

La contaminación ambiental y ocupacional por plomo y sus efectos en la salud reproductiva masculina, evidencia de daño al ADN

Occupational and environmental contamination by lead and its effects on male reproductive health, evidence of dna damage

JAVIER MORÁN MARTÍNEZ

Universidad Autónoma de Coahuila

jvmoran@yahoo.com

Resumen

La relación que existe entre los factores ambientales y la salud nos conduce a considerar dentro de la problemática del medio ambiente a aquellos trastornos que provienen de la contaminación del aire, el suelo y el agua, así como los resultados del abuso de drogas, productos químicos y agentes físicos potencialmente dañinos. Se multiplican las amenazas a la salud cuando ciertos agentes habitualmente presentes en el medio ambiente llegan a alcanzar concentraciones superiores a las permisibles por las normas de salubridad internacionales; o bien, se afecta el equilibrio natural cuando el hombre produce masivamente diversos compuestos químicos, derivados del creciente desarrollo de la tecnología, dando lugar a una constante acumulación de contaminantes.

En dicho contexto, la actividad industrial del hombre también produce sustancias cuyas aplicaciones repercuten benéficamente en su calidad de vida, pero, infortunadamente, muchas veces traen consigo gran cantidad de residuos dañinos que ponen en riesgo el medio ambiente.

Palabras Clave: contaminación ambiental, plomo, salud, adn.

Abstract

The relationship between environmental factors and health leads us to consider within the environmental problems those disorders stemming from air, soil and water pollution, as well as the results of drugs abuse, potentially harmful physical agents and chemical products. The threats to health multiply when certain commonly present agents manage to reach concentrations above the permissible by international safety standards; alternatively, affects the natural balance when

the man produces massively different chemical compounds, derived from the growing development of technology, giving rise to a steady accumulation of contaminants. In this context, the human industrial activity also produces substances whose applications beneficently impact their quality of life, but, unfortunately, often bring with them lots of harmful residues which endanger the environment.

Key Words: environmental pollution, lead, health, DNA.

Fecha recepción: Enero 2012

Fecha aceptación: Marzo 2012

Introducción

Entre los efectos adversos de dichos contaminantes sobresale el daño al material genético, constituyendo este un riesgo toxicológico que no ha sido valorado lo suficiente a pesar de sus repercusiones en la salud de los individuos afectados y sus descendientes. El daño inducido por estos agentes puede ser a nivel de las células somáticas y/o germinales. Cuando el efecto mutagénico tiene lugar en las células somáticas produce cambios en la información genética, con la aparición de células potencialmente malignas en el individuo. De manera alterna, si el daño genético tiene lugar en las células germinales, este se manifiesta en malformaciones y afectación fisiológica, alterando la capacidad y/o calidad reproductiva de la especie. Los residuos más agresivos para el medio ambiente, de acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental (EPA en Estados Unidos) y la Comunidad Económica Europea, son los metales pesados, figurando el plomo (Pb) y sus compuestos entre los primeros nueve de dicha clasificación. Otros metales, como el arsénico (As) y el cadmio (Cd) también se encuentran dentro de los más agresivos, al igual que el zinc (Zn), considerado altamente agresivo en situaciones especiales (De Blas, 1991). Se ha observado que niveles elevados de plomo se asocian a efectos neurotóxicos, nefrotóxicos, alteraciones hematológicas y de función reproductiva.

En la Comarca Lagunera, el desarrollo industrial y agrícola ha deteriorado de manera importante el medio ambiente de la región. La calidad de vida ha sido afectada en los aspectos arriba mencionados, siendo nuestro principal interés establecer la posible relación entre los agentes contaminantes, principalmente el Pb, y la infertilidad en varones expuestos por su actividad a dicho ambiente.

La región Lagunera, ubicada en la parte central y al norte de México comprende 11 municipios (áreas urbana, suburbana y rural), repartidas entre los estados de Durango y Coahuila. Hace tiempo esta región se ha desarrollado de manera muy importante en el ámbito agropecuario e industrial; sus condiciones orográficas han disminuido la calidad de vida de sus habitantes. Los factores asociados al origen de estos problemas no han sido plenamente descritos ni mucho menos analizados los procesos en el ámbito celular y molecular. Algunas causas del deterioro del ambiente en la región ya se conocen; por ejemplo, la producción lechera y la de carne y forrajes, las cuales están entre las más importantes del país. Ambas han abatido los mantos freáticos en la parte baja de la cuenca endorreica de la laguna, contaminando incluso el agua potable con arsénico; Por otro lado, la ubicación de la cuarta planta metalúrgica más grande del mundo en el centro de Torreón, Coahuila, principal productora de plata en el mundo y en Latinoamérica de oro, plomo y zinc, ha ocasionado una impresionante contaminación, la cual se ha acentuado gravemente en los últimos meses por la elevada emisión de metales pesados como el plomo al medio ambiente. Dichos factores han provocado múltiples problemas en la salud y calidad de vida de los habitantes de esta región.

Uno de los problemas de interés primordial es la capacidad de reproducción humana. El sistema reproductivo en el hombre es específicamente vulnerable al medio ambiente por los graves problemas que impactan el entorno, derivados del crecimiento y desarrollo de los pueblos. No obstante, también un gran número de daños reproductivos en el humano se deben a causas de orden endémico en el ambiente, y en el que generalmente influyen factores culturales, religiosos, políticos y socioeconómicos.

Para justificar este tipo de trabajos se muestra que los individuos que han sido expuestos a metales pesados como el Pb, presentan daño a su ADN, tienen una calidad espermática deficiente, con una serie de anomalías en la evaluación de la calidad seminal o una combinación de varias de estas. Por tal motivo, es imperante y prioritario establecer primero la asociación del efecto del Pb con las células que inician el proceso espermatogénico, así como con los parámetros de la calidad reproductiva.

Por otro lado, es urgente aportar datos que relacionen factores de exposición con el daño genético, ya que esta región muestra un elevado índice de malformaciones congénitas y genéticas. La integridad del ADN del espermatozoide es esencial para la transmisión exacta de la información genética y, por lo tanto, para la buena salud de las generaciones futuras. Asimismo, es importante incluir el ensayo cometa como parámetro complementario de la espermatobioscopía. El objetivo de este trabajo es mostrar los resultados de investigación realizados en el Departamento de Biología Celular y Ultraestructura del Centro de investigación Biomédica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Coahuila, Unidad Torreón, en colaboración con otros departamentos relacionados con el daño al ADN mediante el ensayo cometa en células espermáticas, así como la calidad espermática de individuos ocupacionalmente expuestos al plomo.

ANTECEDENTES

Espermatogénesis. El aparato reproductor masculino comprende básicamente los testículos, los conductos (epidídimo y conducto deferente), las glándulas accesorias (vesículas seminales, próstata y glándulas bulbo uretrales) y el pene (Guyton y Hall, 1996). En el testículo se localizan las células de Leyding, las cuales son estimuladas por la hormona luteinizante (LH) (secretada por la pituitaria) para la síntesis de testosterona (T). También se localizan las células de Sertoli, células que secretan factores de crecimiento y que proporcionan un soporte físico a las células germinales para su desarrollo, además, las células Sertoli son estimuladas por la hormona folículo estimulante (FSH) para sintetizar y proveer de elementos nutricionales que son necesarios durante el desarrollo de los espermatozoides. En testículo también se localizan las células germinales, las cuales mediante el proceso de espermatogénesis se dividen y se diferencian en espermatozoides (Guyton y Hall, 1996). La espermatogénesis es un proceso cíclico que tiene un tiempo de duración de 74 días en el hombre.

Este proceso consta de 3 fases:

Divisiones mitóticas sucesivas de las espermatogonias para dar lugar a los espermatocitos (espermacitogénesis).

Meiosis de los espermatocitos para dar lugar a las espermátides haploides (meiosis).

Diferenciación morfológica de las espermátides en espermatozoides (espermiogénesis).

Durante la espermiogénesis, las espermátides redondas realizan cambios morfológicos que incluyen: la pérdida del citoplasma, la formación del acrosoma, el crecimiento de la cola y el

desarrollo de un núcleo condensado con actividades replicacionales, transcripcionales y de reparación disminuidas (Guyton y Hall, 1996).

En la fase final de la espermiogénesis se lleva a cabo la condensación de la cromatina, proceso en el cual las protaminas básicas ricas en arginina y cisteína, empaquetan al ADN del núcleo del espermatozoide (Balhorn, 1982). Las protaminas reemplazan a las histonas somáticas en 85-90 %, por lo que el espermatozoide maduro permanece una cantidad mínima de histonas (10-15 %) (Gatewood y col, 1987). La cromatina, además de ser condensada, es estabilizada por la formación de puentes bisulfuro entre los residuos de cisteína de las protaminas, cuando el espermatozoide pasa a través del epidídimo (Calvin y Bedford, 1971). Con la condensación de la cromatina y la estabilización de la misma, el espermatozoide adquiere el potencial de fertilización (Saowaros y Panyim, 1979; Manfredi y col, 1986). Cuando ocurre el proceso de eyaculación, los espermatozoides son expulsados del epidídimo y del conducto deferente e inmediatamente la próstata y las vesículas seminales excretan su contenido para contribuir con el volumen del líquido seminal (Setchell y Brooks, 1988). El líquido seminal secretado por la próstata es rico en zinc (Zn), ácido cítrico y fosfatasa ácida, mientras que el líquido secretado por las vesículas seminales contiene fructuosa y proteínas de alto peso molecular (PAPM) (Arver, 1982; Björndahl y col, 1991). Un aspecto muy importante que el zinc prostático se incorpora al núcleo del espermatozoide y mantiene en estado reducido a los grupos tioles de las protaminas que no forman puentes bisulfuro; con ello, este ion mantiene la condensación normal de la cromatina (Kvist, 1980^a).

Función testicular. El testículo o gónada masculina es estimulado por la síntesis y la estimulación de la gonotrofinas LH y FSH, que tiene un ritmo de secreción nocturno, inicialmente relacionado con el sueño. Estas hormonas estimulan el testículo para que dé comienzo a sus dos funciones: ESTEROIDIOGÉNESIS: con predominio en la producción de andrógenos, que propician la aparición de las características sexuales secundarias, como son crecimiento y desarrollo del pene y testículos, pigmentación y aparición de rugosidades en el escroto, crecimiento del vello púbico y auxiliar en diversas regiones corporales incluyendo la cara, inicio del impulso sexual, engrosamiento de la voz, crecimiento de la laringe, desarrollo muscular, aparición de la línea de calvicie frontal, capacidad de tener erección peneana, eyacular, etcétera, y con contribución de la hormona del crecimiento (GH), que estimula la producción principalmente hepática del factor insulinoide de crecimiento tipo I, actuando este sobre los cartílagos de crecimiento, ocasionando el pico de crecimiento característico en la pubertad; la otra función es: GERMINAL: Se inicia la

multiplicación y maduración de las células germinales, ciclo conocido como espermatogénesis. Durante el evento eyaculatorio, que es dependiente de testosterona, se expulsará el semen para que sea depositado en el tracto genital femenino con el fin de que suceda la fecundación y, de esta forma, preservar la especie (Ayala, 1995).

