

3 00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ALTERACIONES ULTRAESTRUCTURALES EN TESTICULO POR
LA INHALACION DE ACETATO DE PLOMO Y CLORURO DE
CADMIO. MODELO EXPERIMENTAL EN RATON.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)
P R E S E N T A
MARTHA PATRICIA BIZARRO NEVARES

M. en C. TERESA I. FORTOUL VAN DER GIES



MEXICO, D. F.

MARZO DE 2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 10 de septiembre de 2001, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno Bizarro Nevares Martha Patricia, con número de cuenta 81602627, y número de expediente 17961037, con la tesis titulada: "Alteraciones ultraestructurales en testículo por la inhalación de acetato de plomo y cloruro de cadmio. Modelo experimental en ratón.", bajo la dirección de la Dra. Teresa Imelda Fortul van der Goes.

Presidente:	Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez
Secretario:	M. en C. Teresa Imelda Fortul van der Goes
Vocal:	Dra. Irma Villalpando Fierro
Suplente:	Dra. Norma Leticia Calderón Apodaca
Suplente:	Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F.; a 11 de marzo de 2002

Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM.

A mi tutora, Dra. Teresa I. Fortoul van der Goes por su apoyo y sus enseñanzas.

A los miembros de mi Comité Tutoral, Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez y Dra. Norma Leticia Calderón Apodaca por sus valiosas aportaciones para la realización de este trabajo.

A los miembros de mi jurado, Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez, Dra. Irma Villalpando Fierro, Dra. Norma Leticia Calderón Apodaca y Dr. Mario Altamirano Lozano por sus correcciones y comentarios para la elaboración de la Tesis.

A las Biólogas Sandra Acevedo Nava, Irma López Martínez e Ivonne Sánchez Cervantes por su apoyo en la realización de los experimentos.

A Francisco Pasos Nájera, Tomás Cruz Méndez y Biol. Armando Zepeda por su apoyo en la parte de fotografía.

A la Bióloga Lourdes Barbosa por su apoyo en el análisis estadístico.

Este proyecto se realizó con apoyo de la Facultad de Medicina, UNAM.

DEDICATORIAS

“Al único y sabio Dios, nuestro Salvador, sea gloria y majestad, imperio y potencia, ahora y por todos los siglos. Amén.” (Judas 25)

A mis padres, María Elena Nevares Samaniego y Javier Bizarro Martínez, porque a través de su amor y apoyo incondicional me enseñaron a luchar por las cosas que valen la pena.

A mi hijo Octavio que aunque ya no está conmigo, vivirá en mi corazón por siempre.

A mi hijo Daniel cuyo amor me anima a seguir adelante y a vencer los obstáculos que se presenten en el camino.

A mi hermana Carmen porque este sueño no hubiera sido posible sin su aliento en los momentos difíciles.

A mis hermanos Beatriz, Guillermo y Javier por estar presentes a mi lado cuando los he necesitado.

A Tere Fortoul por haber creído en mi y por brindarme su confianza, su apoyo y su paciencia.

A mis compañeros y amigos Sandra, Irma, Laura, Ivonne, Geraldine, Rose, Adriana, Silvia, Yrene, Paty, Rodrigo, Edgar y Paco por su entusiasmo, apoyo, comprensión y principalmente por su amistad.

A Silvia y a Adrián por haberme dado la oportunidad de compartir conmigo sus conocimientos en Microscopía Electrónica.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN.....	2
1. Contaminación atmosférica	2
1.1 Contaminación por metales pesados	2
2. Plomo	3
2.1 Fuentes de emisión de plomo	3
2.2 Toxicocinética del plomo	3
2.3 Toxicidad del plomo	4
2.4 Toxicodinamia del plomo	4
3. Cadmio	6
3.1 Fuentes de emisión de cadmio	6
3.2 Toxicocinética del cadmio	6
3.3 Toxicidad del cadmio	7
3.4 Toxicodinamia del cadmio	7
4. Efectos tóxicos del cadmio y el plomo sobre el Sistema Reproductor Masculino.....	10
4.1 Morfología y función del túbulo seminífero	10
4.1.1 Células de Sertoli	11
4.1.2 Células germinales	14
4.1.2.1 Espermátides	14
4.1.2.2 Espermatozoides	14
4.1.3 Espermatogénesis	16
4.2 Alteraciones inducidas por plomo en el Sistema Reproductor Masculino	17
4.3 Alteraciones ultraestructurales ocasionadas por plomo en testículo	18
4.4 Alteraciones inducidas por cadmio en el Sistema Reproductor Masculino	18
4.5 Alteraciones ultraestructurales ocasionadas por cadmio en testículo	19
JUSTIFICACIÓN	20
HIPÓTESIS	21

OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS PARTICULARES	21
MATERIAL Y MÉTODOS	21
Animales	21
Sustancias químicas utilizadas	22
Método de inhalación	22
Protocolo de exposiciones	22
Toma de muestras y procesamiento del tejido para Microscopía	
Electrónica de Transmisión.....	23
Análisis estadístico	23
RESULTADOS	25
FIGURAS	34
DISCUSIÓN	49
CONCLUSIONES	53
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

RESUMEN

Los metales pesados son contaminantes ambientales potencialmente tóxicos para los seres vivos. La administración oral o parenteral de cadmio o plomo ocasionan diversas patologías testiculares. Aunque se sabe que por el tamaño de sus partículas, metales como el cadmio y el plomo son absorbidos en los alveolos pulmonares, pocos trabajos se han realizado relacionados con la toxicidad de estos metales cuando son inhalados. Menos aún se ha revisado el posible daño producido por estos metales en el sistema reproductor cuando se administran por vía inhalatoria. Por vía oral y parenteral ocasionan alteraciones metabólicas y morfológicas en el sistema reproductor masculino, por lo que podría esperarse que también por vía inhalatoria ocasionaran algún tipo de daño.

Es por esto que los objetivos del presente trabajo fueron los de identificar las alteraciones ultraestructurales que ocurren en células de Sertoli y células germinales del parénquima testicular de ratones expuestos a inhalación de acetato de plomo y cloruro de cadmio administrados individualmente o combinados y cuantificar la pérdida de crestas mitocondriales en células de Sertoli de los testículos de los mismos animales.

Se utilizaron 72 ratones macho CD-1 con un peso promedio de 30g. Se hicieron tres grupos, cada uno de 16 animales expuestos y 8 testigos. Un grupo fue expuesto a la inhalación de acetato de plomo (Pb) 0.001M, otro grupo fue expuesto a cloruro de cadmio (Cd) 0.006M y un último grupo fue tratado con la combinación de acetato de plomo 0.001M y cloruro de cadmio (Pb+Cd) 0.006M. Las inhalaciones se realizaron durante una hora, dos veces a la semana durante cuatro semanas. Se tomaron muestras de testículo, las cuales se procesaron para microscopía electrónica y se realizó un análisis cualitativo y un análisis cuantitativo.

Se determinó que las células de Sertoli exhiben degeneración del citoplasma en los animales expuestos a Cd y a Pb+Cd desde el día 4, mientras que en los animales expuestos a Pb se observa desde el día 6. Se observó en algunas zonas del túbulo seminífero la separación entre las células desde el día 6 en los animales expuestos a Cd y a Pb+Cd. La combinación Pb+Cd desde el día 6 de exposición, y la exposición a Cd o Pb a el día 8, fue posible observar células germinales degeneradas que muestran condensación irregular de la cromatina. La presencia de estructuras similares a cuerpos residuales en el citoplasma de las células de Sertoli fueron observados en la última exposición en los tres modelos. Con el tratamiento de Pb+Cd, los animales expuestos presentaron espermátides tardías con núcleos deformes el día 8 de exposición.

