

Trabajo Original

Ecotoxicología

## **Efectos de la Ciclofosfamida en la morfología del espermatozoide de ratón.**

**Ailemys Curbelo Valiente, Yesenia Rivero Salgado, Niurka Somoza Pérez, María Elena Arteaga Pérez, Nereida Mantilla Gattorno.**

Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, CENPALAB. Finca Tirabeque, Carretera Cacahual Km 21/2, Bejucal, La Habana Cuba. Correo: [ailemys@cenpalab.inf.cu](mailto:ailemys@cenpalab.inf.cu), [ailemyscurbelo@yahoo.es](mailto:ailemyscurbelo@yahoo.es)

---

## Resumen

La Ciclofosfamida (Cf) es un agente alquilante comúnmente utilizada como fármaco anti-cáncer e inmunosupresor. Es usado en el tratamiento de leucemia crónica y aguda, mielomas múltiples, linfomas, artritis reumáticas, trasplante de médula ósea, entre otras enfermedades. Se utiliza como control positivo en diferentes ensayos de mutagénesis. En este estudio fueron usadas dos dosis (50 y 100 mg/Kg) de Cf con el objetivo de determinar su capacidad de inducir anomalías en el espermatozoide del ratón NMRI. El Ensayo de Anormalidades de la Cabeza del Espermatozoide, descrito por Wyrobek y Bruce en 1975 propone un sistema para detectar daño citogenético en células germinales. Permite cuantificar poblaciones de espermatozoides anormales y constituye una prueba *in vivo* simple y rápida. La frecuencia de cabezas anormales analizadas (cabezas amorfas, banana y sin gancho) aumentó significativamente en el tratamiento con 100 mg/Kg de Cf, estos resultados evidencian que dicha sustancia provoca daño genotóxico en células germinales de ratón.

**Palabras claves:** Ciclofosfamida, morfología espermatozoides, ratón, genotoxicidad

---

## Abstract

### **Effects of a ciclophosphamide on mouse sperm morphology.**

Cyclophosphamide (CP) as an alkylating agent is the most commonly used anticancer and immunosuppressant drug. It is used for the treatment of chronic and acute leukemia, multiple myeloma, lymphomas, rheumatic arthritis, bone marrow transplantation, among other diseases. It is used as positive control in different mutagenesis tests. In this study, they were used two doses (50 y 100 mg/Kg) of CP, with the objective to determinate the induced-abnormality capacity in the NMRI mouse sperm. The Morphology of the Head of the Sperm Cell Test, described by Wyrobek and Bruce in 1975, proposed a system to detect cytogenetic damage in germ cells. It permits to quantify abnormal sperm populations and constitutes a single and rapid *in vivo* test. The frequency of abnormal heads (amorphous head, banana-shape and no hook) increased significantly in the 100 mg/Kg CP, this results evidence that this substance induces genotoxic damage in mouse germ cells.

**Keywords:** Cyclophosphamide, sperm morphology, mouse, genotoxicity

## Introducción

La Ciclofosfamida (Cf) es comúnmente utilizada como fármaco anti-cáncer e inmunosupresor; en el tratamiento de leucemia crónica y aguda, mielomas múltiples, linfomas, artritis reumáticas, trasplante de médula ósea, entre otras enfermedades (Rezvanfar *et al.*, 2008).

A pesar de su amplio espectro de usos clínicos, se conoce que es un agente alquilante nitrogenado con propiedades clastogénicas que provoca un incremento de las roturas cromosómicas, y que la toxicidad reproductiva de este compuesto es conocida como el principal efecto adverso visto en humanos y animales (Rezvanfar *et al.*, 2008). Estudios en ratas o ratones han confirmado el potencial de la Cf para causar pérdida de peso testicular, oligospermia transitoria, reducción de síntesis de ADN y proteínas en espermatogonia y espermátidas, y alteraciones histológicas en testículos y epidídimos (Anderson *et al.*, 1995; Meistrich *et al.*, 1995; Kaur *et al.*, 1997).

Está propuesta por la OECD como control positivo para diversos ensayos de genotoxicidad, entre ellos para el ensayo de Aberraciones Cromosómicas *in vitro* en presencia de activación metabólica e *in vivo*; Micronúcleos en eritrocitos de mamífero *in vivo*; Mutación Inversa en bacterias y para el ensayo de Aberraciones Cromosómicas en espermatogonias de mamífero; entre otros. Diferentes autores también reportan este compuesto como control positivo en el ensayo de Morfología de los Espermatozoides en roedores (Wyrobek and Bruce, 1975; Gimmler-Luz and Erdtmann, 1998; Chauhan *et al.*, 2000; Bakare *et al.*, 2005; Shahabuddin and Gopal, 2007; Wyrobek *et al.*, 2007; Arencibia *et al.*, 2009).