Biología del espermatozoide. La formación del espermatozoide se inicia en la espermatogénesis, la cual es regulada hormonalmente; La hormona Luteinizante (LH) actúa sobre las células de Leydig y regula la producción de andrógenos, la hormona foliculoestimulante (FSH) actúa sobre la célula de Sertoli y su papel en la espermatogénesis (diferenciación de las espermátides), durante el primer evento, para el mantenimiento de la espermatogénesis no es esencial la testosterona. (Bujan, 1988).

Maduración espermática. Los espermatozoides de los mamíferos adquieren la capacidad de fertilizar el óvulo y su motilidad al pasar a través del epidídimo, estos experimentan cambios en la forma de patrones metabólicos al unirse a la zona pelúcida. Los avances en investigación han demostrado que la motilidad de un espermatozoide maduro es regulado por los iones de calcio, AMP cíclico, adenosina y el pH intracelular y que estos factores interactúan entre sí (Ayala, 1995).

PLOMO

Distribución y acumulación. El plomo no se distribuye homogéneamente en el organismo, sino que es distribuido en varios compartimentos interrelacionados: 1) plomo en sangre (PbS), el cual contribuye con el 1 % de la carga corporal con un porcentaje alto en los eritrocitos, representa una exposición reciente ya que la vida media del PbS es solo de 36 días, 2) plomo en tejidos blandos como el riñón y el sistema nervioso, que es el responsable de la mayoría de los efectos tóxicos del plomo y 3) plomo en hueso, el cual es el principal componente en la carga corporal, representando 95 % en el adulto y 70 % en niños. El plomo en hueso representa la diferencia entre la absorción acumulativa en todas las fuentes de exposición al plomo y la excreción total del mismo, es decir, representa una exposición crónica. (ATSDR, 1999). La distribución del Pb en los órganos sexuales aún se desconoce, pero se ha observado que el Pb se acumula en vesículas seminales, en próstata, epidídimo y testículos (Johansson y Wide, 198; Oldereid 1993; Batra et al., 1998).

Efectos tóxicos por exposición a plomo. El plomo es el metal más ubicuo y es detectable en prácticamente todos los ecosistemas y en todos los sistemas biológicos; de acuerdo a un estudio realizado en Latinoamérica y el Caribe, la exposición a plomo todavía constituye un problema de salud en la región, desafortunadamente existe muy poca literatura disponible para evaluar el grado del problema de la exposición a plomo en nuestro país asociada a la problemática reproductiva.

La principal preocupación es erradicar la exposición de la población infantil a este metal, aunque se ha reconocido como un problema de salud también para los adultos, particularmente en la industria. La exposición al plomo en Latinoamérica incluye la minería, la fundición y la refinación, la producción y uso de cerámica vidriada, la reutilización y reciclaje de baterías y en aquellos países donde aún se usa gasolina con plomo, esta representa una fuente de exposición ambiental.

Latinoamérica (particularmente México y Perú) contribuye con el 14 % de la producción mundial de plomo. En México están algunas de las principales minas y una de las fundidoras primarias más grandes localizada en el noreste del país (más de 100 000 toneladas), además de algunas fundidoras secundarias (Romieu et al., 1997).

Los efectos tóxicos del plomo se observan prácticamente en todos los órganos y muchos procesos bioquímicos, entre los que podemos mencionar el sistema nervioso central y periférico, riñón, síntesis del grupo hemo, sistema cardiovascular, reproductivo y gástrico (Goyer, 1996). A pesar de la falta de estudios en el humano, estudios en animales revelan que algunos compuestos inorgánicos de plomo son potentes carcinógenos para el hombre, en especial para el riñón. Los efectos críticos o sensibles se presentan en poblaciones infantiles e involucran al sistema nervioso central, mientras que en los adultos con exposición ocupacional excesiva se presentan neuropatías y/o nefropatías crónicas, aunque el efecto más crítico puede ser la hipertensión. Las primeras alteraciones bioquímicas que se demostraron fueron en el sistema hematopoyético.

El plomo inhibe dos enzimas de la ruta biosintética del grupo hemo, la deshidratasa del ácido delta-aminolevulínico (ALAD) y la ferroquelatasa; los efectos en la síntesis del grupo hemo proporcionan indicadores bioquímicos de exposición al plomo en ausencia de efectos detectables.

La biodisponibilidad y actividad tóxica del plomo parecen estar reguladas por su interacción con proteínas con alta afinidad por el mismo, tanto ricas en el grupo sulfhídrico, como en grupos carboxilo (Goering, 1993).

La actividad de un gran número de enzimas, incluyendo las enzimas de la ruta biosintéticas del grupo hemo (Quintanilla-Vega et al., 1995), proteínas constitutivas como las protaminas

nucleares del espermatozoide (Quintanilla-Vega et al., 1999a) y enzimas dependientes de la calmodulina (Goering, 1993), se ven inhibidas por la afinidad del plomo por los grupos sulfhídrico y carboxilo de los residuos de cisteína y ácido glutámico y aspártico, respectivamente. La afinidad del plomo por proteínas también parece determinar la susceptibilidad por exposición al mismo. Se puede mencionar a la proteína eritrocitaria que se ha descrito que participa en la “protección” a la toxicidad del plomo (Raghavan et al., 1980; Calderón-Salinas et al., 1991), la enzima ALAD (Wetmur et al., 1998) y proteínas cerebrales (Quintanilla-Vega et al., 1995b) y renales (Smith et al., 1998) que pueden tener un papel en la susceptibilidad individual a este metal. El plomo es el principal contaminante en áreas cercanas a industrias relacionadas con la refinación y fundición del mismo, pero otros metales también se presentan como contaminantes, entre ellos el cadmio, el arsénico y zinc.

Efectos tóxicos sobre la reproducción masculina por exposición a plomo. El sistema reproductor masculino es muy vulnerable a exposiciones físicas y químicas, pero el papel específico de los factores ambientales y ocupacionales en la etiología de la infertilidad masculina no está bien determinado. La asociación entre la exposición laboral al plomo y fallas reproductivas fue la primera observación en asociar efectos adversos en la reproducción por exposiciones laborales (Lancranjan et al., 1975). Sin embargo, no fue hasta principios de la década de los noventa que el potencial de la exposición paterna en el desarrollo de la progenie recibió atención. Se sabe que el plomo altera la función reproductiva, tanto masculina como femenina, aunque los mecanismos no son claros completamente. Los efectos del plomo sobre la reproducción y el desarrollo son dependientes del sexo y parecen involucrar múltiples sitios en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, ocasionando niveles alterados de hormonas (Sokol, 1987) y cambios en las características y función de los espermatozoides, aun a concentraciones de plomo en sangre por debajo del límite aceptado por ambientes laborales (Lerda, 1992, Hernández-Ochoa et al., 2001, Morán-Martínez et al., 2004; Hernández-Ochoa et al., 2005).

Tabla 1.- Estudios que muestran la asociación del plomo y su efecto en la calidad espermática

Estudio	Resultado	Referencia
Trabajadores de fábrica de baterías, técnicos, oficinistas (23 vs 74µg/dl)	↓ motilidad ↓ concentración	Lancranjan <i>et al.</i> , 1975
Trabajadores de fábrica de baterías (23 vs 49 µg/dl)	↓ volumen y motilidad ↓ concentración	Lerda <i>et al.</i> , 1992
Trabajadores de fábrica de baterías (22vs79 µg/dl)	↓ concentración de espermatozoides sin daño endócrino	Assenato <i>et al.</i> , 1987
Trabajadores industriales (10-37 µg/dl)	↓ motilidad, viabilidad y concentración sin daño endócrino	Telisman <i>et al.</i> , 2000
Trabajadores de una fundidora de Pb (17 vs 73µg/dl)	↓ Testosterona ↑ LH	Rodamilans <i>et al.</i> , 1988
No específica (17-77µg/dl)	↓ LH ↑ FSH	McGregor <i>et al.</i> , 1990
Trabajadores de una fábrica de baterías (9.6-77µg/dl)	↑ LH-FSH ↓ Testosterona/ años de ocupación	Ng <i>et al.</i> , 1991
Trabajadores de fábrica de baterías	↓ motilidad	Viskum S. et al 1999
Trabajadores de una fundidora de Pb (15-40 µg/dl)	↓ Motilidad ↓ Concentración total	Alexandre BH et al 1996

Aunque los efectos deletéreos del plomo sobre la reproducción masculina se conocen desde hace décadas (Winder, 1993), sus mecanismos de acción siguen siendo contradictorios. Mientras que algunos estudios sugieren un efecto directo sobre los testículos, provocando una disminución y alteración en la producción de semen, morfología y motilidad (Assenato *et al.*, 1987; El-Zohairy *et al.*, 1996; Lerda, 1992), otros estudios muestran evidencias de efectos en el ámbito central en el eje hipotálamo-pituitaria, causando una alteración hormonal (Gustafson *et al.*, 1989).

También hay controversia en los estudios en animales para evaluar los efectos adversos del plomo. Mientras que los parámetros de rutina para evaluar la calidad del semen (concentración, motilidad y cambios morfológicos) están afectados en la mayoría de los casos, algunos autores presentan resultados que soportan la hipótesis de que el plomo ejerce sus efectos tóxicos a nivel del eje hipotálamo-pituitaria (Sokol, 1987). Aunque no hay una asociación consistente entre la incidencia de abortos espontáneos y exposición paterna a plomo, se ha observado en algunos estudios un incremento en el riesgo de abortos cuando el padre se expone antes de la concepción (Lindbohom *et al.*, 1991). A pesar de que no está clara la participación paterna en los problemas de reproducción, resultados en animales muestran claramente una disminución en la habilidad de

espermatozoides tratados con plomo para fecundar el óvulo (Sokol et al, 1994) y/o una pérdida en la implantación del huevo fecundado (Johansson L. Wide, 1986).

DAÑO GENÉTICO. Estudios publicados indican que la exposición a xenobióticos puede causar alteraciones en la conducta sexual y contribuyen a la incidencia de subfecundidad, infertilidad, muertes fetales, retardo en el crecimiento fetal, daño fetal intrauterino, defectos al nacimiento y falla ovárica o testicular. No se conoce la extensión en la cual el ambiente afecta adversamente la salud reproductiva del humano (Jacobs, 1992; Giorlandino et al., 1998). En los últimos años, gran atención ha sido enfocada sobre el potencial de un rango amplio de xenobióticos para interactuar y alterar la homeostasis genética (Lahdetie et al., 1999). Por otro lado, en la fase final de la espermatogénesis se lleva a cabo la condensación de la cromatina, proceso en el cual las proteínas básicas ricas en arginina y cisteína, empaquetan al ADN del núcleo del espermatozoide (Balhorn, 1982), reemplazando a las somáticas en 85-90 %, quedando una cantidad mínima de histonas (10-15 %) (Gatewood et al., 1987). Con la condensación de la cromatina y la estabilización de la misma por la formación de puentes bisulfuro entre los residuos de cisteína de las protaminas, los espermatozoides adquieren el potencial de fertilización durante su paso a través del epidídimo (Saowaros y Panyim, 1979; Manfredi et al., 1986). Por otro lado, en el proceso de eyaculación, los espermatozoides son expulsados del epidídimo y del conducto deferente; y la próstata y las vesículas seminales secretan su contenido contribuyendo con el volumen del líquido seminal (Stachell y Brooks, 1988). El líquido de la próstata es rico en zinc, este se incorpora al núcleo del espermatozoide, reduciendo a los grupos tioles de los residuos de cisteína de las protaminas que no forman puentes bisulfuro y, por lo tanto, mantiene la condensación normal de la cromatina (Kvist, 1980^a). Por ello, la cantidad de Zn unido a estas protaminas es considerada como el índice de la capacidad quelante del líquido seminal y como una medida de la biodisponibilidad del Zn libre que puede incorporarse al espermatozoide (Bjorndahl et al, 1991).