La magnitud del daño ultraestructural fue dependiente de la duración de la exposición y del metal utilizado. Las mitocondrias de las células de Sertoli de los animales expuestos en los tres modelos muestran pérdida de crestas desde la 2ª inhalación. La combinación Pb+Cd ocasionó crestas mitocondriales electrodensas y deformes en células germinales 4ª exposición, con el Cd estas alteraciones se presentaron desde la 6ª inhalación mientras que con plomo se encuentran mitocondrias dañadas desde la 6ª exposición. La combinación de los metales fue mas agresiva, presentándose el daño desde la 2ª exposición. En cuanto a tiempo de exposición, el daño mitocondrial fue más severo conforme aumentó el número de exposiciones.

INTRODUCCIÓN

1-Contaminación Atmosférica

La contaminación atmosférica se presenta por la presencia en el aire de toda materia o energía en cualquiera de sus estados físicos y químicos que al incorporarse o actuar en la atmósfera modifican su composición. La producción de sustancias tóxicas generadas por la industria y el desarrollo acelerado de la tecnología actual, representa un enorme problema de contaminación en el mundo (López, 1994). El desarrollo de tecnologías que no toman en cuenta la protección del ambiente ni la salud humana, propicia el incremento de elementos potencialmente tóxicos en el mismo. Este problema es mayor en los países subdesarrollados, en los que el uso de tecnologías obsoletas y la tardanza en la aplicación de medidas de protección al ambiente generan un continuo aumento en el deterioro ambiental (Espinosa, 1989). Se estima que en la zona metropolitana de la Ciudad de México, hay cerca de 43 000 industrias y más de 3.5 millones de vehículos automotores circulando, que en conjunto emiten más del 80% de partículas a la atmósfera (polvos, humos, aerosoles y otros) (INEGI, 1999).

1.1. Contaminación por metales pesados

Los metales pesados se han identificado como contaminantes por su potencial tóxico sobre los organismos vivos. El plomo y el cadmio son metales considerados dentro del grupo de los agentes xenobióticos, es decir, aquellos que son ajenos al organismo (López, 1994).

Una de las razones de preocupación causada por la contaminación por compuestos metálicos, se debe a que persisten en el ambiente ya que no pueden degradarse, ni biológica ni químicamente, inclusive algunos reaccionan transformándose en formas más tóxicas. La estabilidad de los metales permite que sean transportados desde sus fuentes de origen a distancias considerables tanto por aire como por agua (Stoker y Seager, 1981).

Los metales pesados se encuentran en la atmósfera en forma de partículas suspendidas totales (PST) y gases. En el caso de cadmio y plomo, las partículas son lo suficientemente pequeñas (menos de 2.5 μm de diámetro) para ser inhaladas y penetrar en las vías respiratorias llegando a los alvéolos pulmonares (López, 1994). El

grado de absorción de estos metales, depende de su concentración en el aire, del componente químico inhalado y de las condiciones fisiológicas del sujeto. Un estudio realizado en la Ciudad de México en pulmones de casos de autopsia de individuos que murieron alrededor de los años 80 se detectaron concentraciones elevadas de metales como plomo, cadmio, níquel, cobalto y cobre en comparación con las muestras de aquellos individuos fallecidos durante los años 50 (Fortoul y Saldívar, 1996).

Desde el punto de vista de intoxicaciones industriales la inhalación de cadmio y plomo es muy importante, ya que son absorbidos fácilmente a través del sistema respiratorio y alcanzan así al torrente sanguíneo que los distribuye a los diferentes órganos (Underwood, 1977).

2. Plomo

2.1. Fuentes de emisión de plomo

El plomo es virtualmente ubicuo en el ambiente como resultado de su ocurrencia natural y de su uso industrial. Los usos del plomo en la industria son muchos y variados, entre ellos están la fundición y refinación del plomo, la producción de acumuladores, la manufactura del plomo alquílico y pinturas con plomo, el uso del arseniato de plomo en la agricultura y en el barnizado a base de plomo de recipientes de cerámica (Villalon y Monclus, 1974).

2.2. Toxicocinética del plomo

Las vías principales de absorción de plomo son el tracto gastrointestinal y el sistema respiratorio, aunque también se absorbe a través de la piel. Aproximadamente el 10 % del plomo ingerido en los alimentos es absorbido por el organismo, el resto es eliminado por la orina, el sudor, el tracto gastrointestinal, la exfoliación cutánea y la pérdida del cabello (OMS, 1978; Villalon y Monclus, 1974). El plomo absorbido se acumula en hueso, dientes, cabellos, uñas, y en órganos como el hígado, riñón, pulmón, músculos, cerebro, tejido adiposo, piel y glándulas (OPS, 1979). El plomo pasa la barrera hematoencefálica, es capaz de cruzar la placenta pasando a la sangre fetal, y también se le encuentra en la leche materna. El plomo se distribuye con rapidez en las estructuras subcelulares, en especial se localiza en núcleo, microsomas, citosol y mitocondrias, y es posible que también altere otras como el retículo endoplásmico

liso (Batra y col., 1998; Fortoul y col., 1997). En México, la concentración de plomo en el aire de zonas residenciales es de 3-4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ y de 14 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en áreas industriales (Fortoul y col., 1997).

2.3. Toxicidad del plomo

La amplia distribución que recibe el plomo en el organismo hace que se le atribuyan lesiones en el sistema hematopoyético, en el tejido óseo, en el sistema nervioso, en la piel, y hasta trastornos en la conducta (Corey y Galvao, 1989).

La intoxicación aguda por plomo ocasiona náuseas, dolor abdominal, vómito, diarrea o constipación, parestesia, dolor y debilidad muscular; si se absorben con rapidez grandes cantidades de plomo puede desarrollarse un síndrome de shock como resultado de la pérdida gastrointestinal masiva de líquidos (Corey y Galvao, 1989).

La intoxicación crónica por plomo se conoce como saturnismo, y se presentan signos y síntomas gastrointestinales, neuromusculares, del sistema nervioso central, hematológicos y renales. La manifestación más grave y frecuente del saturnismo es la encefalopatía por plomo y es generalmente más referida en niños que en adultos; los signos involucran torpeza, vértigo, ataxia, caídas, cefalea, insomnio, inquietud e irritabilidad. El resultado hematológico más común del saturnismo es la anemia microcítica hipocrómica; este tipo de anemia es originada por la disminución en la vida de los eritrocitos y por la inhibición de la síntesis de hemo (Corey y Galvao, 1989).

2.4. Toxicodinamia del plomo

El plomo pueden producir una gran variedad de efectos citotóxicos y metabólicos. Uno de ellos es al competir con los elementos esenciales (especialmente calcio y zinc) en sus sitios de inserción (Corey y Galvao, 1989) o en los procesos de internalización en la célula; se ha visto que los canales de calcio son más permeables al plomo que al mismo calcio, sin embargo a diferencia del calcio, los canales no son inactivados cuando el plomo pasa a través de ellos. La exposición *in vivo* al plomo en ratas reduce la actividad de la ATPasa de calcio (Simoms, 1986).

El plomo tienen efectos sobre el plasmalema o membranas intracelulares ya que alteran su estructura y permeabilidad y por consiguiente el transporte iónico a través de las mismas (Aoki y Hoffer, 1978; Fleisher y col., 1975; Prozialeck, 2000; Simoms,

1993). El plomo se une firmemente a las membranas de fosfatidilcolina (Vallee y Ulmer 1972).

El plomo puede alterar estructural y funcionalmente a las proteínas, incluyendo proteínas enzimáticas, por su afinidad con los grupos sulfhidrilo (-SH) (Corey y Galvao, 1989). Este metal inhibe la actividad de la enzima δ -Acido aminolevulínico deshidratasa (δ -ALAD) en testículo (Batra y col., 1998), enzima que se localiza en el citoplasma y cataliza el segundo paso de la biosíntesis de hemo.

Además puede inducir estrés oxidativo ya que incrementan las especies reactivas de oxígeno (ROS) y altera el sistema antioxidante de la célula (Koizumi y col., 1992; Yiin y col. 1999). Los ROS son los productos del metabolismo aeróbico, tales como aniones superóxido, H_2O_2 y radicales hidroxilo, y son considerados dañinos para la célula ya que no solo inician la peroxidación lipídica de la célula, sino también modifican estructural o químicamente a las proteínas (Hsu y col, 1997).