Como objetivo de este trabajo se presenta: determinar en nuestras condiciones experimentales, la respuesta de la Cf en células espermáticas a las dosis de 50 y 100 mg/Kg.

## **Materiales y Métodos**

La evaluación experimental fue realizada siguiendo los Principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio no Clínico de Seguridad Sanitaria y Medioambiental (Regulación 39/2004), por la Guía para el Cuidado, Uso y Reproducción de los Animales para Experimentación en el CENPALAB y los Procedimientos Operacionales para la Toxicología Experimental (POT) del CETEX.

Se utilizaron 15 ratones machos Censp:NMRI procedentes del CENPALAB con una edad de 8 semanas y un rango de peso corporal entre 27 y 30 g. Fueron distribuidos en 3 grupos experimentales de 5 animales cada uno:

1. Sin tratamiento (S/T)
2. Cf 50 mg/Kg
3. Cf 100 mg/Kg

Todos los animales fueron alojados en cajas T2 de policarbonato con fondo y tapa de rejilla y bandejas plásticas para la recolección de desechos (Tecniplast) y mantenidos en condiciones controladas de temperatura ( $21,80 \pm 1,30$  °C) y humedad relativa ( $76,20 \pm 2,77$  %). El fotoperíodo fue de 12 horas luz/oscuridad. Se les suministró a libertad el agua en frascos de 500 mL y la dieta comercial granulada EMO:1002 (CENPALAB, AlyCo®) para roedores, tanto el agua como el alimento fueron esterilizados previamente.

Se realizaron diariamente las observaciones a los animales, una vez en el horario de la mañana y se pesaron de forma individual antes de efectuar cada una de las administraciones correspondientes y antes del sacrificio.

La Ciclofosfamida utilizada (Fluka, lote: 29875) fue administrada en un volumen de 1 mL por animal empleando la vía intraperitoneal, y las dosis correspondieron a 50 y 100 mg/Kg de peso corporal.

Se realizaron 5 administraciones consecutivas separadas por 24 horas y el sacrificio fue por dislocación cervical a los 35 días de la 1ra administración. Se extrajeron

las colas de los epidídimos que se fragmentaron en 1 mL de Solución Salina Fisiológica (SSF) al 0.9 % para la obtención de la suspensión espermática. De las muestras fueron tomados 0.5 mL para el análisis de la morfología de la cabeza de los espermatozoides, a los que se les añadió previamente Eosina al 1% para la tinción de las células espermáticas. Se cuantificaron 1000 células por animal las cuales se clasificaron en espermatozoides normales y anormales, estos últimos clasificados en amorfos, banana y sin ganchos (Wyrobek y Bruce en 1975). Los restantes 0.5 mL se utilizaron para el conteo espermático empleando la Cámara de Neubauer.

El análisis estadístico de los datos fue realizado mediante el paquete SPSS versión 11.5.1, tomando un nivel de significación  $p < 0.05$ . Los datos que cumplieron las premisas de normalidad (Prueba de Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianza (Prueba de Levene) fueron analizados mediante un Análisis de Varianza univariante seguido de la prueba DMS (Diferencia menos significativa). Los restantes datos se analizaron por la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

## **Resultados y Discusión**

La supervivencia en el trabajo fue del 100%, al no reportarse la muerte de ningún animal durante el ensayo. Se determinó la media y la desviación estándar del peso corporal por grupo de tratamiento, no evidenciándose diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con Cf y el grupo S/T.

Al analizar la morfología de la cabeza de los espermatozoides se observaron diferencias estadísticamente significativas para el total de espermatozoides anómalos, (comparación con el control negativo, ANOVA, nivel de significación  $p < 0.05$  ( $X \pm DE$ )) entre los dos grupos tratados con Cf y el grupo control ( $X = 4.35 \pm 2.01$ ), además se mostró diferencias significativas entre el grupo Cf 50 mg/Kg ( $X = 10.3 \pm 2.89$ ) y el grupo Cf 100 mg/Kg ( $X = 28.58 \pm 5.57$ ). Los resultados para cada anomalía analizada y el total de espermatozoides anormales, en todos los grupos experimentales, se reflejan en el