Daño al ADN espermático. Cada vez más, la integridad del ADN espermático es reconocida como una medida independiente de su calidad. La integridad del ADN del espermatozoide es de vital importancia en el inicio y mantenimiento de un embarazo a término tanto *in vivo* como *in vitro*. El estudio rutinario del semen no identifica defectos en la arquitectura de la cromatina espermática. La evaluación de la integridad del ADN en el espermatozoide, además del estudio de los parámetros sistemáticos seminales, podría aportar una información adicional acerca de la calidad del espermatozoide. Esto podría aliviar los problemas sociales y emocionales asociados

con los intentos fallidos en las técnicas de reproducción asistida. La infertilidad afecta al 15-20 % de las parejas, y en aproximadamente la mitad de los casos, es de origen masculino. El análisis del semen en el que se miden concentración, pH, volumen, movilidad y normalidad morfológica de los espermatozoides, y que continúa siendo la prueba clínica más importante para predecir infertilidad, no revela defectos en el espermatozoide que afecten la integridad del genoma masculino. Existen muchas evidencias que indican una correlación negativa entre las alteraciones en la organización del material genómico del ADN del espermatozoide y su potencial de fertilización, tanto *in vivo* como *in vitro*. Esto enfatiza el hecho de que la estabilidad del ADN, que es capaz de descondensarse en el momento justo del proceso de fertilización, es uno de los criterios a tener en cuenta al considerar si un espermatozoide es fértil o no. (Lopes S, et al., 1998; Aitken R, Krausz C, 2001). Los pacientes pueden tener espermigramas normales y seguir siendo infértiles, pues el origen de la infertilidad puede ser por la presencia de un ADN del espermatozoide anómalo, factor que no se mide de forma sistemática. La integridad del ADN en el espermatozoide se puede considerar como un parámetro independiente e indicativo de su calidad. (Sun JG et al., 1997).

2.3.2 ¿Qué es ADN espermático normal? El ADN espermático está organizado de forma tal que mantiene la cromatina compacta y estable. Esta organización del ADN no solo permite que se encuentre muy bien empaquetado el material genético para ser transferido al huevo, sino que asegura que el ADN sea entregado en una forma física y química tal que contribuya al desarrollo del embrión haciendo más accesible la información genética. El esperma fértil tiene un ADN estable, el cual es capaz de descondensarse en el momento apropiado del proceso de la fertilización y transmitir el ADN sin defectos. (Ward WS et al., 1991).

Origen del daño al ADN de espermatozoides. El origen de las lesiones en el ADN del espermatozoide puede deberse a múltiples causas, como son la presencia de una enfermedad, uso de fármacos, fiebre alta, temperatura testicular elevada, contaminación atmosférica, el tabaquismo, los varicoceles, los factores hormonales, o una edad avanzada. El mecanismo molecular implicado en estas lesiones se encuentra aún bajo intensa investigación. Los principales mecanismos en consideración son: empaquetamiento anormal del ADN espermático durante el proceso de espermatogénesis. (Carrell DT and Liu L., 2001) (Cho C. et al., 2003)

Empaquetamiento anormal del ADN espermático. Este empaquetamiento anómalo podría resultar en defectos en la conformación de la cromatina y en fragmentación de ADN en los espermatozoides. Para que se produzca el empaquetamiento de la cromatina del espermatozoide, es necesaria la actividad de nucleasas endógenas que corten y ligen el ADN durante su

protaminación (Sakkas D., et al., 1999). Estos cortes proporcionarían una liberación de estrés torsional que ayuda al empaquetamiento de la cromatina durante el cambio de las histonas por las protaminas. Anomalías en el control de este proceso podrían resultar en brechas de ADN, no reparadas. Estas alteraciones se producirían antes de la espermiación.

Fragmentación del ADN en el espermatozoide. Entre todos los parámetros que se estudian para determinar la calidad seminal, existe uno que ha despertado un gran interés en los últimos años: la Fragmentación de la molécula de ADN en los Gametos masculinos (FAG). Este parámetro tiene un notable interés dado que la transferencia de la molécula de ADN íntegra e intacta desde el espermatozoide al óvulo, es esencial para conseguir la gestación de un individuo normal. Las células de los organismos eucariotas tienen en su núcleo una larga molécula de ADN en la que se recoge toda la información necesaria para el desarrollo del individuo. Cualquier error en su estructura, por ejemplo, la pérdida de continuidad en el ADN por presentar roturas, acarreará problemas de difícil solución. En su estado natural, esta molécula larga de ADN es discontinua debido a que, en los núcleos de cualquier célula, la información genética está compartimentalizada en elementos discretos que conocemos como cromosomas. Por lo tanto, el ADN nuclear presenta una serie de discontinuidades equivalente a roturas de la doble cadena, o “roturas biológicamente correctas”. Los extremos de rotura están sellados por unas estructuras de ADN y proteínas específicas que cumplen la misión de dar autonomía a cada cromosoma, los telómeros. Es decir, un núcleo diploide, en el que su ADN se haya replicado para posteriormente generar dos nuevas células, deberá presentar $4xn$ “roturas biológicamente correctas”, siendo n = número de cromosomas de la especie en cuestión. Un ejemplo, en el caso de los humanos, donde cada núcleo presenta 46 cromosomas, si estos están replicados, existirán 184 “roturas biológicamente correctas” o 184 telómeros por célula. Tan solo una rotura extra de la doble cadena, no estabilizada por los mecanismos de reparación en cualquier cromosoma en cualquier lugar del ADN, puede entrañar problemas a la célula que lo presente. En otras palabras, las roturas de doble cadena que se producen y persisten en el ADN son fuertes condicionantes de la estabilidad de los cromosomas en las siguientes divisiones celulares y si estas se presentan en los espermatozoides, pueden ser transmitidas en el momento de la fecundación. (J. Gonsálvez et al., 2007)

Evaluación del daño genético. En este sentido, algunas de las estrategias para medir exposición por metales y daño genético para células espermáticas, son mediante la evaluación por la aparición de problemas de descondensación de la cromatina espermática y por el porcentaje de teratospermia en las muestras de estudio. La condensación de la cromatina durante la espermiogénesis está dada con el resultado de las características morfológicas de la cabeza del espermatozoide y esto sugiere que la morfología nuclear espermática es también un indicador o está asociado a la organización de la cromatina, aspecto fuertemente ligado a la fertilidad (Ward and Coffey 1999). La susceptibilidad del ADN nuclear espermático a tóxicos o inducción ácida de la desnaturalización se relaciona inversamente a la integridad estructural de la cromatina (Evenson et al., 1980).

ANTECEDENTES REGIONALES. Estudios preliminares por el grupo de la Universidad Autónoma de Coahuila (Morán Martínez., 1998) en individuos que residían en la vecindad de la zona metalúrgica de Torreón, Coahuila, han encontrado que estos individuos presentan niveles más altos de plomo en líquido seminal y un porcentaje menor de motilidad y viabilidad de los espermatozoides que en un grupo control. De igual manera, los niveles de zinc en el líquido seminal fueron significativamente más elevados, sugiriendo que un incremento en la concentración de zinc en el semen también puede alterar la calidad del mismo (Morán Martínez et al., 1999a; Morán Martínez et al., 1999b). Por otro lado, en el estudio piloto en las zonas con hidroarsenicismo regional endémico en la región lagunera, descrito por Morán Martínez et al., (1999, 1993), se encontró que las concentraciones de arsénico en orina fueron significativamente superiores al compararlas con un grupo control. Los sujetos de este grupo expuesto a arsénico presentaron una calidad deficiente en concentración, motilidad y viabilidad de los espermatozoides (Morán Martínez et al., 1993). También la medición de algunas enzimas como la fosfatasa ácida en el líquido seminal de estos sujetos fue modificada significativamente en el grupo expuesto al compararla con el grupo control (Morán Martínez et al., 1999). Existen otros factores importantes de estudio o análisis en nuestra región, los cuales contribuyen de manera importante al deterioro de la salud reproductiva, por ejemplo: a) embarazo en adolescentes (10-23 años de edad), b) enfermedades de transmisión sexual, c) prevalencia de enfermedades congénitas. En México, 2.4 de cada 100 nacimientos se asocian con malformaciones congénitas. En el estado de Coahuila se rebasa el promedio nacional con un 3.4 de cada 100. Las malformaciones más comunes son defectos del cierre del tubo neural, d) alta incidencia de malformaciones

genitourinarias y e) infertilidad (Leke et al., 1993). Esto es indicativo de la necesidad de desarrollar una estrategia de estudio integral que aporte soluciones y pautas de prevención a la problemática presentada.

MATERIALES Y MÉTODO

Diseño del estudio

Un primer grupo de estudio (GNE), fue el no expuesto a plomo. Para esto, se realizó un estudio epidemiológico transversal, donde los individuos participantes fueron aquellos que viven en las tres ciudades principales de la Región Lagunera (Torreón en el Estado de Coahuila, Gómez Palacio y Lerdo en el Estado de Durango). Los individuos incluidos fueron residentes de las colonias que son consideradas como zonas de baja exposición, de acuerdo a su localización en contra o a favor de los vientos dominantes de la región. Para determinar el número de muestras a estudiar, se tomaron en cuenta los resultados del estudio preliminar realizado en esta misma región por Morán-Martínez et al., en 1998, donde participaron 21 individuos de alta exposición y 27 de baja exposición con una motilidad espermática de 49 % y 67 % respectivamente. De acuerdo a la diferencia de medias encontrada en este parámetro de calidad de semen, el número de muestra calculada fue de 76 individuos, de los cuales se tomaron 15 muestras congeladas para la determinación del daño al ADN en espermatozoides. La elección de los participantes para este primer grupo fue por invitación, realizando visitas domiciliarias en las colonias seleccionadas. Dentro de los criterios de inclusión fueron considerados: el otorgamiento del consentimiento informado para participar en el estudio, un mínimo de 2 años de residencia en el lugar, que nieguen hábitos de fumar o beber alcohol y que no tengan actividades en zonas potenciales de exposición a otros contaminantes, por ejemplo, actividades agrícolas o en industrias cementeras o cromadoras.

Un segundo grupo de estudio (GE), fue el conformado por trabajadores de la planta metalúrgica Peñoles; considerando que existen disposiciones para impedir la participación en cualquier tipo de estudio por la parte patronal a los trabajadores de la planta, el número de varones fue sujeta a la labor de convencimiento y resaltando la importancia de los resultados que se obtendrían con la participación de los trabajadores en la investigación. Los trabajadores fueron invitados personalmente mediante visitas domiciliarias; deberían tener al menos 2 años de laborar dentro de la planta, dar su consentimiento por escrito y negar hábitos de fumar o beber alcohol. El número de la muestra calculada fue de 67, de los cuales se tomaron 22 para determinar el daño al ADN.