Entre los sistemas de defensa enzimáticos contra los ROS, se ha encontrado que el plomo altera el funcionamiento de la superóxido dismutasa (SOD), la cual protege contra el H_2O_2 y el O_2^- por medio de dismutación de radicales superóxido (Hsu y col, 1997; Mruk y Cheng, 2000). La catalasa, es otro componente integral de los mecanismos de defensa antioxidantes, es el principal responsable de la remoción del H_2O_2 de las células. El H_2O_2 es producido por la acción de la SOD durante la conversión de formas reactivas de oxígeno a formas menos reactivas (Batra y col. 1998).

El plomo daña las funciones mitocondriales, tales como los procesos oxidativos, y produce alteraciones morfológicas mitocondriales incluyendo pérdida de crestas y edema en enterocitos de perro, hepatocitos de conejo, placenta humana, además de hepatocitos, macrófagos alveolares, y células renales de rata (Cháves y col, 1987; Koizumi y col, 1994; Vallee y Ulmer 1972). El plomo puede generar ferritina y un tipo anormal de hierro, llamado micelas ferruginosas, en las mitocondrias; también el plomo se co-deposita con el calcio y forma complejos proteína-plomo, lo cual ocasiona una disminución del producto de $[Ca] \times [P]$ necesarios para formar los cristales de fosfato de calcio *in vitro* (Vallee y Ulmer 1972). El incremento en el plomo libre dentro de la célula puede resultar en la unión más estable del plomo a la membrana interna de la mitocondria (Batra y col., 1998).

3. Cadmio

3.1. Fuentes de emisión de cadmio

El cadmio fue descubierto en 1817, pero rara vez se empleó hasta que se descubrieron sus propiedades metalúrgicas hace alrededor de 50 años. Una alta resistencia a la corrosión y otras propiedades químicas aprovechables son responsables de su utilización en la industria minera, metalúrgica y química; así mismo posee numerosas aplicaciones entre las que se encuentran el revestimiento electrolítico de metales, aleaciones para soldaduras, amalgamas dentales, celdas fotoeléctricas, resistencias eléctricas, baterías de níquel-cadmio, fabricación de pigmentos para pinturas, esmaltes y materias plásticas, lámparas de vapor de cadmio, superfosfatos y plaguicidas que contienen cadmio y moderador de neutrones en la industria atómica. Dado que se recicla menos del 5% del metal, la contaminación ambiental es una consideración importante. Los combustibles de carbón y otros fósiles contienen cadmio y su combustión libera el elemento al ambiente (EPA, 1984; Villalón y Monclus, 1974).

3.2. Toxicocinética del cadmio

El cadmio se absorbe por el tracto gastrointestinal y por el tracto respiratorio. Los trabajadores de fundiciones y otras plantas procesadoras de metales pueden estar expuestos a altas concentraciones de cadmio en el aire, no obstante, la exposición por contaminación de los alimentos es la más importante para la mayoría de la población (Villalón y Monclus, 1974).

El tabaco es una importante fuente de exposición al cadmio en los fumadores. Se menciona que un cigarro contiene de 1-2 μg de cadmio (Friberg y col., 1974) y que cerca del 10 % es inhalado (Elinder y col., 1983); un estudio realizado sobre la concentración de cadmio en el tabaco mexicano, muestra que cada cigarro producido en México contiene $2.8 \pm 0.99 \mu\text{g}$ de cadmio (Saldívar y col., 1991). El Instituto Mexicano del Seguro Social realizó una encuesta entre su población derechohabiente a nivel nacional, cuyas edades eran de 12 hasta 79 años, la cual mostró que del 49.9% de los hombres encuestados el 40% son fumadores, aunque la cantidad de cigarros fumados al día es baja ya que el 64.7% de los fumadores consumen entre 1 a 5

cigarros diarios, el 18% consumen de 6 a 10 y solamente el 8.3% consumen 20 o más (Fernández y col., 1997).

La concentración de cadmio en el aire se ha estimado en un rango de 0.1 a 5 ng/m³ en áreas rurales, de 2-15 ng/m³ en áreas urbanas, y de 15 a 150 ng/m³ en áreas industrializadas (Elinder y col., 1985).

Casi del 10 al 40 % del las partículas de cadmio inhaladas son absorbidas; aquellas que no son eliminadas en las secreciones van a constituir los depósitos del árbol respiratorio. Del cadmio absorbido, el 33 % se acumula en riñón, el 14 % en el hígado, 2 % en pulmones, 0.3% en páncreas y una pequeña cantidad en huesos. El cadmio puede atravesar la barrera placentaria y encontrarse en la leche materna (Lucas, 1975; López y col., 1997).

3.3. Toxicidad del cadmio

La intoxicación por cadmio se debe a la ingestión de alimentos contaminados o por la inhalación de vapores de cadmio. Los síntomas de intoxicación incluyen náuseas, vómito, agotamiento, dolor de cabeza y fiebre; la inhalación de vapores ocasiona irritación bronquiopulmonar y dependiendo del tiempo de exposición puede presentarse edema pulmonar (Villalón y Monclus, 1974).

La intoxicación ocupacional se caracteriza por trastornos respiratorios que incluyen úlceras nasales, laringitis, bronquitis y enfisema aunado a náusea vómito y diarrea. También se puede presentar anemia y trastornos óseos (Goyer, 1991).

En forma crónica, la ingesta o inhalación de cadmio ocasiona daño renal, manifestado por incremento en la excreción de cadmio en orina, proteinuria, aminoaciduria, glucosuria e incremento en la reabsorción tubular de fosfato (Villalón y Monclus, 1974).

3.4. Toxicodinamia del cadmio

Se han sugerido varios mecanismos para explicar el daño celular inducido por cadmio.

El cadmio altera la homeostasis e interfiere con las acciones normales del zinc, el calcio y el selenio, (Nigam y col., 1999). Mimetiza o antagoniza las acciones fisiológicas

del calcio y lo substituye activando a la calmodulina; esta activación podría alterar el mecanismo normal de control del calcio así como la actividad de enzimas dependientes de calmodulina (L-Ashmawy, 1999). El cadmio también provoca un aumento de la concentración de calcio testicular como resultado del daño celular a través de peroxidación lipídica (Ono y col., 1997).

En estudios *in vitro* se encontró que el cadmio interactúa con monocapas de fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina (Vallee y Ulmer 1972), tales interacciones podrían proveer una base bioquímica para los efectos tóxicos de este metal sobre las membranas celulares y los mecanismos de adhesión celular. El cadmio daña las uniones ocluyentes dependientes de E-cadherina (zónula adherens o uniones adherentes) al interactuar directamente con esta molécula ya que compite con el sitio de unión del calcio en ella; ésta es una molécula de adhesión dependiente de calcio que está presente en muchos tipos de células epiteliales (Prozialeck, 2000).

El cadmio puede alterar las actividades de varias enzimas, entre ellas están la fosfatasa alcalina, la deshidrogenasa láctica, la succinildeshidrogenasa, la glutatión peroxidasa, la glutatión reductasa y la catalasa (Vallee y Ulmer 1972); algunas de estas enzimas están implicadas en la protección contra el estrés oxidativo. Las alteraciones en componentes del sistema de defensa antioxidante asociado a la exposición de cadmio, como la depleción de glutatión y la inactivación de enzimas antioxidantes como SOD, la glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y catalasa pueden permitir el incremento en el nivel de los ROS (Koizumi, 1992; Oteiza y col 1999). El cadmio inhibe directamente a la SOD, probablemente, por la interacción con el cobre, el zinc y el manganeso presentes en la enzima, así como por su afinidad con los grupos sulfidril de la misma (Nigam y col., 1999; Oteiza y col, 1999; Patra y col., 1999; Yiin y col., 1999).