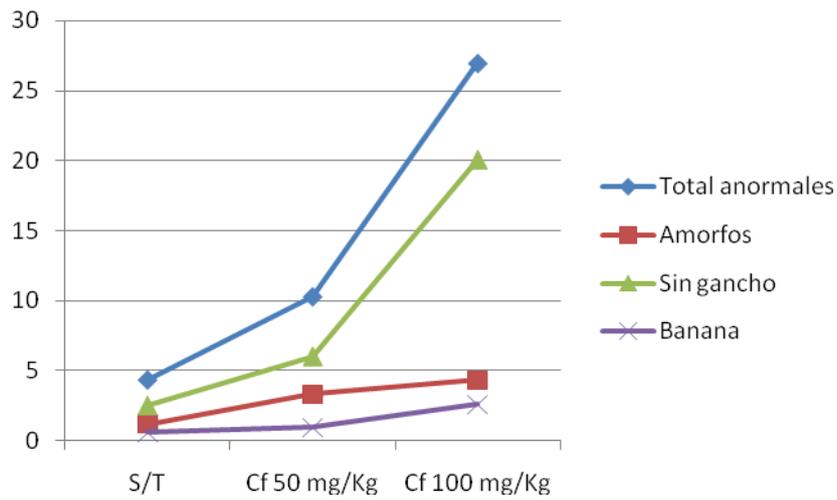
Gráfico 1. La literatura muestra valores comparables con los nuestros a la dosis de 50 mg/Kg de Cf (Arencibia *et al.*, 2009) y otros autores reportan valores similares aunque empleando otras líneas de ratón para la Cf-100 mg/Kg (Gimmmler-Luz and Erdtmann, 1998) y para Cf-50 mg/Kg (Shahabuddin and Gopal, 2007). Se plantea que a pesar de que no está definido el mecanismo exacto por el cual la Cf causa toxicidad testicular; se conoce que la misma desestabiliza el balance redox provocando estrés oxidativo (Das *et al.*, 2002; Ghosh *et al.*, 2002; Manda and Bhatia, 2003) y que los daños oxidativos al ADN son causados por hidroperóxido derivado de la Cf a través de la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Murata *et al.*, 2004). Rezvanfar y col. consideran que la toxicidad reproductiva de la Cf es mediada por estrés oxidativo y que daños al ADN pueden ser los responsables del incremento en el porcentaje de espermatozoides con formas anormales, demostrándose por tinción de naranja acridina, que la exposición a Cf causa roturas de simple y doble cadena en ADN de espermatozoides (Rezvanfar *et al.*, 2008). (Ver gráfico 1)

El Gráfico 2 muestra el comportamiento del conteo espermático, observándose como disminuye significativamente esta variable en los grupos tratados con Cf ( $X_{Cf\ 50\ mg/Kg}=15.3\pm 4.39$  y  $X_{Cf\ 100\ mg/Kg}=12.72\pm 3.53$ ) a medida que aumenta la dosis y con respecto al grupo sin tratamiento ( $X=25.66\pm 3.24$ ). Arencibia y col. reportan para la línea NMRI una media de conteo espermático de 18.7 para la dosis de 50 mg/Kg de Cf (Arencibia *et al.*, 2009), siendo nuestro rango para este nivel de dosis de 12.3 – 21.7, para una media de 15.30. Este parámetro también se ve afectado por la Cf; Katoh y col. detectaron una marcada reducción en el peso testicular en los animales tratados con Cf, la cual fue explicada por el disminuido número de células germinales (Katoh *et al.*, 2002)

## Conclusiones

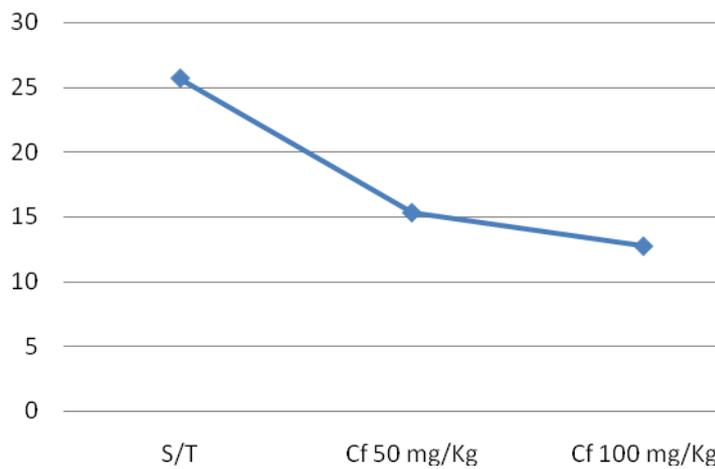
La Ciclofosfamida provoca daño genotóxico y citotóxico en células espermática de ratón a las dosis de 50 y 100 mg/Kg de peso corporal, en nuestras condiciones experimentales.