Muestreo y almacenamiento de las muestras biológicas. Cada sujeto participante proporcionó una muestra de sangre y una muestra de semen dentro de un intervalo de tiempo no mayor de una semana. Las muestras de sangre, extraídas por venopunción (aproximadamente 5 mL), así como la obtención de suero sanguíneo se almacenaron a 20°C hasta su uso para la determinación de los metales pesados. Las muestras de semen se obtuvieron por masturbación (con 3 a 7 días de abstinencia sexual o de no eyaculación) y se mantuvieron a una temperatura de 37°C para su análisis. Posteriormente, se tomó 1 millón de células de cada muestra, por centrifugación se separó el líquido seminal de las células y se almacenó a -70°C hasta su uso para la determinación de metales pesados en estos dos compartimentos, el resto de la muestra se almacenó a -70°C.

Análisis de semen. Se realizó dentro la primera hora después de la eyaculación siguiendo los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1992), evaluando varios parámetros que incluyen licuefacción, consistencia (viscosidad), volumen del eyaculado, pH, concentración de espermatozoides, motilidad, morfología y viabilidad espermáticas.

Licuefacción. En primer término se determinará la licuefacción, aspirando la muestra con una pipeta Pasteur observando la longitud del filamento. En una muestra normal el semen sale en pequeñas gotitas, en el caso de una licuefacción retardada (mayor de 20 min.), la gota forma un filamento mayor a 2 cm de longitud o permanece coagulada.

Volumen y Ph. Cuando la muestra licua por completo, se mide el volumen en tubos falcón de 15 mL. El pH se mide con una tira reactiva de pH.

Concentración. La concentración de espermatozoides se determinará por el método del hematocitómetro. Se prepara una dilución 1:20, mezclando 50 µL de semen con 950 µL de una solución de NaHCO₃ al 5% en formaldehído al 35 %. Para muestras que contenían menos de 20 x 10⁶ espermatozoides/mL, se empleó una dilución 1:10, mientras que para las muestras que contenían más de 100 x 10⁶ espermatozoides/mL, se usó una dilución 1:50. En cada lado del hematocitómetro (cámara de Neubauer 0.1 mm, Hausser Scientific, Gaithersburg, MD, EUA) se colocaron 10 µL de la mezcla previamente homogenizada, se dejaron en reposo por 7 min para garantizar la sedimentación de los espermatozoides y posteriormente se realizó el conteo de células por microscopía de contraste de fases (Microscopio Olympus Modelo BX40). La concentración de espermatozoides se realizó por duplicado con un coeficiente de variación (C.V.) <7 %.

Motilidad. Se evalúa por medio de un equipo analizador de motilidad (Motion Analysis Corporation, Cell Track Mod. VP 110, Sta. Rosa, CA, EUA). La muestra se coloca en el microscopio

(Olympus BH-2, con contraste de fases, Japan) anexo al equipo y la imagen será detectada por el analizador de imagen. Se evaluarán de 5 a 10 campos para tomar la lectura final. La determinación se realizará en el Departamento de Biología Celular y ultraestructura del Centro de Investigación Biomédica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Coahuila.

Viabilidad. Se evalúa en fresco por el método de exclusión con Eosina y al 0.5 % en solución fisiológica, el cual se basa en que las células muertas cuyas membranas plasmáticas están dañadas permiten la entrada del colorante. Se evaluaron 100 espermatozoides por microscopía de luz y se diferenciaron los espermatozoides vivos (no coloreados) de los muertos (coloreados).

EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN

Determinación de Pb en sangre. La determinación de Pb en sangre se realizó por voltimetría, utilizando un Voltámetro anódico (Anodic Stripping Volammetry, Mod. 3010 B, ESA Inc. Chelmsford, MA, EUA).

Determinación de Pb en líquido seminal. La evaluación cuantitativa de las concentraciones de Pb en líquido seminal se realizó en un espectrofotómetro de absorción atómica Pekín-Elmer 5100 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, EUA) equipado con horno de grafito (HGA-600), un corrector de fondo Zeeman (Perkin-Elmer 5100), una lámpara de cátodo hueco (Perkin-Elmer, Mod. Lumina) y un muestreador automático (Perkin-Elmer AS-60).

Evaluación del daño (ensayo cometa)

Preparación de laminillas. Preparar agarosa de punto de fusión normal al 5 %, adicionar a la laminilla 175 µl de Agarosa de punto de fusión normal por laminilla, y cubrirla inmediatamente con el dedo y dejarla secar.

Fijar células. Adicionar 75 µl de Agarosa LMP por laminilla, en un tubo Eppendorf con la muestra celular, (semen) 100,000 células, mezclar y colocar al portaobjetos que previamente ya tiene agarosa regular al 5 %, colocar un cubreobjetos y refrigerar durante 5 min., retirar cuidadosamente el cubreobjetos y sumergir la laminilla en solución de lisis a 4°C.

Lisis celular. 2.5 MNaCl, 100mM EDTA disódico, 10mM Tris base, DMSO 8 %, Triton X-100 (.8%) a 4°C mínimo 2 horas. Los siguientes pasos se realizan bajo luz amarilla: Sacar cuidadosamente la laminilla de la solución de lisis.

Electroforesis. Colocarla en una cámara de electroforesis horizontal a 4°C, cubrir la laminilla con buffer de electroforesis NaOH 300mM EDTA 1mM (pH 10) y dejarla durante 20 minutos en desenrollamiento (unwinding). Después de los 20 minutos encender la cámara de electroforesis

con 23 volts 300 miliamperes por 20 minutos. Una vez apagada la fuente de poder, retirar cuidadosamente las laminillas de la cámara de electroforesis.

Neutralización. Escurrir la laminilla del exceso de buffer de electroforesis y colocar las laminillas en un Köplin con buffer de neutralización Tris 0.4 M pH 7.5, dejarla por 5 minutos, escurrir la laminilla y sumergirla en un Köplin con alcohol absoluto por 5 minutos, sacar cuidadosamente y dejar secar.

Posteriormente, teñir con Bromuro de Etidio y observar en el microscopio de fluorescencia.

RESULTADOS

GRUPO NO EXPUESTO (GNE)

Características de la población estudiada. Las características generales de la población estudiada se muestran en la Tabla 1. Los rangos de masa corporal establecidos por Pérez de Gallo y Marvan Laborde (1996) (emaciación: <20, normal: 20-25 y sobrepeso: >25), indicaron que el 76.5 % de la población tenía sobrepeso. Respecto a los hábitos de fumar, consumo de drogas y de bebidas alcohólicas, el 72 % eran fumadores y el 28% no fumadores y solo el 65 % de los fumadores permanecía con el hábito al momento de la entrevista; el 91 % ingería bebidas alcohólicas, principalmente cerveza. Por último, para determinar el consumo de cafeína se asumió que una porción de refresco o café contenía la misma cantidad de cafeína.

Tabla 2.- Características generales del GNE

Característica	Sujetos estudiados
Edad (años) ^a	34 ± 8 (21-54)
Peso (kg) ^a	81.6 ± 16.7 (52-125)
Talla (m) ^a	1.71 ± 0.062 (1.55-1.93)
Índice de Quetelet ^a	27.8 ± 5.4 (17.6-57.4)
Emaciación (%)	2.9
Normal (%)	20.6
Sobrepeso (%)	76.5
Fumadores (%)	72.0
Fumadores actuales (%)	65.3
Consumidores de bebidas alcohólicas (%)	91.2
Consumidores de drogas (%)	5.9
Consumo de cafeína ^b	2.07 ± 1.98 (0 - 12)

^a Media aritmética ± desviación estándar. ^b Indica promedio de consumo por día de una porción de bebidas de refresco de cola y/o refresco de sabor y/o refresco dietético y/o de café. Los rangos se muestran entre paréntesis. n=15.

Calidad de semen. En la Tabla 2 se muestran los parámetros de calidad de semen. Al comparar las medias de cada parámetro de calidad de semen con los establecidos por la OMS (1992), se observa que se encuentran dentro de lo normal; sin embargo, parte de la población presentó algunos parámetros alterados, como la motilidad con mayor porcentaje de individuos con anormalidad (44 %), seguida por la morfología (35 %), el pH fue el menos afectado (1 %).

Tabla 3.- Parámetros de calidad de semen en individuos GNE

Parámetro	Media \pm DE	Rango	% Anormalidad ^a
Motilidad (%)	51.8 \pm 21.3	4-87	44
Viscosidad*	-	-	35
Morfología (%)	62.6 \pm 17	13-87	32
Volumen (mL)	2.7 \pm 1.3	0.7-6.4	21
Viabilidad (%)	67.4 \pm 16.5	17-94	12
Concentración (X10 ⁶ células/mL)	104.6 \pm 78.5	10-360	11
PH	8.2 \pm 0.3	7.5-9	1

^a Muestra el porcentaje de la población que presentó parámetros de calidad de semen por debajo de lo normal. Valores normales de acuerdo a la OMS (1992): Motilidad > 50 % móviles; morfología > 50% formas normales; volumen > 1.5 mL; viabilidad > 50 % vivos; concentración de espermatozoides > 20 x 10⁶ células/mL; pH 7.2-8.5. Este parámetro no presenta valor de medias y rango por la forma en la cual se evalúa.

Evaluación de la exposición a Pb. La media de los niveles de PbS fue de 9.21 \pm 3.22 μ g/dL con un rango de 1.9-24.4 μ g/dL. La media se encontró dentro del límite máximo permisible (10 μ g/dL) de acuerdo a la CDC (1991); sin embargo, se observó un amplio rango de concentraciones, donde el 40 % de los sujetos presentaron concentraciones de PbS > 10 μ g/dL.

Asociación entre los niveles de PbS y los indicadores de efecto. Para analizar las asociaciones entre los indicadores de exposición (variables independientes) y el efecto (variables dependientes), se realizó el análisis bivariado o regresión lineal simple. Los niveles de PbS no se asociaron significativamente con los parámetros de calidad de semen como se muestran en la Tabla 3. Del mismo modo, no se encontró una correlación entre la concentración de PbS (9.21 μ g/dL) y Pb en líquido seminal (4.13 μ gPb/dL), $p > 0.05$; $r = 0.2148$.

Tabla 4.- Análisis bivariado entre la calidad de semen y PbS en el GNE

Parámetro	β	P	r^2
Motilidad (%)	-0.633	0.271	0.0183
Morfología (%)	0.1125	0.808	0.0009
Viscosidad	-0.0101	0.437	0.0092
Volumen (mL)	-0.0428	0.227	0.0220
Viabilidad (%)	-854.87*	0.882	0.0003
Concentración (10^6 células/mL)	-0.0264 ^a	0.238	0.0210

El valor de β se presenta * al cubo y ^a en logaritmo.

GRUPO EXPUESTO (GE)

Características de la población estudiada. El promedio del tiempo de laborar en la planta fundidora de los trabajadores fue de 13.05 ± 6.80 años (rango 2-27 años). Las características generales de la población para este grupo de estudio se muestran en la tabla 6.