El cadmio inhibe la producción de ATP mitocondrial y es posible que interactúe directamente con los componentes de la mitocondria (Aoki y Hoffer, 1978; Koizumi y col., 1994). La intoxicación por cadmio incrementa la peroxidación lipídica mediada por hierro. Los elevados niveles de peróxidos lipídicos ocasionan cambios significativos en las funciones de las membranas incluyendo colapso en el potencial transmembrana de la mitocondria, permitiendo así la liberación de calcio y edema mitocondrial (Nigam y col., 1999).

Se ha mencionado que la degeneración del epitelio seminífero, así como los cambios bioquímicos y fisiológicos observados por el tratamiento con cadmio, son

debidos al daño en el endotelio vascular (Aoki y Hoffer 1978; L-Ashmawy, 1999; Setchell y Waites, 1970), en el cual ocasiona edema intersticial seguido por infiltración hemorrágica, ocasionando así la modificación en el carácter del flujo sanguíneo e isquemia prolongada. La hemorragia inducida por cadmio incrementa la concentración de hierro (Fe) durante la degradación del hemo en el tejido testicular (Sugawara, N y Sugawara, C. 1984). La exposición con cadmio incrementa en ratas la concentración de hemo en las células de Sertoli (Oteiza y col 1999). Los componentes individuales de la molécula hemo, Fe y protoporfirina IX, promueven la peroxidación de lípidos y la formación de radicales libres (Sugawara, N y Sugawara, C. 1984). El Fe puede actuar como catalizador en las reacciones de Fenton/Haber-Weiss, transfiriendo electrones para generar especies reactivas de oxígeno tales como el anión superóxido y peróxido de hidrógeno en radicales hidroxil, los cuales inician la peroxidación de lípidos (Oteiza y col 1999., Yiin y col., 1999). El incremento en la concentración hemo en el tejido testicular es debido a la incorporación de hemoglobina a la membrana celular, más que al incremento en la biosíntesis de hemo en el tejido (Sugawara, N y Sugawara, C. 1984).

La acumulación de cadmio en riñón está asociada a una proteína específica llamada metalotioneina (MT), la cual es capaz de unir fuertemente el cadmio a la corteza renal. (Lucas, 1975). La MT es inducida por un amplio rango de mediadores de estrés como radicales libres, interferón, catecolaminas, interleucina 6 y esteroides, así como por el cadmio (Simpkins y col., 1996) La MT está implicada como una enzima protectora contra la necrosis testicular inducida por cadmio (Yiin y col., 1999), ya que secuestra al metal en un estado relativamente inerte (Simpkins y col., 1996). La MT es una proteína de unión a metales de bajo peso molecular, está formada por 60 aminoácidos, 1/3 de los cuales son cisteínas. Estas cisteínas presentan iones tiolato, los cuales podrían donar electrones al citocromo C o a otro aceptor de electrones. Los iones tiolato de la MT se unen a metales de transición (zinc, cadmio, plomo o cobre) y pueden inactivar radicales hidroxil y singletes de oxígeno (Oteiza y col 1999; Simpkins y col., 1996; Vallee y Ulmer 1972).

4. Efectos tóxicos del cadmio y el plomo sobre el Sistema Reprodutor Masculino

La función del sistema reproductor es la perpetuación de las especies; de la integridad de este sistema depende la sobrevivencia de cualquier especie (Thomas, 1991).

El involucramiento de los metales pesados en la etiología de patologías reproductivas así como en el mecanismo por el cual ejercen su efecto reprotóxico ha sido debatido por varias décadas; así entonces, existen trabajos que muestran daño estructural de las células; en otros estudios los resultados indican alteraciones metabólicas celulares, principalmente la disminución en la producción de testosterona en las células de Leydig, y en otros más, es el resultado de la combinación de ambos daños. Es posible que estas diferencias sean debidas a la vía de administración, duración y dosis del tratamiento con cadmio y plomo, así como la edad de los animales y la especie.

La infertilidad en los seres humanos es un problema que se ha incrementado conforme ha avanzado el grado de industrialización de los países desarrollados y en vías de desarrollo, por lo cual, se piensa que la fertilidad humana es susceptible a los químicos industriales presentes en el ambiente (Thomas, 1991)

4.1. Morfología y función del túbulo seminífero

Los testículos son los órganos del sistema reproductor masculino en los que se producen los gametos masculinos y la hormona testosterona. Son de forma oval y se encuentran suspendidos dentro del escroto. Están rodeados por tres capas: capa externa o túnica vaginal, capa media o túnica albugínea y la capa interna o túnica vascular, ésta última en el ratón, está incluida en el tejido conectivo que se encuentra entre los túbulos seminíferos. A partir de la capa media se forman tabiques que dividen el interior del testículo en lobulillos, cada lobulillo contiene de uno a cuatro túbulos seminíferos. Entre los túbulos seminíferos se encuentra el tejido intersticial el cual contiene vasos sanguíneos y linfáticos, fibroblastos, macrófagos, linfocitos, mastocitos y células de Leydig; éstas últimas representan la parte endocrina del testículo debido a que sintetizan y secretan testosterona (Pineau y col., 1999).

El túbulo seminífero presenta una membrana limitante compuesta de una lámina interna y una lámina externa que encierran una capa simple de células aplanadas. La lámina externa está compuesta por fibras de colágena. La membrana interna corresponde a la membrana basal del epitelio germinal (Gardner y Holyoke, 1964).

El epitelio germinal o seminífero está formado por las células de Sertoli, las cuales rodean a las células germinales en varias fases de desarrollo y células mioideas

corresponde a la membrana basal del epitelio germinal (Gardner y Holyoke, 1964).

El epitelio germinal o seminífero está formado por las células de Sertoli, las cuales rodean a las células germinales en varias fases de desarrollo y células mioideas peritubulares. Las células germinales se están renovando continuamente, en contraste con las células de Sertoli, las cuales dejan de dividirse durante la pubertad.

4.1.1. Células de Sertoli

Las células de Sertoli forman parte de la barrera hematotesticular y tienen un abundante suplemento sanguíneo, sus funciones son de sostén y las de proporcionar nutrientes a las células germinales (Chung y Maines 1987). Las funciones de la barrera hematotesticular es prevenir la entrada de una amplia gama de sustancias (proteínas, esteroides, drogas) presentes en el torrente circulatorio y linfático (Pineau, 1999). En los túbulos, las células de Sertoli alcanzan desde la membrana basal hasta el lumen del túbulo y están conectadas entre ellas por uniones ocluyentes y uniones gap. Las células de Sertoli contienen un complejo estructural único llamado especialización ectoplásmica. En la región basal de la célula de Sertoli, esta especialización se encuentra inmediatamente por debajo de las uniones ocluyentes, entre las células de Sertoli. Los haces de filamentos de actina en las especializaciones ectoplásmicas asociadas a uniones ocluyentes forman un cinturón que circunscribe la base de cada célula de Sertoli (Chung y Maines, 1987; Flickinger y Fawcett, 1956; Lablack y col. 1998). La barrera de las células de Sertoli crea un ambiente específico que promueve la diferenciación de las células germinales y divide el epitelio seminífero en un compartimiento basal conteniendo a las células germinales mitóticas y un compartimiento adluminal donde ocurre la meiosis y la espermiogénesis. Las células de Sertoli, además de interactuar morfológica o químicamente con las células germinales, se relacionan con las células mioideas y las células de Leydig. La porción basal de las células de Sertoli recibe señales parácrinas y autócrinas originadas en el intersticio y el flujo sanguíneo y son el blanco de la FSH y la testosterona. (Pineau 1999).

Las células de Sertoli juegan un papel crucial en la regulación de la espermatogénesis de los mamíferos, ya que sintetizan y metabolizan varias hormonas esteroides y secretan un fluido que contiene al menos 100 péptidos y

proteínas (Pineau y col., 1999). La clasificación de las sustancias secretadas por las células de Sertoli se describen en la Tabla 1.

