 – 49.

Humphreys, D.J. (1990) *Toxicología Veterinaria*. Interamericana-McGraw-Hill. Barcelona, España. pp. 105 - 106.

Jones, L.M. (1982) *Farmacología y Terapéutica Veterinarias*. Hispano-Americana. D.F. México. pp. 446 - 449.

Kamiguchi, Y., H. Tateno, Y. Iizawa y K. Mikamo (1995) Chromosome analysis of human spermatozoa exposed to antineoplastic agents *in vitro*. *Mutat. Res.*, 326: 185 - 192.

Lafarge-Frayssinet, C., S. Robbana-Barnat, C. Frayssinet, L. Toucas y F. Decloître (1994) Cytotoxicity and DNA damaging potency of chloramphenicol and six metabolites: a new evaluation in human lymphocytes and Raji cells. *Mutat. Res.*, 320: 207 – 215.

Lalliér, R. (1966) Effets d'analogues du chloramphénicol sur la différenciation de l'oeuf de l'oursin *Paracentrotus lividus*. *Experientia*, 22: 724 – 725.

Martelli, A., F. Mattioli y G. Pastorino (1991) Genotoxicity testing of chloramphenicol in rodent and human cell. *Mutat. Res.*, 260: 65 - 72.

Matsumoto, A.M. Spermatogenesis. En: *Reproduction Endocrinology, Surgery and Technology*, Vol (Adashi, E.Y., Rock J.A. y Rosenwaks, Z. ed.) Lippincott – Raven, Nueva York. pp. 359 – 384, 1996.

McDaniel, L.C. y R.A. Schultz (1993) Elevation on sister chromatid exchange frequency in transformed human fibroblasts following exposure to widely used aminoglycosides. *Environ. Mol. Mutagen.*, 21: 67 - 72.

Merck y Co. (1989) The Merck Index. Eleventh Edition. Merck y CO., INC. EUA.

Mitus, W.J. y N . Coleman. (1970) In vitro effect of chloramphenicol on chromosomes. Blood, 35: 689 – 694.

Nossaman, B.C., H.R. Amouzadeh y S. Sanglah (1990) Effects of chloramphenicol, cimetidine and phenobarbital on and tolerance to xylazine-ketamine anesthesia in dogs. Vet. Hum. Toxicol., 32: 216 – 219.

Ratcliffe, J.M., P.R. McElhatton y F.M. Sullivan (1993) Reproductive Toxicity en: Ballantyne, B., T. Marrs y P. Turner. General and Applied Toxicology. Stockton Press. New York, EUA. pp. 989 - 1020.

Robbana-Barnat, S., F. Decloitre, C. Frayssinet, J.M. Seigneurin, L. Toucas y C. Lafarge-Frayssinet (1997) Use of human lymphoblastoid cells to detect the toxic effect of chloramphenicol and metabolites possibly involved in aplastic anemia in man. Drug Chem. Toxicol., 20 : 239 - 253.

Rosenkranz, H.S. (1988) Chloramphenicol: magic bullet or double-edge sword? Mutat. Res., 196: 1-16.

Rosselli, M., R.K. Dubey, B. Imthurn, E. Macas y P.J. Keller (1995) Effects of nitric oxide on human spermatozoa: evidence that nitric oxide decreases sperm motility and induces sperm toxicity. Hum. Reprod., 10 : 1786 - 1790

Russell, L.B., P.R. Hunsicker y M.D. Shelby (1992) Melphalan, a second chemical for which specific-locus mutation induction in the mouse is maximum in early spermatids. Mutat. Res., 282: 151 - 158.

Sasaki, M.S. y A. Tonomura (1973) A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking agents. *Cancer Res.*, 33: 1829 – 1836.

Satta, G., L.J. Gudas y A.B. Pardee (1979) Degradation of *Escherichia coli* DNA. Evidence for limitation *in vivo* by protein X, the *recA* gene product. *Mol. Gen. Genet.*, 168: 69 – 80.