Tabla 6.- Características generales de la población estudiada en el GE

Característica	Sujetos estudiados
Edad (años) ^a	37.51 ± 92 (19-61)
Peso (kg) ^a	84.1 ± 20.2 (51.9-104)
Talla (m) ^a	1.76 ± 0.058 (1.59-1.98)
Índice de Quetelet ^a	29.5 ± 4.8 (19.3-61.1)
Emaciación (%)	3.0
Normal (%)	22.3
Sobrepeso (%)	64.8
Fumadores (%)	64.8
Fumadores actuales (%)	52.6
Consumidores de bebidas alcohólicas (%)	88.3
Consumidores de drogas (%)	6.6

Consumo de cafeína ^b	3.13 ± 1.77 (0 - 14)
---------------------------------	----------------------

^a Media aritmética ± desviación estándar. ^b Indica promedio de consumo por día de una porción de bebidas de refresco de cola y/o refresco de sabor y/o refresco dietético y/o de café. Los rangos se muestran entre paréntesis. n=22.

Calidad de semen. En la Tabla 7 se muestran los parámetros de calidad de semen. Al comparar las medias de cada parámetro de calidad de semen con los establecidos por la OMS (1992), observamos que algunos de los parámetros evaluados mostraron valores anormales. Por ejemplo, se observó una reducción importante en el número de células espermáticas del total de trabajadores (promedio 46.74X10⁶ cel/ml). Por otro lado, el 8.57 % y 17.14 % de los participantes presentaron azoospermia y oligospermia respectivamente. El 31.42 % de los sujetos presentó un decremento en la evaluación de la viabilidad espermática. La motilidad total mostró un decremento del 37.42 %. Un resultado importante fue el encontrado en la motilidad progresiva. En efecto, 71.42 % del total de los trabajadores presentaron este tipo de problema, la media de la motilidad progresiva en estos trabajadores fue de 20.24±17.17 μ/s (rango normal 25 μ/s) (tabla 8). Otro parámetro que presentó datos anormales fue la morfología (64%), el pH fue el menos afectado (5% de anormalidad).

Tabla 7.- Parámetros de calidad de semen en individuos ocupacionalmente expuestos

Parámetro	Media ± DE	Rango	% Anormalidad ^a
Motilidad (%)	62.58 ± 32.4	8 – 95	62
Viscosidad*	-	-	49
Morfología (%)	48.3 ± 12	13 – 87	64
Volumen (mL)	2.7 ± 1.3	0.7 - 6.4	26
Viabilidad (%)	68.58 ± 18.2	17 – 94	28
Concentración (10 ⁶ células/mL)	46.74 ± 41.2	10 – 360	38
PH	8.3 ± 0.3	7.5 – 9.5	5

^a Muestra el porcentaje de la población que presentó parámetros de calidad de semen por debajo de lo normal. Valores normales de acuerdo a la OMS (1992): Motilidad > 50 % móviles; morfología > 50 % formas normales; volumen > 1.5 mL; viabilidad > 50 % vivos; concentración de espermatozoides > 20 x 10⁶ células/mL; pH 7.2-8.5. Este parámetro no presenta valor de medias y rango por la forma en la cual se evalúa.

Motilidad espermática. La evaluación de la motilidad y velocidad celular realizada en el multianalizador para motilidad espermática, mostró diferencias estadísticas al comparar el GE y el GNE (Tabla 8). En efecto, la velocidad lineal en el GNE fue de 69.3±10.4 y de 38.7±12.9 en el GE (p<0.01). La motilidad progresiva fue de 29.1±6.2 μ/s en GNE y 17.3±4.8 μ/s en el GE (p<0.05).

Tabla 8.- Comparación de los tipos de motilidad en los espermatozoides en el GNE y el GE.

TIPO DE MOTILIDAD	GNE (μ/s)	GE (μ/s)	VALORES NORMALES*	P
VSL (Progresión)	29.1 \pm 6.2	17.3 \pm 4.8	25.0 μ/s	<0.001
VCL (Velocidad de trayectoria)	62.4 \pm 15.4	58.7 \pm 18.2	40.0 μ/s	>0.05
LIN (Linearidad)	69.3 \pm 10.4	38.7 \pm 12.9	40 μ/s	<0.001
ALH (Movimiento lateral de cabeza)	4.3 \pm 1.3	4.1 \pm 2.0	3.0 μ/s	>0.05
VAP (promedio de trayectoria)	42.8 \pm 9.2	18.3 \pm 3.9	35.0 μ/s	<0.001

* valores estandarizados Motion Analysis.

Evaluación de la exposición a Pb. La media de los niveles de PbS fue de 40.64 \pm 15.75 $\mu g/dL$ con un rango de 12.8 \pm 73 $\mu g/dL$. En nuestro país no existe ninguna norma que regule este tipo de metal en el organismo humano en exposición ocupacional. En Estados Unidos la norma establece un límite máximo para PbS de 40 $\mu g/dL$ (CDC (1991)). Basados en este dato, 57.14 % de los trabajadores presentaron concentraciones de este metal por arriba de 40 $\mu g/dL$. Por otro lado, las concentraciones de PbS y Pb en semen, mostraron diferencias estadísticamente significativas al compararse el GNE y GE, como se muestra en la tabla 9.

Tabla 9.- Concentración de plomo en sangre y semen en sujetos no expuestos y ocupacionalmente expuestos a Pb

MUESTRA	GNE	GE
SEMEN	2.76 ± .7734 µg/dL	4.13 ± 0.7015 µg/dL*
SANGRE	9.21 ± 3.22 µg/dL	40.64 ± 15.75 µg/dL**

*p< 0.05; **p< 0.001

Asociación entre los niveles de PbS y los indicadores de efecto. Para analizar las asociaciones entre los indicadores de exposición (variables independientes) y el efecto (variables dependientes), se realizó el análisis bivariado o regresión lineal simple. Los niveles de PbS se asociaron significativamente con algunos de los parámetros de calidad de semen como se muestran en la Tabla 10. Una correlación significativa fue la encontrada en el GE entre la concentración de PbS (40.64±15.75 µg/dL) y la concentración de Pb en líquido seminal (4.13±.7015 µg/dL), (p<0.001; r =0.924) (Figura 1).

Tabla 10.- Análisis bivariado entre la calidad de semen y niveles de plomo en el GE

Parámetro	β	P	r ²
Motilidad (%)	-0.128	0.017	0.0281
Morfología (%)	0.0924	0.020	0.0113
Viscosidad	-0.1132	0.518	0.0213
Volumen (mL)	-0.0352	0.149	0.0380
Viabilidad (%)	-432.61*	0.349	0.0112
Concentración (10 ⁶ células/mL)	-0.0301 ^a	0.043	0.0112

El valor de β se presenta * al cubo y ^a en logaritmo. P<0.05

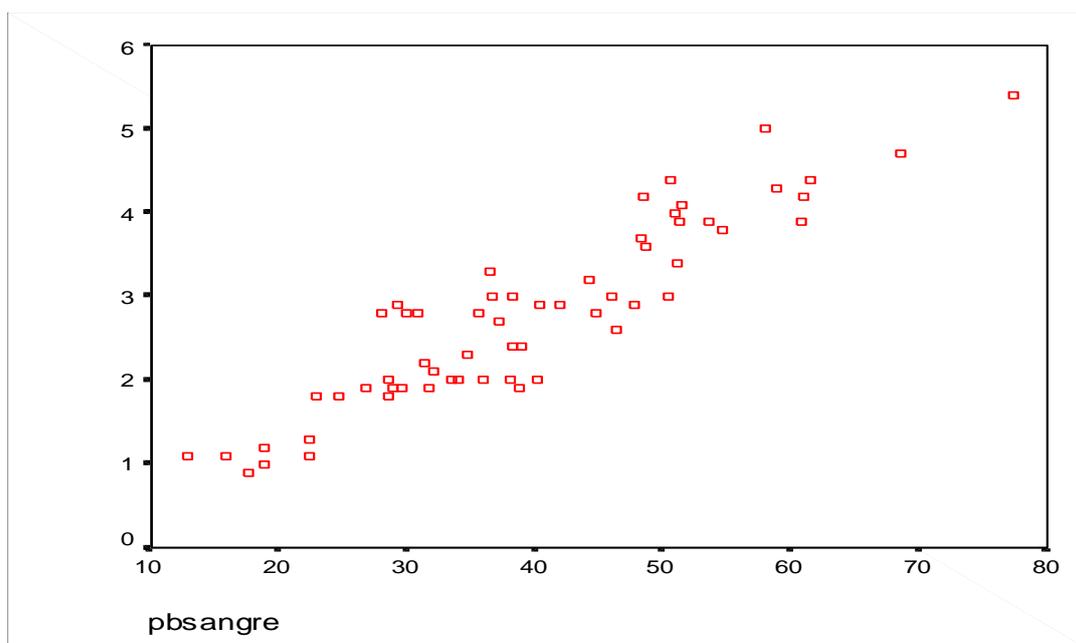


Figura 1.- Correlación entre la concentración de plomo en sangre y Pb en líquido seminal (µg/dL) en individuos ocupacionalmente expuestos ($p < 0.05$; $r = 0.573$).

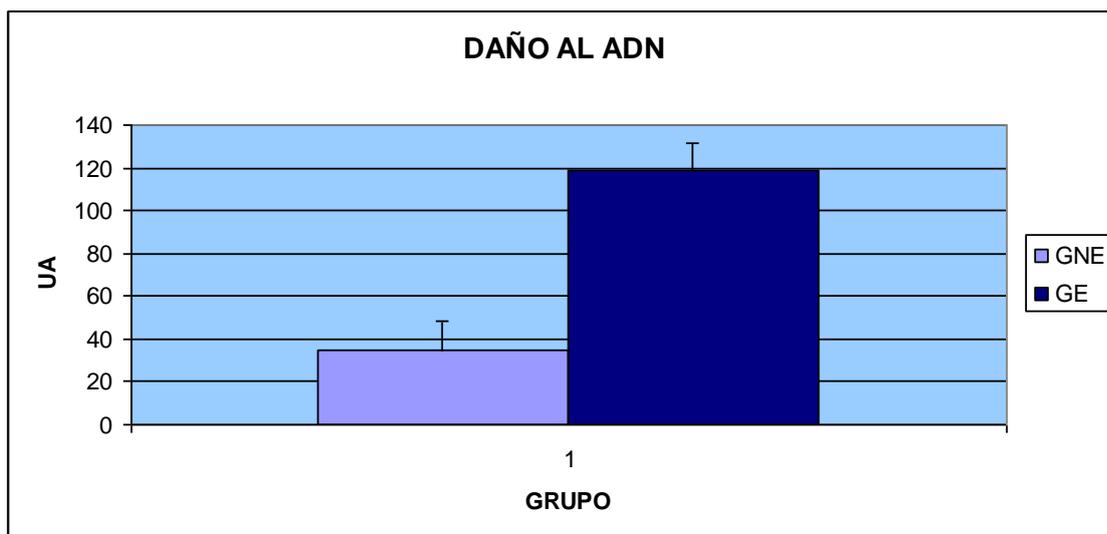
Morfología espermática. Los promedios encontrados para la determinación de la teratospermia en los grupos de estudio se muestran en la tabla 11. La característica morfológica deficiente determinada en la evaluación fue en la parte media de los espermatozoides (defectos de la parte media celular) encontrándose diferencias significativas en las comparaciones de los grupos. La característica denominada como gota citoplasmática fue el defecto que más predominó. GE=28.7 % y GNE 20 % ($p < 0.05$). Otro de los hallazgos importantes fue el encontrado para la característica de células espermáticas macrocéfalas encontrándose una diferencia significativa entre el GNE=11.2 % y GE=15 % ($p < 0.5$).