Tabla 1
Productos de las células de Sertoli que participan en el control de las actividades de las células germinales (Pineau y col., 1999)

Producto	Función atribuida
Factores involucrados en crecimiento/diferenciación o metabolismo celular Activina e inhibina Factor de crecimiento transformante β (TGF- β) Interleucina 1 α (IL-1 α) Interleucina 6 (IL6)	Estimula/inhíbe la proliferación de espermatogonias División de células germinales y diferenciación para sus receptores en estas células. Estimula la proliferación de las espermatogonias Función contraria a la de IL-1 α
Proteínas fijadoras y de transporte Transferrina y ceruloplasmina Proteína fijadora de andrógenos Proteína fijadora de retinol Glicoproteína 1 sulfatada 1 (SGP1)/prosaposina Glicoproteína 2 sulfatada 1 (SGP2)/clusterina α 2-Macroglobulina γ -Glutamil transpeptidasa (γ -GTP)	Transporte de hierro y cobre a las células germinales Transporte de andrógenos a las células germinales Transporte de retinol a las células germinales postmeióticas Transporte de precursores lipídicos y ácidos grasos a las células germinales Liberación de lípidos a las células germinales y al suero Unión y por lo tanto regulación de factores de crecimiento, citocinas activina e inhibina Transporte de glutatión a las células germinales
Proteasas e inhibidores de proteasas Urocinasa, activadores de plasminógeno tipo tisular, colagenaza tipo IV y otras metaloproteinasas de matriz Proteína 2 Cíclica (CP2)/procatepsina L Cistatina C	Pueden estar involucradas en la apertura y el cierre de los complejos de unión facilitando el desplazamiento de las células germinales. Pueden estar involucradas remodelando la membrana basal Involucrada en la liberación de los espermatozoides Inhibición de catepsina L
Componentes de la matriz extracelular Colágena tipo I y IV, laminina, proteoglicanos, fibulina	Requeridas para la citoarquitectura tubular, para la comunicación célula-célula y para el almacenaje y activación de varios factores.
Metabolitos energéticos Lactato y piruvato	Requeridas para las células germinales que son incapaces de metabolizar glucosa
Antioxidantes Glutatión	Transferido a las células germinales
Componentes del complejo de unión Testina	Proteínas de complejo de unión Sertoli-célula germinal
Otros componentes de la membrana γ -GTP Proteína reguladora hepática	Ver arriba Regula interacciones célula de Sertoli-espermatoocito primario

Las características ultraestructurales que permiten el reconocimiento de las células de Sertoli, como la forma celular y descripción de organitos relevantes, se describen en la Tabla 2.

Tabla 2
Principales características ultraestructurales de la célula de Sertoli, la espermatogonia y el espermatozoido (Gardner y Holyoke, 1964; Meinhardt y col., 2000; Oakberg, 1956)

	C de Sertoli	Espermatogonia A	Espermatogonia B	Espermatozoido Primario	Espermatozoido Secundario
Forma	Irregular. La membrana plasmática presenta pliegues.	Oval o de cúpula	Esférica	Esférica	Esférica Más pequeños que los espermatozoides primarios Escasos.
Núcleo	Irregular con indentaciones. Nucleoplasma homogéneo	Ovoide	Ovoide	Esférico Complejos sinaptonémicos	Esférico
Citoplasma	Abundante. Complejo endolisosomal. Lípidos.	Escaso.	Escaso.	Escaso Puentes intercelulares	Escaso Puentes intercelulares
Retículo Endoplásmico	Organización vesicular	Poco desarrollado	Poco desarrollado	Poco desarrollado.	
A. de Golgi	Bien desarrollado	Poco desarrollado	Poco desarrollado		
Mitocondrias	Ovoides o esféricas. Crestas vesiculares	Tipo ortodoxo ⁽¹⁾	Tipo ortodoxo ⁽¹⁾	Tipo Intermedio ⁽²⁾ . Al final de esta fase son de tipo condensado ⁽³⁾ .	Tipo condensado ⁽³⁾

(1) Mitocondria tipo ortodoxo: Ovoides o esféricas con crestas rectas.

(2) Mitocondria tipo intermedio: Esféricas u ovoides con crestas curvas y cierto grado de dilatación intracrestal.

(3) Mitocondria tipo condensado: Esféricas u ovoides. Aumenta el espacio intercristal. Las crestas son empujadas a la periferia y la matriz se condensa formando una estructura similar a un anillo por debajo de la membrana externa.

4.1.2. Células germinales

Las células germinales en desarrollo, sufren cambios morfológicos, moleculares y bioquímicos, además de migrar progresivamente desde el compartimiento basal hasta el compartimiento adluminal del epitelio seminífero donde son eventualmente liberadas al lumen tubular como espermatozoides durante la espermiogénesis. En el ratón, las células espermatogénicas dependiendo de su estado de maduración pueden llamarse espermatogonias tipo A, espermatogonias tipo B, espermatocitos primarios, espermatocitos secundarios, espermátidas y finalmente espermatozoides (Chung y Maines 1987). Algunos autores reconocen un tipo de espermatogonia "intermedia", la cual dará lugar a la espermatogonia B, aunque morfológicamente ambas son muy similares (Courot y col., 1970; Oakberg, 1956).

En la Tabla 2 se resumen las características morfológicas de las espermatogonias y a los espermatocitos que incluyen la misma información que en el caso de la célula de Sertoli.

4.1.2.1. Espermátidas

En el ratón, las espermátidas tempranas pueden ser identificadas tan pronto como los cambios en el complejo de Golgi indican transformación entre la capa nuclear y el acrosoma. El proceso de diferenciación de las espermátidas a espermatozoides se conoce como espermiogénesis y consta de cuatro etapas designadas como Golgi, capucha, acrosomal y de maduración (Tabla 3).

4.1.2.2. Espermatozoides

El espermatozoide está compuesto de la cabeza, la pieza intermedia y la cola; la cabeza contiene al núcleo el cual está recubierto por el acrosoma. La pieza media y el resto de la cola comprenden el flagelo. La pieza intermedia incorpora la vaina mitocondrial y una pequeña cantidad de matriz citoplásmica, el resto de la cola consiste en pieza principal y pieza terminal. En el flagelo se localizan microtúbulos (nueve dobletes periféricos y dos centrales solos), que constituyen el axonema del flagelo. Por fuera de la disposición básica

de los microtúbulos, hay un anillo de fibras longitudinales llamadas fibras densas externas. En la pieza principal, dos fibras gruesas son sustituidas por las columnas dorsal y ventral, las cuales están interconectadas por las costillas fibrosas circulares. La pieza terminal comprende sólo el axonema flagelar y la membrana celular (Gardner, 1977; Geneser, 1988; Lesson, 1990).

Tabla 3

Fases de la espermiogénesis (Gardner, 1964; Gardner y Hiatt, 1997; Meinhardt y col, 2000)

Etapa de Golgi	<p>El núcleo es esférico y bastante grande con el carioplasma finamente particulado.</p> <p>El polo del núcleo adyacente al aparato de Golgi exhibe un engrosamiento.</p> <p>La membrana del aparato de Golgi adyacente al núcleo es reemplazada por pequeñas vesículas y se forma el gránulo acrosomal.</p> <p>El citoplasma es abundante y puede observarse la presencia de un cuerpo osmiofílico de forma irregular llamado cuerpo cromatoide.</p> <p>Muestra RE vesicular disperso.</p> <p>Las mitocondrias son de tipo condensado</p> <p>Los centriolos y el desarrollo del flagelo son evidentes en el polo caudal del núcleo</p>
Etapa de capucha	<p>El núcleo se hace ovoide y se localiza cerca de la periferia de la célula.</p> <p>La gran vesícula acrosomal llega a estar sobre el polo cefálico del núcleo para formar la capucha.</p> <p>El carioplasma es electrodenso.</p>
Etapa acrosomal	<p>Los microtúbulos forman el manguillo alrededor de la parte caudal del núcleo. Se observa al centriolo proximal y el desarrollo del ánulo terminal, posterior al ánulo se observa lo que será el límite caudal de la pieza media.</p> <p>Como parte de la formación de la pieza media, las mitocondrias se organizan en espiral alrededor de los filamentos. El desarrollo del flagelo es montado a partir de nueve filamentos arreglados cilíndricamente alrededor del axonema. Estos filamentos longitudinales están rodeados en la pieza principal por fibras densas acomodadas en forma circular.</p>
Etapa de maduración	Pérdida del citoplasma.