**Gráfico 1. Anormalidades de la cabeza de los espermatozoides en los tres grupos experimentales.**



$p < 0.05$  (comparación con el control negativo (S/T), ANOVA)

**Gráfico 2. Conteo espermático en ratones Cenp:NMRI.**



$p < 0.05$  (comparación con el control negativo (S/T), ANOVA)

---

## **Bibliografía**

- Anderson D., Bishop J.B., Garner R.C., Ostrosky-Wegman P., Selby P.B. 1995. Cyclophosphamide: review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. *Mut. Res.* 330:115–181.
- Arencibia D.F., Rosario L.A., Curveco D. 2009. Frecuencia espontánea e inducida de anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratones NMRI. *RETEL*.
- Bakare A.A., Mosuro A.A., Osibanjo O. 2005. An in vivo evaluation of induction of abnormal sperm morphology in mice by landfill leachates. *Mut. Res.* 582:28-34.
- Chauhan L.K.S., Pant N., Gupta S.K., Srivastava S.P. 2000. Induction of chromosomal aberrations, micronucleus formation and sperm abnormalities in mouse following carbofuran exposure. *Mut. Res.* 465:123-129.
- Das U.B., Mallick M., Debnath J.M., Ghosh D. 2002. Protective effect of ascorbic acid on cyclophosphamide- induced testicular gametogenic and androgenic disorders in male rats. *Asian J Androl.* 4:201–207.
- Ghosh D., Das U.B., Ghosh S., Mallick M., Debnath J. 2002. Testicular gametogenic and steroidogenic activities in cyclophosphamide treated rat: a correlative study with testicular oxidative stress. *Drug Chem. Tox.* 25: 281–292.
- Gimmler-Luz M.C., Erdtmann B. 1998. Effects of a pyrrolizidine alkaloid, integerrimine, on mouse sperm morphology. *V. Int. Contam. Ambient.* 14(2):79-83.
- Guía para el Cuidado, Uso y Reproducción de los Animales para Experimentación en el CENPALAB. La Habana, Cuba, 2000.
- Katoh C., Kitajima S., Saga Y., Kanno J., Horii I., Inoue T. 2002. Assessment of quantitative dual-parameter flow cytometric analysis for the evaluation of testicular toxicity using cyclophosphamide-and ethinylestradioltreated rats. *J. Toxicol. Sci.* 27:87–96.

- Kaur F., Sangha G.K., Bilaspuri G.S. 1997. Cyclophosphamide-induced structural and biochemical changes in testis and epididymidis of rats. *Indian. J. Exp. Biol.* 35: 771–775.
- Manda K., Bhatia A.L. 2003. Prophylactic action of melatonin against cyclophosphamide-induced oxidative stress in mice. *Cell Biol. Toxicol.* 19: 367–372.
- Meistrich M.L., Parchuri N., Wilson G., Kurdoglu B., Kangasniemi M. 1995. Hormonal protection from cyclophosphamide-induced inactivation of rat stem spermatogonia. *J. Androl.* 16: 334–341.
- Murata M., Suzuki T., Midorikawa K., Oikawa S., Kawanishi S. 2004. Oxidative DNA damage induced by a hydroperoxide derivative of cyclophosphamide. *Free Radic. Biol. Med.* 37:793–802.
- Principios de la Buenas Prácticas de Laboratorio no Clínico de Seguridad Sanitaria y Medioambiental. 2004. Buró Regulatorio para la Protección de la Salud Pública, MINSAP. Regulación 39. La Habana.
- Procedimientos Operacionales de Trabajo. División de Toxicología Experimental. Edición 01/03, 02/05. CENPALAB. La Habana.
- Rezvanfar M.A., Sadrkhanlou R.A., Ahmadi A., Shojaei-Sadee H., Rezvanfar M.A., Mohammadirad A., Salehnia A., Abdollahi M. 2008. Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress. *Human & Exp. Toxicol.* 27: 901–910.
- Shahabuddin M.S. and Gopal M. 2007. Genotoxicity of DNA Intercalating Anticancer Drugs: Pyrimido[4<sup>1</sup>,5<sup>1</sup>:4,5]thieno(2,3-b)quinolines on Somatic and Germinal Cells. *Toxicol. Mechan. and Methods.* 17:135-145.
- Statistical Package Scientific System, SPSS for Windows, version 11.5.1. 2002.

- Wyrobek A.J. and Bruce W.R. 1975. Chemical induction of sperm abnormalities in mice. Cell Biology. 72(11):4425-4429.
- Wyrobek A.J., Mulvihill J.J., Wassom J.S., Malling H.V., Shelby M.D., Lewis S.E., Witt K.L., Preston R.J., Perreault S.D., Allen J.W., DeMarini D.M., Woychik R.P., Bishop J.B. 2007. Assessing Human Germ-Cell Mutagenesis in the Postgenome Era: A Celebration of the Legacy of William Lawson (Bill) Russell. Environm. and Molec. Mutag. 48:71-95.

**Recibido: 21/09/10**

**Aceptado: 20/12/10**