Tabla 11.- Comparación de la morfología espermática en los grupos de estudio

FORMA CELULAR	GNE	GE
NORMAL	62.6±17	48.3±12*
MACROCÉFALO	11.2%	15%
MICROCÉFALO	5 %	7%
DEFECTOS DE LA PARTE MEDIA	20 %	28.7%*
DOBLE CABEZA	1 %	1%
DOBLE COLA	0 %	0%

* $p < 0.05$

Asociación entre los niveles de PbS y el daño al ADN en los grupos estudiados. Con relación al análisis estadístico de los niveles de daño al ADN global en células espermáticas entre los grupos de estudio se encontró una diferencia altamente significativa con una $p > .0001$ (Figura 2).



En las tablas 12 y 13 se muestran los valores individuales de los niveles de daño al ADN por sujetos ocupacionalmente expuesto a Pb y GNE respectivamente.

Tabla 12.- Fragmentación del ADN global y por niveles de daño en las células espermáticas del GNE. Se muestra total de células evaluadas y promedio desviación estándar del promedio del daño total de ADN.

0	I	II	III	IV	TOTAL	FG
70	20	10			100	40
74	20	6			100	32
75	21	4			100	29
77	22	1			100	24
69	24	7			100	38
80	20				100	20
58	23	14	5		100	66
73	17	7	3		100	40
77	20	3			100	26
77	18	5			100	28
78	14	8			100	30
80	15	5			100	25
66	16	10	8		100	60
72	21	7			100	35
71	23	6			100	35
					promedio	35.2
					ds	12.79062156

FG= Fragmentación global de ADN

Tabla 13.- Fragmentación del ADN global y por niveles de daño en las células espermáticas del GE. Se muestra total de células evaluadas y promedio ± desviación estándar del promedio del daño total de ADN.

0	I	II	III	IV	TOTAL	FG
28	39	20	10	3	100	121
29	37	19	14	1	100	121
28	32	40			100	112
25	31	35	9		100	128
24	40	22	11	3	100	129
27	39	29	5		100	112
27	37	30	6		100	115
26	26	42	6		100	128
30	37	32	1		100	104
36	30	30	4		100	102
38	30	25	7		100	101
31	33	22	10	4	100	123
33	26	24	10	7	100	132
34	40	16	10		100	102
35	41	15	9		100	98
29	39	21	8	3	100	117
28	35	22	15		100	124
27	33	15	20	5	100	143
29	32	19	16	4	100	134
28	37	33	2		100	109
30	32	15	20	3	100	134
					Media	118.52381
					DS	12.8203707

FG= Fragmentación global de ADN

DISCUSIÓN

El ensayo del cometa en una prueba de genotoxicidad bien establecida, en la actualidad se lleva a cabo principalmente con las células somáticas de los diferentes órganos para detectar una actividad genotóxica de carcinógenos potenciales. Es considerado como una prueba útil para el seguimiento de la prueba de positivo o dudoso en los resultados de ensayos in vitro y para la evaluación de la genotoxicidad locales, sin embargo, el ensayo cometa también tiene el potencial para la detección de genotoxicidad en células germinales y se puede utilizar para demostrar la capacidad de una sustancia o de su(s) metabolito(s) de interactuar directamente con el material genético de las células germinales. Estos resultados son importantes para la clasificación de los mutágenos de células germinales, por ejemplo, en el contexto del "Sistema Mundialmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SMA). La literatura contiene los resultados de estudios in vitro, estudios ex vivo e in vivo, en lo que respecta a la evaluación de genotoxicidad en células germinales, solo los estudios in vivo son importantes, pero el otro tipo de

estudios proporcionaron información importante sobre diversos aspectos de la metodología. Muchos estudios de ensayo cometa con esperma humano se han realizado en el contexto de la infertilidad masculina y la fertilización asistida, los diversos aspectos de las modificaciones de ensayo utilizado se discuten.

Medir los efectos de ADN por el ensayo cometa en el esperma requiere pasos adicionales para la descondensación de la cromatina, muchas modificaciones diferentes de las alcalinas y el ensayo cometa neutro están en uso sin un protocolo estándar establecido todavía. Los niveles altos y variables de fondo de los efectos de ADN fueron notificados y todavía hay necesidad de estandarización y validación de la prueba del cometa con el espermatozoide. Algunos estudios de biomonitoreo humano con esperma humano se publicaron, pero parece ser prematuro utilizar estos datos para la identificación del peligro y clasificación de los productos químicos, por el contrario, en condiciones alcalinas estándar en el ensayo in vivo del cometa se puede adaptar fácilmente a las investigaciones con células de los órganos reproductivos. Sin embargo, los estudios para estandarizar y validar estos métodos son necesarios antes de que la prueba del cometa puede aplicarse de manera útil en la evaluación del riesgo de agentes mutágenos de células germinales. En este trabajo de investigación, el porcentaje de participación de los sujetos que se incluyeron en el mismo en las etapas de muestreo fue buena ya que la participación fue de un 76 % global para los grupos de estudio (GNE=65 %, GE=71 %). En algunas referencias consultadas, el porcentaje de participación para este tipo de estudios donde se requiere la donación de la muestra seminal es baja. En efecto, en un estudio de poblaciones de trabajadores donde se ve la posibilidad de captar más participantes, Robins et al., (1997) reportaron una participación de 64 % en empleados de una planta de baterías en un estudio de corte transversal en Sudáfrica. Por otro lado, Viskum et al., (1999) reportan una tasa de respuesta de 18 % en un estudio prospectivo en empleados de una fábrica de baterías de la república de Dinamarca; asimismo, el grupo de Alexander et al., (1988) refiere una tasa de participación del 13% en trabajadores de una fundidora, este estudio fue de tipo corte transversal en Canadá.

Evaluación de la exposición a plomo. Para el estudio de la parte ambiental, las ciudades de Torreón, Coah. y Gómez Palacio y Lerdo, Dgo. (grupo control) están localizadas en el centro de la región noreste de México y representan la principal área urbana de la región Lagunera con más de 800,000 habitantes. Esta zona tiene varias fuentes de contaminación por Pb, por ejemplo, un tráfico vehicular pesado y el complejo metalúrgico antes mencionado. La metalúrgica está localizada en la ciudad de Torreón, Coah., la cual está inmersa en la zona urbana, e incluye a una

fundidora de Pb, una refinería de Pb y Plata y una planta refinadora electrolítica de Zn, produciendo en el año 2003: 129,712 toneladas de Pb y 218,457 toneladas de Zn (informe Industrias Peñoles, 2004). Varios estudios han mostrado evidencias de contaminación por Pb en la ciudad de Torreón desde hace varias décadas. Albert y García (1977) determinaron las concentraciones de Pb en el cabello de niños de 5 regiones diferentes de México incluyendo: a) el norte de la Ciudad de México, b) la ciudad de Puebla, Puebla, c) la Ciudad de Matamoros, Coah., que sirvió como control, d) la Ciudad de Torreón, Coah, y e) su ciudad gemela Gómez Palacio, Dgo. Las concentraciones de Pb en las muestras de la zona control fueron las más bajas (4.2 µg/g) y las concentraciones de Pb encontradas en el cabello de niños de las ciudades de México, Puebla y Gómez Palacio fueron de 12.1, 17.7 y 12.8 µg/g, respectivamente. En contraste, en la Ciudad de Torreón el valor medio fue de 55.1 µg/g con un máximo de 220 µg/g. Asimismo, Hernández-Serrano (1982) evaluó las concentraciones de plomo en sangre (PbS) de estudiantes médicos residentes de Torreón, Coah. y reportó que el 10 % (9/90) de los estudiantes presentó valores de PbS por arriba de 25 µg/dl. Por otra parte, Calderón-Salinas et al., (1996) llevaron a cabo un estudio en 98 niños (7-12 años) que vivían dentro de 1 Km de distancia al complejo metalúrgico. La concentración promedio de PbS encontrada fue de 17.3 µg/dl. Por su parte, Benin et al., (1999) realizaron un estudio en 1 Km a la redonda de la zona metalúrgica de Torreón, Coah. y reportaron niveles de Pb en polvo (17.9-48.84 µg/g) por arriba de los niveles establecidos para sitios no contaminados, así como también altas concentraciones de As y Cd. Recientemente, el grupo de García-Vargas et al., (2001) evaluó los niveles de Pb en polvo de 3 escuelas primarias localizadas a varias distancias (8100 m, 1750 m y 650 m) de la zona metalúrgica de la Ciudad de Torreón, Coah., encontrando niveles de Pb por arriba de los valores establecidos por la EPA (1997). En nuestro estudio, referido a la parte de exposición ambiental(GE) el nivel medio de PbS encontrado en la población masculina adulta residente principalmente de las ciudades de Torreón y Gómez Palacio (n=74) fue de 9.21 µg/dL. Este valor se encuentra ligeramente por debajo del límite establecido por la CDC (10 µg/dL), sin embargo, se encontró a un 40 % de los sujetos participantes con valores por arriba del mismo. Estos resultados indican que la contaminación ambiental por Pb en esta parte de nuestra región se ha mantenido, ya que el nivel medio de PbS (principal indicador de exposición) está en el umbral del límite máximo permitido; por lo tanto, los riesgos en las poblaciones susceptibles se incrementan. De igual manera, García-Vargas et al., (2001) en su estudio realizado en niños de la región, mostraron que la zona metalúrgica de Torreón, Coah., sigue siendo una fuente importante de contaminación ambiental de riesgo para la salud infantil, principalmente. Los efectos de toxicidad por Pb son muy diversos y su forma o ruta de acción en el