4.1.3 Espermatogénesis

La *espermatogénesis* es el proceso donde los espermatozoides se forman a partir de células germinales inmaduras. Este proceso se divide en tres fases (Pineau, 1999):

- La fase proliferativa o mitótica en la que las espermatogonias son capaces de reponer su propia reserva y experimentar una serie de divisiones mitóticas.
- La fase meiótica involucra a los espermatocitos diploides los cuales sufren dos divisiones consecutivas para producir espermátidas haploides, y
- La espermiogénesis corresponde a la metamorfosis de las espermátidas a espermatozoides.

Durante cada fase existen puentes intercelulares que permiten el intercambio de señales entre las células germinales. En cualquier segmento del túbulo seminífero se puede observar diversas asociaciones entre las células con composición constante, conocidas como estados del ciclo del epitelio seminífero. (Oakberg, 1956; Pineau, 1999).

El ciclo del epitelio seminífero del ratón incluye doce etapas (Tabla 4), y durante el proceso de espermiogénesis se distinguen 16 estados, basados sobre los cambios en el acrosoma y el núcleo. Durante la espermiogénesis, las fases 1-3 corresponden a la fase de Golgi, 4-7 a la fase de capucha, 8-12 a la fase de acrosoma, y 13-16 a la fase de maduración (Oakberg, 1956).

TABLA 4
Ciclo del epitelio seminífero del ratón (Oakberg, 1956)

Estado del ciclo		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Espermatogonia	Tipo A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	Intermedio		In	In	In								
	Tipo B				B	B	B						
Espermatocito Primario	Primera capa								R	L	L		Z
	Segunda capa	P	P	P	P	P	P	R	R	L	L	Z	Z
Espermatocito Secundario													Dia
													M-I
													S
													MII
Espermátidas (Fases)	Primera capa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Segunda capa	13	14	14	15	15	15	16	16				

A = Espermatogonia A	Espermatocitos
In = Espermatogonia tipo intermedio	primarios
B = Espermatogonia B	R = Reposo
S = Primera división meiótica	L = Leptoteno
MII = Espermatocito secundario	Z = Zigoteno
= Segunda división meiótica	P = Paquiteno
	Dip = Diploteno
	Dia = Diacinesis

4.2. Alteraciones inducidas por plomo en el sistema reproductor masculino

El plomo es una de las primeras sustancias asociadas a deterioro en el sistema reproductivo; se ha observado reducción en el conteo de espermatozoides, hipospermia y astenospermia en hombres expuestos al plomo (Todd y col., 1996); en animales de laboratorio puede producir anomalías en la función espermática y en la morfología, daño del epitelio germinal, oligospermia degeneración testicular, decremento en la motilidad espermática, hiperplasia prostática, cambios en el conteo de espermatozoides y en el volumen de eyaculado, infertilidad y esterilidad (Hildebrand, y col., 1973; Lancranjan, y col., 1975; Moorman, 1998; Saygy y col., 1991; Thomas, 1991;

Lamb y col., 1997).

Se ha sugerido que uno de los sitios de mayor impacto en la toxicidad por plomo, es el eje hipotalámico-hipofisiario-gonadal, en consecuencia el plomo ocasiona inhibición de la función testicular manifestada por supresión de la biosíntesis de hormonas sexuales esteroideas y de la espermatogénesis, así como disminución en los niveles de testosterona sérica e intratesticular (Ronis y col., 1998; Sokol, 1987).

4.3. Alteraciones ultraestructurales ocasionadas por plomo en testículo

La administración de plomo en ratones, ratas y monos ocasiona alteraciones ultraestructurales en células de Sertoli, como aumento en el número de gotas de lípidos y en el número y tamaño de los lisosomas, así como estratificación de la lámina basal y deformación de las mitocondrias. En las espermátidas se ha observado la vacuolización del citoplasma, protuberancias en núcleo y acrosoma y la formación anormal de sincitios (Murthy y col., 1991; Murthy y col., 1995; Singh y col., 1993). La administración de plomo en cultivos de células de Leydig ocasiona alteraciones en el retículo endoplásmico liso (Thoreux-Manlay, 1995). En espermatozoides tomados de epidídimo de rata se han encontrado alteraciones en las mitocondrias, las fibras densas y en el axonema causadas por plomo.

4.4 Alteraciones inducidas por cadmio en el sistema reproductor masculino

El cadmio ocasiona necrosis del plexo pampiniforme, el cual tiene la función de enfriar previamente la sangre que llega al testículo, por un mecanismo de intercambio de calor, asegurando así que la sangre tenga una temperatura compatible con la espermatogénesis (Thomas, 1991). Al cadmio se le considera carcinogénico en testículo de rata afectando células intersticiales (Koizumi y Waalkes, 1989; Waalkes y col., 1997), también se ha asociado al carcinoma prostático y al testicular en humano (Kipling y Waterhouse, 1967; Rhomberg y col., 1995). La administración de cadmio en ratas ocasiona daño testicular y reducción de 40% en la fertilidad e incluso necrosis testicular (Cafilisch, 1994; Saygi y col., 1991; Hochadel y Waalkes, 1997). Los testículos de los conejos tratados con cadmio por vía IV u oral, presentan hiperemia, capilares dañados, hemorragia, destrucción de elementos espermatogénicos y necrosis (Foote, 1999). La administración de cadmio también se ha asociado a procesos de

apoptosis en células testiculares de ratas (Xu y col. 1996).

El cadmio ocasiona un decremento en la actividad de la anhidrasa carbónica específica del testículo, incremento en la actividad de la glutatión (GSH) peroxidasa, y un decremento en la glutatión disulfato reductasa en testículo (Aoki y Hoffer, 1978; Chung y Maines, 1987).

4.5. Alteraciones ultraestructurales ocasionadas por cadmio en testículo

Se ha determinado que las células de Sertoli son una de las poblaciones celulares más sensibles del túbulo seminífero al daño ocasionado por cadmio, puesto que son las primeras en recibir la agresión de cualquier sustancia tóxica.

Uno de los efectos adversos del cadmio en éstas células es sobre las uniones ocluyentes, la administración de cloruro de cadmio en monocapas de células de Sertoli altera el mantenimiento de estas uniones (Janecki, 1992).

La administración intraperitoneal de cadmio induce mitosis atípicas en espermatoцитos así como desorganización y fragmentación de los microfilamentos en la región basal de las células de Sertoli (Hew y col., 1993).

JUSTIFICACIÓN

El auge de la era industrial en gran escala ha hecho de la contaminación ambiental una fuente importante de exposición por metales pesados.

Está demostrado que el plomo y el cadmio ocasionan diversas alteraciones debido a la exposición accidental u ocupacional en los humanos, y en animales de laboratorio por vía oral, parenteral o inhalatoria de forma experimental. Esta última ha sido poco estudiada y poco se conoce sobre el daño ocasionado por la inhalación de estos metales en el sistema reproductor masculino.

La función del sistema reproductor masculino es la producción de espermatozoides, y para lograr este objetivo las células de Sertoli contribuyen en gran medida en la regulación de la espermatogénesis, ya que no solo brindan sostén y nutrición a las células germinales, sino que actúan como una barrera para impedir el paso de sustancias dañinas a las células espermátogénicas en desarrollo. Es por ello que uno de los tipos celulares en el testículo más susceptibles a los compuestos tóxicos son precisamente las células de Sertoli.

Por otro lado, está bien documentado que el plomo y el cadmio ocasionan alteraciones morfológicas y funcionales en los organelos de las células de varios órganos; en especial, la mitocondria es uno de los más afectados ya que estos metales alteran los procesos oxidativos mitocondriales y dañan la estructura y permeabilidad de las membranas. Este hecho da la pauta para pensar que también las mitocondrias de las células de Sertoli pudieran sufrir alguna alteración si estos tóxicos llegan al túbulo seminífero y a estas células por vía inhalatoria.