Sbrana, I., S. Carretto, G. Rainaldi and N. Loprieno (1991) Induction of chromosomal aberrations and SCE by chloramphenicol. *Mutat. Res.*, 248:145 – 153.

Sharpe, R.M. Regulation of Spermatogenesis. En: *The Physiology of Reproduction*, Vol. 1, 2ª edición (Knobil, N. ed.) Raven Press, Nueva York, pp.1363 – 1434, 1994.

Sheehan, J. y E.C. Sweeney (1982) Drugs and sperm. *Br. Med. J.*, 284: 1331.

Shmerling, Z. G. y N.M. Skoblina (1978) The action of ethidium bromide and chloramphenicol on the steroidogenesis induced by gonadotrophic hormones in the ovaries of amphibia and mammals. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 35: 355 - 359.

Skolimowski, I.M., D.A. Rowley, R.C. Knight y D.I. Edwards (1981) Reduced chloramphenicol-induced damage to DNA. *J. Antimicrob. Chemother.*, 7: 593 – 597.

Skolimowski, I.M., R.C. Knight y D.I. Edwards (1983) Molecular basis of chloramphenicol and thiamphenicol toxicity to DNA *in vitro*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 23: 535 – 542.

Solis, M. (1996) Tesis: Factores ambientales y genéticos de la producción de semen en el conejo doméstico (*Oryctolagus cuniculus*). Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo. Michoacán, México. 32 pp.

Sumano, H. y L. Ocampo (1988) *Farmacología Veterinaria*. McGraw-Hill. D.F. México. pp. 156-159.

Vargas, A.T., N.D. Denardin y P. Berkum (1992) Tolerancia de rizobios nativos do feijoeiro a antibioticos e sua relacao com factores de acidez do solo. *Rev. Brasileira de Ciencia do Solo*, 16: 331 – 336.

Vázquez, L., M.C. Bermudez, A. Langure, I. Higuera, M. Diaz y E. Flores (1990) Antibiotic residues and drug resistant bacteria in beef and chicken tissues. *J. Food Scien.*, 55: 632 – 634.

Witt, K.L. y J.B. Bishop (1996) Mutagenicity of anticancer drugs in mammalian germ cells. *Mutat. Res.*, 355: 209 - 234

Young, R. J., B. A. Bodt y D.H. Heitkamp (1995) Action of metallic ions on the precocious development by rabbit sperm motion patterns that any characteristic of hyperactivated motility. *Mol. Reprod. Dev.*, 41: 239 - 248.

Yunis, A.A., A.M. Miller, Z. Salem, M.D. Corbett y G.K. Arimura (1980) Nitroso-chloramphenicol: possible mediator in chloramphenicol-induced aplastic anemia. *J. Lab. Clin. Med.*, 96: 36 - 46.

222860

ANEXO

Medio Brackett Modificado

Utilizado para lavado, dilución y capacitación de espermatozoides.

Componente	PM	mg/100 ml	mM final
NaCl	58.44	869	150
KCl	74.55	30	4
CaCl ₂	110.98	27.8	2.5
NaH ₂ PO ₄ + H ₂ O	137.99	10.48	0.76
MgCl ₂ . 6H ₂ O	203.33	2.48	0.122
NaHCO ₃	84.01	309.8	36.9
Piruvato de sodio	110	13.74	1.25
Glucosa	180.06	250	13.9
BSA (libre de ácidos grasos)		100	1 mg/ml
Rojo Fenol		1	

Aforar a 100 ml con agua desionizada.

Observaciones:

1. pH a 7.8
2. Osmolaridad a 337 mOsm/kg
3. Esterilización por filtración, con membranas de 0.22 mm (Millipore).
4. Suplementar el día de uso con albumina (BSA) libre de ácidos grasos y glucosa.

LOS INTEGRANTES DEL JURADO, DESIGNADOS POR LA DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA, APROBARON LA PRESENTE TESIS EL DÍA 6 DE MAYO DE 1999.



DR. MIGUEL BETANCOURT RULE



M. en C. DEMETRIO AMBRIZ GARCIA



DRA. CONCEPCION GUTIRREZ RUIZ