humano difíciles de establecer ya que este metal entra al organismo y se acumula. Por este motivo, la evaluación de la concentración de Pb en sangre, es considerada uno de los mejores biomarcadores para medir la exposición a este metal (Flegal y Smith, 1995). Se han reportado una variedad de trabajos en los cuales se han asociado las concentraciones de Pb en sangre con un efecto adverso en la calidad seminal. Los efectos más conocidos establecen una repercusión sobre la concentración de espermatozoides, en la motilidad celular, en la viabilidad espermática, en un aumento de la aparición de problemas de teratospermia y sobre el volumen seminal (Lancranjan et al., 1975; Wildt et al., 1983; Cullen et al., 1984; Fisher-Fischbein et al., 1987; Lerda, 1992; Chia et al., 1992; Alexander et al., 1996). En estos estudios las variables que califican la calidad espermática se ven alteradas cuando se ha mostrado una concentración promedio de 40 µg/dL de Pb en sangre. Sin embargo, en otros trabajos con niveles más bajos de Pb se muestran efectos adversos sobre la calidad seminal. En efecto, concentraciones >25, >24 y >10µg/dL describen el efecto (Sallmén et al., 2000; Genart et al., 1992; Selevan et al., 1984). En trabajadores de una fundidora de Pb, el rango encontrado de Pb en sangre fue de 15-69 µg/dL, y no se encontró asociación estadísticamente significativa con los parámetros de calidad del semen (Alexander et al., 1996). De igual manera, Plechaty et al., (1977); Xu et al., (1993), no encontraron diferencias estadísticas entre la concentración de Pb en sangre (promedio de 15 µg/dL) y los parámetros de la calidad espermática. Estas referencias hacen alusión a una determinada concentración de Pb en sangre, la cual no parece afectar de manera directa la calidad espermática, lo que hace suponer que es posible no tener una concentración suficiente acumulada en el tracto reproductivo masculino para causar un efecto, por esta razón es posible establecer que el utilizar el Pb como un elemento de referencia y su concentración mínima para generar un efecto biológico en el humano es punto de debate. Desde otra perspectiva, la evaluación de la concentración de Pb en semen, al parecer ofrece una manera más precisa para establecer un efecto de este metal sobre el aparato reproductor masculino y puede representar una manera más precisa en este tipo de exposición (Plechaty et al., 1977). De esta manera, la evaluación de la concentración de Pb en semen sería una forma más efectiva para poder evaluar estos efectos ya que su bioacumulación desde el torrente sanguíneo al tracto reproductivo está limitado por la barrera hemato-testicular (Dym y Fawcett, 1970) y hemato-epididimal (Hoffer y Hinton, 1984). Sin embargo, la mayoría de los trabajos en los cuales se ha determinado Pb en semen no se ha encontrado una asociación directa entre el metal y las características de la calidad espermática (Stachel et al., 1989; Jockenhövel et al., 1990; El-Zohairy et al., 1996; Robbins et al., 1997; Alexander et al., 1998; Viskum et al., 1999). En otros estudios, y contrario a lo comentado en los trabajos anteriores, existen investigaciones

donde se muestra un efecto claro y adverso del Pb sobre las características seminales incluso a bajas concentraciones. Por ejemplo, algunos mencionan un efecto de astenospermia y teratospermia. En nuestro estudio, al comparar la concentración de Pb en semen entre el GNE y GE, se encontró una diferencia significativa al comparar las concentraciones respectivas. Nuestros resultados fueron similares a los descritos por Saaranen et al (1987), donde informan el nivel de Pb en hombres infértiles de (3.2 µg/dL) y en hombres fértiles de (1.7 µg/dL). Por otro lado, Jockenhövel et al., (1990), reportaron una diferencia significativa en semen de sujetos expuestos a plomo, los resultados en los hombres fértiles de 1.3 µg/dL versus 5.6 µg/dL en hombres infértiles. Estos trabajos sirven para hacer referencia a que la exposición a bajos niveles de Pb en semen afectan la calidad seminal; Burimovitz et al., (1989), sugieren que el Pb en semen es el principal indicador de daño al nivel reproductivo, incluso más que la evaluación de la exposición de Pb en sangre. Nuestros resultados son similares a los descritos por Wyrobeck et al., 1983; Butrimovitz et al., 1999; Robbins et al., 1997; Lerda et al., 1992; Chia et al., 1990), donde la teratospermia y astenospermia son las principales variables afectadas, esto sugiere que la morfología espermática es una de las principales variables sensitivas usadas como el indicador de problemas a nivel espermatogénico causadas por sustancias tóxicas. La teratospermia es uno de los principales parámetros para evaluar la funcionalidad del epitelio germinal. Esto puede explicarse porque el principal momento en que se da un contacto entre el Pb y las células germinales es en esta etapa. Aquí, los aspectos estructurales en el desarrollo del espermatozoide, pueden sufrir daños irreversibles y en consecuencia originar deficiencias fisiológicas. Las células germinales son protegidas por las células de Sertoli hasta que el espermatozoide ha madurado (espermiación), en este proceso es más difícil que ocurra un daño (barrera hematotesticular) por sustancias tóxicas, sin embargo, como hemos mencionado, el Pb, por ejemplo, puede ser transportado a través de los túbulos seminíferos, epidídimo y, lógicamente, en las secreciones de la próstata y vesículas seminales. La comparación del conteo espermático, porcentaje de formas anormales, viabilidad y motilidad en este estudio, muestra diferencias estadísticas basadas en las condiciones de fertilidad entre los grupos analizados. En un estudio realizado en animales de laboratorio con exposición a Pb Chowdhury et al., (1984), observaron efectos del metal asociándose a una atrofia testicular en estos animales. Por otra parte, Kaushal et al., (1996) observaron una disminución significativa de espermátides jóvenes y espermatozoides en ratas tratadas a distintas concentraciones de Pb. Asimismo, el grupo de Saxena et al., (1987) observaron alteraciones en la espermatogénesis con la degradación de las células de Leydig en ratas tratadas con este tóxico. Por otro lado, la motilidad espermática puede alterarse como consecuencia de un daño testicular, epididimal o por la

presencia de algún agente en el líquido seminal (Sipes et al., 1997). En nuestro estudio en la parte ambiental, la motilidad no se asoció con la concentración de Pb en el líquido seminal, lo cual sugiere que este parámetro de calidad de semen se afectó antes de que las glándulas accesorias secretaran su contenido, es decir, durante su desarrollo en el testículo, o bien, durante su paso a través del epidídimo. Sin embargo, las concentraciones de Pb en sangre en el grupo expuesto ocupacionalmente, se asociaron con las encontradas en el líquido seminal, lo cual nos permite pensar que esta asociación es clara para estos factores de calidad espermática en los sujetos que conformaron el grupo de trabajadores de la metalúrgica. En este grupo, a diferencia de lo encontrado en la parte de exposición ambiental, se observa claramente un efecto del metal por las diferencias encontradas al comparar los valores con el grupo expuesto de manera laboral. La alteración de la motilidad por el plomo en los espermatozoides, puede ser el resultado de la inhibición de la actividad de las mitocondrias, las cuales se localizan en la parte media del espermatozoide (Hedí, 1988). En otro estudio realizado in vitro por el grupo de Kanwar et al., (1988), estos observaron una inhibición de la motilidad espermática después de exponerlos a Pb, como resultado de la inhibición de ciertas enzimas fundamentales en el metabolismo de carbohidratos, algunas como la glucógeno fosforilasa, la glucosa-6-fosfatasa, la ATP-asa dependiente de Mg²⁺ y las deshidrogenasas del ácido láctico y succínico. En efecto, una deficiencia en la motilidad, sobre todo la lineal en el GE, fue alterada negativamente al ser evaluada por el método propuesto en nuestro trabajo.

Calidad espermática. Recientemente, Bonde et al., (1998) reportaron que la probabilidad de embarazo se incrementa con el aumento de la concentración por encima de 40 millones/ml, y sugieren que los criterios establecidos por la OMS deben de ser utilizados con cautela y que algunos hombres con cuentas espermáticas por encima de los límites inferiores normales (20 millones/ml) definidos por la OMS pueden ser subfértiles. Por otro lado, la concentración espermática en el GE, fue de 46.7 millones/ml. Además, existen datos de que en algunos lugares del hemisferio norte, la calidad espermática (concentración espermática, como principal factor) se reduce durante el verano (Gyllenborg et al., 1999). Experimentos con monos rhesus sugieren que tales variaciones estacionales pueden ser inducidas por su reloj biológico endógeno que es reajustado anualmente por cambios en el número de horas luz (Levine, 1999). Otro factor ambiental que en parte pudiese explicar esta relación estacional, son las fluctuaciones de la temperatura (Sood et al., 1993). Sin embargo, Levine et al., (1992) demostraron en sujetos que estuvieron bajo condiciones climáticas reguladas, que el calor de verano no es adverso a la

capacidad reproductora masculina. Por otro lado, existen otros reportes que apoyan lo descrito por Levine et al., (1999), es decir, no observaron cambios o tendencias significativas en los parámetros espermáticos durante las épocas del año (Mallddis et al., 1991). En nuestro trabajo, no se encontraron disminuciones significativas en la concentración espermática en el GNE, incluso tomando en cuenta que esta etapa del estudio fue desarrollada en los meses de junio a agosto, meses de más calor en la comarca Lagunera y donde la media de la temperatura fue de 40.6°C (para esos meses), del mismo modo en esta época, los sujetos estuvieron bajo las variaciones naturales del fotoperiodo de esta región, donde la duración de horas luz para el solsticio de verano fue de 13.36 horas luz (CENID-RASPA-INIFAP, 2001). Además, están las etapas de muestreo para el GE realizadas en los meses de octubre a diciembre. En este grupo la concentración de espermatozoides/ml fue más afectada y dio otros parámetros espermáticos, sugiriendo esto que más que la influencia de horas/luz o la temperatura ambiental la reducción en la calidad espermática se debe a la exposición a metales pesados. Nuestros parámetros afectados (viabilidad, formas vivas móviles y formas vivas inmóviles, así como la motilidad espermática) son características tardías que adquiere el espermatozoide durante el proceso de maduración espermática en el testículo y a su paso por el epidídimo. Por lo tanto, el efecto biológico secundario a la exposición a metales puede ser agudo o subagudo. Es importante también mencionar que la exposición crónica a metales puede marcar la aparición de estas deficiencias en la calidad espermática de estos sujetos (GE), ya que los resultados sugieren que el daño al epitelio germinal es gradual y posiblemente acumulativo. Por otro lado, la motilidad espermática tal vez secundaria al daño que puede ocasionar la exposición a metales sobre el aparato locomotor del espermatozoide, pone en un punto de análisis este efecto ante esta asociación. En efecto, se sugiere una posible modificación tanto en la disposición mitocondrial en el axonema del flagelo, así como en el metabolismo a la conversión energética. Para enriquecer los comentarios anteriores sobre este aspecto fisiológico ocasionado por metales, es importante destacar que no se han establecido mecanismos específicos y claros que expliquen la disminución de la motilidad espermática. Dos posibles hipótesis han sido consideradas: una es en el proceso de producción de ATP, en el cual intervienen enzimas que pueden ser fosforiladas de manera covalente en uno o más residuos de aminoácidos (Ser, Tri, Tir o His). También, la fosforilización y desfosforilización de ATP son catalizados por una variedad de proteínas cinasas y fosfatasas y la desregulación de alguno de estos dos grupos de enzimas puede catalizar de modo no controlable la hidrólisis del ATP (Murria et al., 1997). Ambas alteraciones enzimáticas reducirán el contenido de ATP en la célula; en el caso de los espermatozoides, esto disminuirá la cantidad de energía disponible para

su motilidad. La segunda hipótesis establecida para explicar la disminución de la motilidad espermática en el GE, es que cualquier alteración estructural en el aparato locomotor del espermatozoide traería por consiguiente alteraciones en la motilidad espermática. En nuestro estudio no se realizaron evaluaciones de ultra-estructura de la parte media de los espermatozoides, las cuales arrojarían mayor información en este sentido, ya que muchas de las fallas en la motilidad es por la disposición mitocondrial inadecuada en esta parte de la célula. Por otro lado, en el GE se encontraron deficiencias importantes tanto en la teratospermia (por arriba del valor normal, 50 % o más de células morfológicamente normales) y una disminución de la motilidad total, así como en la lineal y progresiva (50 % o más células con movimiento) (OMS, 1992). Esto puede explicar la última hipótesis ya que si se establece como un daño estructural, la motilidad celular espermática puede obedecer al daño por metales asociado a la mala eficiencia en el metabolismo de moléculas combustibles como la fructosa, manosa y glucosa, entre otras, y a la morfología deficiente que prevaleció en estos grupos más afectados.