La presente investigación tiene el propósito de identificar las posibles alteraciones morfológicas en las células de Sertoli de ratones machos de la cepa CD-1 como consecuencia de la inhalación de cloruro del cadmio y del acetato de plomo, así como determinar si existe un efecto sinérgico en la exposición combinada a estos metales.

HIPÓTESIS

Si el plomo y cadmio son metales reprotóxicos, y por ende causantes de variadas afecciones, entonces será factible que en un modelo experimental inhalatorio se encuentren alteraciones morfológicas en las células de Sertoli en el testículo del ratón.

OBJETIVO GENERAL

Comprobar que la exposición por vía inhalatoria del acetato de plomo y del cloruro de cadmio administrados individualmente o combinados, pueden generar alteraciones morfológicas en las células de Sertoli de ratones machos de la cepa CD-1

OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar las posibles alteraciones ultraestructurales que ocurren en las células de Sertoli y en las células germinales del parénquima testicular de ratones expuestos a la inhalación de acetato de plomo y de cloruro de cadmio administrados individualmente o combinados.
- Cuantificar el daño mitocondrial, expresado en pérdida de crestas mitocondriales, en células de Sertoli en los testículos de los mismos animales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 72 ratones machos de la cepa CD-1 con un peso promedio de 30 g. que fueron sometidos a los siguientes modelos de inhalación por una hora 2 veces a la semana durante cuatro semanas.

HIPÓTESIS

Si el plomo y cadmio son metales reprotóxicos, y por ende causantes de variadas afecciones, entonces será factible que en un modelo experimental inhalatorio se encuentren alteraciones morfológicas en las células de Sertoli en el testículo del ratón.

OBJETIVO GENERAL

Comprobar que la exposición por vía inhalatoria del acetato de plomo y del cloruro de cadmio administrados individualmente o combinados, pueden generar alteraciones morfológicas en las células de Sertoli de ratones machos de la cepa CD-1

OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar las posibles alteraciones ultraestructurales que ocurren en las células de Sertoli y en las células germinales del parénquima testicular de ratones expuestos a la inhalación de acetato de plomo y de cloruro de cadmio administrados individualmente o combinados.
- Cuantificar el daño mitocondrial, expresado en pérdida de crestas mitocondriales, en células de Sertoli en los testículos de los mismos animales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 72 ratones machos de la cepa CD-1 con un peso promedio de 30 g. que fueron sometidos a los siguientes modelos de inhalación por una hora 2 veces a la semana durante cuatro semanas.

HIPÓTESIS

Si el plomo y cadmio son metales reprotóxicos, y por ende causantes de variadas afecciones, entonces será factible que en un modelo experimental inhalatorio se encuentren alteraciones morfológicas en las células de Sertoli en el testículo del ratón.

OBJETIVO GENERAL

Comprobar que la exposición por vía inhalatoria del acetato de plomo y del cloruro de cadmio administrados individualmente o combinados, pueden generar alteraciones morfológicas en las células de Sertoli de ratones machos de la cepa CD-1

OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar las posibles alteraciones ultraestructurales que ocurren en las células de Sertoli y en las células germinales del parénquima testicular de ratones expuestos a la inhalación de acetato de plomo y de cloruro de cadmio administrados individualmente o combinados.
- Cuantificar el daño mitocondrial, expresado en pérdida de crestas mitocondriales, en células de Sertoli en los testículos de los mismos animales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 72 ratones machos de la cepa CD-1 con un peso promedio de 30 g. que fueron sometidos a los siguientes modelos de inhalación por una hora 2 veces a la semana durante cuatro semanas.

HIPÓTESIS

Si el plomo y cadmio son metales reprotóxicos, y por ende causantes de variadas afecciones, entonces será factible que en un modelo experimental inhalatorio se encuentren alteraciones morfológicas en las células de Sertoli en el testículo del ratón.

OBJETIVO GENERAL

Comprobar que la exposición por vía inhalatoria del acetato de plomo y del cloruro de cadmio administrados individualmente o combinados, pueden generar alteraciones morfológicas en las células de Sertoli de ratones machos de la cepa CD-1

OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar las posibles alteraciones ultraestructurales que ocurren en las células de Sertoli y en las células germinales del parénquima testicular de ratones expuestos a la inhalación de acetato de plomo y de cloruro de cadmio administrados individualmente o combinados.
- Cuantificar el daño mitocondrial, expresado en pérdida de crestas mitocondriales, en células de Sertoli en los testículos de los mismos animales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 72 ratones machos de la cepa CD-1 con un peso promedio de 30 g. que fueron sometidos a los siguientes modelos de inhalación por una hora 2 veces a la semana durante cuatro semanas.

- a) Acetato de plomo al 0.001 M (Valverde. 1997).
- b) Cloruro de cadmio al 0.006 M (López, 1994; Sánchez, 1994).
- c) Acetato de plomo + cloruro de cadmio a las concentraciones anteriores.

En cada modelo se incluyeron 16 animales expuestos y 8 animales testigo. Los animales testigo inhalaban solamente el vehículo para hacer la solución (agua bidestilada y deionizada)

Sustancias químicas utilizadas

El acetato de plomo y el cloruro de cadmio fueron del laboratorio Sigma Chemical Co., (St. Louis, MO, USA). De Electron Microscopy Sciences (Fort Washington, Pa, USA) se utilizaron el glutaraldehído, el cacodilato de sodio, la resina Araldita 6005, el acetato de uranilo y el citrato de plomo. El alcohol etílico fue de J.T. Baker (México).

Método de inhalación (López, 1994; Sánchez, 1994)

Los ratones se colocaron en una caja de acrílico transparente de 31.47 cm³ a la que se conectó un ultranebulizador (Ultra Neb 99 DeVilbis), con un flujo de 10 litros/min.

Después de cada inhalación los animales fueron colocados en sus cajas, dándoles a libre acceso agua y alimento comercial (Purina).

Protocolo de exposiciones (López, 1994; Sánchez, 1994)

Las inhalaciones se realizaron 2 días a la semana y los sacrificios se llevaron a cabo una vez por semana. Se anestesiaron con pentobarbital sódico cuatro animales expuestos y dos testigos por semana en cada modelo. De esta manera obtuvimos inhalaciones aguda y subcrónicas inhalación aguda en la primera semana y subcrónica en las siguientes (Tabla 5).

Toma de muestras y procesamiento del tejido para Microscopía Electrónica de Transmisión

Se anestesiaron con pentobarbital sódico 4 animales expuestos y 2 animales testigo de cada modelo por semana. Una vez anestesiados, los animales fueron perfundidos a través del ventrículo izquierdo con solución salina seguida por el fijador (glutaraldehído al 2.5% en buffer de cacodilatos 0.1M, pH 7.4).

Los testículos fueron removidos y cortados en pequeños bloques, los cuales fueron postfijados en OsO₄ al 1 % durante una hora y lavados tres veces con amortiguador de cacodilato de sodio (0.15M, pH 7.4), cada lavado tuvo una duración de 15 minutos

Se procedió a deshidratar las muestras con etanol en concentraciones crecientes (50%, 70% 80% y 95%) durante 10 minutos en cada uno de ellos y posteriormente se hicieron tres cambios con etanol al 100% durante 15 minutos cada uno. Previo a la infiltración, se realizaron dos cambios con tolueno durante 10 minutos cada uno.

Las muestras se infiltraron con una mezcla de Araldita 6005 y tolueno 1:1 a 60°C durante una hora y después en una mezcla resina-tolueno 3:1 a temperatura ambiente por 24 horas. Las muestras se colocaron en moldes de inclusión con Araldita 6005 y se dejaron a 60 °C por 24 horas.

Las secciones semifinas (1 µm) fueron teñidas con azul de toluidina y examinadas por microscopía de luz. Las secciones finas (60 a 80 nm) se colocaron en rejillas de cobre y posteriormente fueron contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo para ser examinadas en el microscopio electrónico de transmisión.