Fragmentación del ADN. Las alteraciones en el material genético pueden incluir, además de aneuploidías cromosómicas en el espermatozoide, tanto una descondensación nuclear como roturas en el ADN. Recientemente, la integridad del ADN del espermatozoide se está reconociendo como una medida independiente de su calidad; y se ha demostrado que esta puede afectar la fertilidad in vivo e in vitro (Muriel y cols. 2006a). La causa de la infertilidad en varones con parámetros seminales normales se podría relacionar con la presencia de un ADN anormal en el espermatozoide.

La evaluación de la integridad del ADN en el espermatozoide, además del estudio de los parámetros sistemáticos seminales, podría aportar una información adicional acerca de la calidad del espermatozoide, que podría resultar de gran ayuda a la hora de orientar a las parejas infértiles. Los resultados de este estudio concernientes a la fragmentación en el ADN del espermatozoide sostienen que hay un incremento significativo en la incidencia de células espermáticas con las hebras de ADN rotas en los hombres expuestos a plomo de manera ocupacional, luego de evaluar las muestras procesadas por este ensayo. En un estudio realizado con ratas expuestas a diferentes metales pesados, incluyendo al plomo, se evaluó el efecto de los metaloides (Pb, As y Cd), sobre la compactación del ADN en espermatozoides primarios. En este estudio se encontró un daño en espermatozoides asociado a la concentración de Pb administrada (Nava-Hernández et al., 2009). Estudios previos que emplearon estos modelos animales y plomo, han demostrado un daño a nivel testicular y un decremento en la concentración de células germinales, es decir, el daño directo en

los túbulos seminíferos, considerado una parte dinámica de los testículos en donde tiene lugar la división mitótica (Massanyi et al., 2007). La administración de Pb causa un importante declive de la fertilidad, estudios de cinética celular muestran una disminución en espermátides y espermatozoides maduros (Batra et al., 2004). Nava Hernández et al., 2009, menciona que el Pb, Cd y As son directamente tóxicos para los espermatoцитos primarios, causando daño al ADN. La integridad del DNA es propiamente como un mecanismo del genoma paterno que garantiza la reproducción (Cordelli et al., 2003). Las lesiones en el ADN en las células germinales inmaduras pueden dañar la fertilidad y producir resultados anormales, como abortos espontáneos, enfermedades genéticas y un incremento en la incidencia de cáncer (Brinkworth, 2000; Spano et al., 2000; Coddington et al., 2004). El origen del potencial de daño y el mecanismo de fragmentación del ADN en las células germinales no está claro, puede tener lugar directamente en el espermatozoide maduro como consecuencia de la exposición endógena (especies reactivas de oxígeno) o exógena a mutágenos (químicos o radiaciones) en el desarrollo de la espermatogénesis (Aitken et al., 1998; Ahmadi y Ng, 1999; Alvarez et al., 2002; Sakkas et al., 2002). Sergerie y cols. (2005), describieron la no asociación entre tabaco y fragmentación de ADN espermático en muestras de semen en fresco de hombres sanos (no infértiles); mientras Saleh y cols. (2002a), estudiaron esta asociación en hombres infértiles y reportaron que las diferencias entre fumadores y no fumadores no eran estadísticamente significativas. No obstante, advirtieron que las muestras de semen de los hombres infértiles fumadores tenían altos niveles de estrés oxidativo (OS) respecto a los no fumadores. Esto fortalece los resultados del presente trabajo y refuerza la hipótesis que el efecto ejercido por algunos factores perjudiciales, que afectan los gametos masculinos, podrían estar encubiertos en el eyaculado. Muratori y cols., (2000) describieron que hasta cierto punto la fragmentación del ADN estaba positivamente relacionada con una morfología anormal en el espermatozoide y asociada con defectos en la cola; pero encontraron una correlación negativa entre ADN roto y movilidad progresiva. Basándonos en trabajos previos, donde se registró que las tasas de fecundación y algunos indicadores de calidad embrionaria estaban relacionados con el alcance de la fragmentación del ADN espermático post swim-up (Muriel y cols. 2006a); en conjunto con los resultados del actual estudio, se puede concluir que la vía para determinar la fragmentación del ADN parece evidente y que debería ser evaluar las alícuotas tras el procesamiento por swim-up.

Relación entre la fragmentación y la calidad seminal. En humanos, se ha encontrado una estrecha asociación entre parámetros seminales anormales y roturas en el ADN nuclear de los espermatozoides del eyaculado. La fragmentación del material genético del espermatozoide es mayor en pacientes diagnosticados de oligoteratoastenozoospermia. (Huang et al. 20) evaluaron este fenómeno usando el ensayo TUNEL, apreciando que el DFI (índice de fragmentación del ADN) era significativamente mayor en pacientes con parámetros seminales anormales. En nuestro estudio, se observa claramente esta tendencia en el grupo expuesto de presentar una proporción mayor de fragmentación de ADN, aunque no se analizó el GE en relación a bloques con mayor concentración de Pb, la tendencia se muestra en los grados de roturas y su proporción. Gandini et al., estudiando la relación entre apoptosis y parámetros seminales, también demostraron que un incremento de la fragmentación estaba relacionado con una disminución de la concentración espermática y la motilidad. Esta correlación se observó también con la morfología. Los gametos que mostraban roturas en su ADN presentaban cabezas pequeñas y amorfas. En nuestro trabajo no se evaluó el grado de apoptosis pero se muestra claramente un grado de inviabilidad espermática por arriba del 30, lo cual nos indica esta posible asociación. Asimismo, los datos encontrados en nuestro trabajo mostraron una alteración en la proporción de las formas normales, así como la encontrada en la parte media en el GO. Sin embargo, los datos obtenidos por Larson-Cook et al., mostraron que el DFI no siempre estaba relacionado con los parámetros seminales. Solo 30 % de los varones con un DFI superior al 27 % presentaban astenozoospermia y/o oligozoospermia. A pesar de que en la mayoría de los casos la fragmentación se relaciona con anomalías seminales, es muy importante destacar que el 8 % de los varones con parámetros seminales normales (esterilidad de origen desconocida) también presentan fragmentación en su ADN.

Relación entre fragmentación del ADN espermático y potencial fertilizante del espermatozoide. Se han realizado varios trabajos que evidencian la relación existente entre la integridad del ADN espermático y la fertilidad. Estos trabajos demuestran que los varones infértiles tienen una mayor fracción de espermatozoides con roturas en el ADN, y se ha intentado establecer un punto de corte por encima del cual el pronóstico sería desfavorable. En Europa y Estados Unidos se llevaron a cabo de forma independiente dos amplios estudios sobre la relación entre los resultados de la técnica SCSA y la capacidad fertilizante. Ambos demostraron que un índice de fragmentación del ADN (DFI) superior al 30-40 % es incompatible con la fertilidad in vivo. Independientemente de la concentración, motilidad y morfología espermática, habían establecido

una correlación significativa entre las técnicas SCSA, COMET y TUNEL para espermatozoides humanos, por tanto, los datos obtenidos mediante una técnica se podrían comparar con los obtenidos por las otras dos. Recientemente, Sergerie et al., mediante el TUNEL hallaron prácticamente los mismos puntos de corte que Evenson et al., Para ello, midieron la fragmentación del ADN espermático en un grupo de 66 hombres infértiles ($40,9 \pm 14,3$) y 47 hombres fértiles ($13,1 \pm 7,3$), estableciendo un punto de corte del 20 %. Chohan et al., llegaron a la misma conclusión comparando un grupo de 60 hombres infértiles con un grupo de 7 donantes mediante tres técnicas (SCSA, TUNEL y SCD). En este sentido, la proporción de fertilidad a la concepción en los trabajadores no fue establecida propiamente. Sin embargo, se observó un retraso en este factor en algunos de los participantes de 6, 8 o hasta 12 meses en lograr el embarazo. Se destaca la comparación entre las técnicas moleculares en este trabajo o se realiza esta comparación, lo cual sería una buena estrategia porque nos daría más información sobre los mecanismos de potenciales formas o mecanismos de daño al ADN en estos trabajos.

Conclusión

Los resultados del presente estudio muestran un efecto adverso de metales pesados como el Pb sobre la secreción de las células germinales inmaduras, la calidad espermática y un daño genético, este último estimado por el grado de deficiencias morfológicas y nivel de fragmentación del ADN de células espermáticas. En resumen, la exposición ocupacional y endémica a los diferentes metales como el Pb, pueden alterar el proceso de espermatogénesis. Las concentraciones de los metales tanto en el plasma seminal como en el interior de la misma célula pueden ser buenos indicadores para evaluar efectos sobre la calidad espermática. Finalmente, este estudio es el primero en el cual se describe un efecto sobre la calidad seminal, la morfología espermática y la fragmentación asociados a metales pesados (Pb) en la región Lagunera. Tanto la fragmentación de ADN y la morfología celular representan dos variables importantes para determinar posible daño genético, es decir, modificaciones directas de la exposición a metales y las diferentes etapas de génesis y desarrollo del espermatozoide humano.

Bibliografía

- Assennato G., & Paci, C. (1987). Sperm count suppression without endocrine dysfunction in lead-exposed men. *Arch Environ Health*, 42, 124-127.
- Bjorndahl, L. & Kvist, U. (1990). Influence of seminal vesicular fluid on the zinc content of human sperm chromatin. *Int j Androl*, 13, 232-237.
- Calderón-Salinas J. V. (1991). Afinidad de proteínas sanguíneas por plomo y participación de estas proteínas en los niveles de plomo libre circulante. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 7, 114-119.
- Gatewood, J.M., Cook, G.R., Balhorn, R., Bradbury, E. M., & Schmid, C. W. (1987). Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science*. 236(4804), 962-4.
- Goering, P. L. (1993). Lead-protein interactions as a basis for lead toxicity. *Neurotoxicology*, 14, 45-60.
- Goyer RA. (1996). Toxic effects of metals. New York: McGraw-Hill.
- Hernández-Ochoa, García-Vargas, López-Carrillo, Rubio-Andrade, Morán-Martínez, & Quintanilla-Vega. (2005). Low lead environmental exposure alters semen quality and sperm chromatin condensation in northern Mexico. *Journal of Reproductive Toxicology*. 20, 221-228.
- Morán-Martínez J. (1998). Effects of environmental lead on sperm motility in men. International Conference on Reproductive Health. Mumbai, India. March 15-19. p: 313.
- Quintanilla-Vega B., Hernández A., López M.L., García-Vargas G., Cebrián M.E., & Mendoza-Figueroa T. (1995). Porphyrin production and excretion by long-term cultures of adult rat hepatocytes and effect of lead exposure. *Toxicology*, 102, 275-283.
- Saowaros W., & Panyim S. (1979). The formation of disulfide bonds in human protamines during sperm maturation. *Experientia*. 15 (35), 191-202.
- Sokol R. (1987). Hormonal effects of lead acetate in the male rat: Mechanism of action. *Biol Reprod*, 37, 1135-1138.
- Winder C. (1993). Lead, reproduction and development. *Neurotoxicology*, 14, 303 318.