Se tomaron fotografías para determinar alteraciones ultraestructurales en organelos de células de Sertoli y células germinales. También se realizó un análisis ultraestructural en las células de Sertoli, contando las mitocondrias con crestas normales y las que presentaron pérdida de crestas en 100 µ² de citoplasma por célula de Sertoli.

Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de ANOVA con dos criterios de clasificación para analizar los datos obtenidos de las observaciones realizadas en mitocondrias de 30 células de Sertoli por cada exposición de cada modelo, utilizando como parámetro, la pérdida de crestas

mitocondriales. Los valores obtenidos fueron transformados a datos de distribución normal y se determinó la diferencia mínima significativa. Los cálculos se hicieron usando el paquete de computación JUMP. Se usó un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Tabla 5
Protocolo de exposiciones

		Testigos (no. de animales) Exposición a agua deionizada	Expuestos (no. de animales) Exposición a cloruro de cadmio, acetato de plomo o cloruro de cadmio+ acetato de plomo
Exposición Aguda	1 ^a . exposición	8	16
	2 ^a . exposición	8	16
	Sacrificio	2	4
Exposición subcrónica	3 ^a . exposición	6	12
	4 ^a . exposición	6	12
	Sacrificio	2	4
Exposición subcrónica	5 ^a . exposición	4	8
	6 ^a . exposición	4	8
	Sacrificio	2	4
Exposición subcrónica	7 ^a . xposición	2	4
	8 ^a . exposición	2	4
	Sacrificio	2	4

RESULTADOS

En el presente estudio, las células de Sertoli de los testículos de los animales expuestos a cloruro de cadmio y acetato de plomo o la combinación de ambos, muestran alteraciones ultraestructurales como vacuolización y degeneración del citoplasma, además se observó la presencia de estructuras similares a cuerpos residuales y la pérdida de crestas mitocondriales. Entre las células de Sertoli y las células germinales se observó pérdida de la continuidad entre las membranas plasmáticas. En cuanto a las células germinales se pudieron observar células degeneradas que presentaron cromatina irregular y núcleo salpicado de manchas, espermátidas tardías con núcleos deformes y también se observaron mitocondrias con crestas deformes y electrodensas (Tabla 6).

La observación de la morfología de las células de Sertoli de los animales testigo corresponden a la descripción de estas células en ratones normales y se distinguen por el núcleo irregular con escotaduras y un nucleolo bien diferenciado (Fig. 1) (Gardner y Holyoke, 1964).

Uno de los primeros cambios observados en los animales expuestos es la vacuolización del citoplasma de las células de Sertoli, la cual se presentó desde la segunda exposición en los tres modelos de inhalación (Figs. 2, 3 y 4).

En los animales expuestos a la inhalación de cloruro de cadmio así como los animales del grupo expuesto a la combinación de acetato de plomo y cloruro de cadmio, presentaron degeneración del citoplasma de las células de Sertoli a partir de la 4ª exposición (Figs. 5 y 6). En cambio, en el grupo expuesto a la inhalación de acetato de plomo, esta alteración se observó después de la 6ª exposición (Fig. 7).

A diferencia del grupo testigo, los grupos expuestos presentaron estructuras similares a cuerpos residuales en el citoplasma de las células de Sertoli (Figs. 8 y 9). La presencia de estas estructuras es atribuible a la fagocitosis de gametos dañados. Estos cuerpos residuales fueron observados en la última exposición en los tres modelos (8ª exposición).

En los animales expuestos al cloruro de cadmio y a la combinación del acetato de plomo + el cloruro de cadmio, se observó que en algunas zonas del túbulo seminífero había la pérdida de continuidad de las membranas plasmáticas de las células germinales y las células de Sertoli (Figs. 10, 11 y 12).

En cuanto a las espermatogonias, en los túbulos seminíferos de los animales testigos, se encuentran en contacto con la membrana limitante y se distinguen por sus núcleos ovales en el caso de las espermatogonias tipo A (Fig. 13) y núcleos redondos en las de

tipo B (Fig. 14). Otro grupo identificable por la presencia de complejos sinaponémicos es el espermatocito primario (Fig. 1) (Courot y col., 1970).

En las micrografías electrónicas de los ratones expuestos a la combinación de acetato de plomo y cloruro de cadmio, desde la 6ª inhalación fue posible observar células germinales degeneradas que mostraron condensación irregular de la cromatina (Fig. 15). En cambio, es hasta la 8ª exposición que se observaron este tipo de células en los animales expuestos a acetato de plomo y en los expuestos a cloruro de cadmio (Figs. 16 y 17).

Durante la espermiogénesis el núcleo de las espermátidas cambia de forma, al inicio es esférico y con el carioplasma finamente particulado (Fig. 18); al final de esta etapa, el núcleo es plano con la cromatina condensada (Fig. 19) (Courot y col., 1970). A diferencia de los grupos testigos, en el grupo expuesto a la combinación de acetato de plomo y cloruro de cadmio se observaron espermátidas tardías con núcleo deforme en la 8ª inhalación (Fig. 20).

En el presente estudio se observó que en las células de Sertoli de los animales expuestos, las mitocondrias presentaron pérdida de crestas. En los animales testigo, las mitocondrias de las células de Sertoli son de tipo vesicular (Fig. 21) (Gardner y Holyoke, 1964). Sin embargo, es evidente la pérdida de crestas mitocondriales en las células de Sertoli de los grupos expuestos desde la 2ª inhalación (Figs. 22, 23 y 24).

Las mitocondrias normales de los espermatocitos primarios son esféricas u ovoides con crestas curvas que presentan cierto grado de dilatación intracrestal (Fig. 25). En los espermatocitos secundarios y en las espermátides tempranas, las crestas mitocondriales son empujadas a la periferia dejando un gran espacio en el centro (Fig. 26) (Gardner y Holyoke, 1964; Meinhardt y col., 2000). A diferencia de estas imágenes, en los animales expuestos las crestas mitocondriales se observaron electrodensas y de forma redondeada. Estos cambios ocurrieron desde la 4ª exposición en el grupo de acetato de plomo más cloruro de cadmio (Fig. 27), a la partir de la 6ª inhalación en los expuestos a cloruro de cadmio (Fig. 28) y en la última exposición (8ª) en los animales que inhalaron acetato de plomo (Fig. 29).

El organelo más afectado por la inhalación de los metales utilizados en este estudio fue la mitocondria; para cuantificar el daño provocado por la inhalación de cadmio y plomo. se contaron las mitocondrias normales y las que presentaron pérdida de crestas en las células de Sertoli. No fue evaluado el daño en mitocondrias de las células germinales ya que en éstas, las mitocondrias cambian la morfología, número y localización durante el

proceso de transformación desde espermatogonia a espermatozoide (Meinhardt y col, 2000).

Se contaron las mitocondrias que presentaban pérdida de crestas en $100 \mu^2$ del citoplasma de las células de Sertoli. La Tabla 7 muestra la media del porcentaje de mitocondrias con pérdida de crestas de 30 células de Sertoli por exposición en cada modelo.

En los animales expuestos a 2 y 4 inhalaciones con acetato de plomo el porcentaje de mitocondrias dañadas no fue significativo en comparación a los ratones testigo, mientras que la 6ª y la 8ª exposición resultaron significativamente mayores ($p < 0.05$) (Gráfica 1).

El daño ocasionado por el cloruro de cadmio se produce desde la 4ª exposición. En la gráfica 2 se observa que el daño ocasionado por este metal, el cual tiende a aumentar en forma dosis-respuesta. La 6ª y 8ª exposición muestran diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a grupo testigo.

En la gráfica 3 se puede distinguir que los animales expuestos a acetato de plomo + cloruro de cadmio, a diferencia de los animales de los otros grupos presentan daño mitocondrial desde la 2ª. exposición.

En la gráfica 4 se representan los porcentajes de mitocondrias dañadas en los tres modelos. En la segunda exposición, al comparar el daño ocasionado por el acetato de plomo con el ocasionado por el cloruro de cadmio, no hay diferencia significativa, mientras que al comparar la combinación de acetato de plomo + cloruro de cadmio con los metales por separado, si hubo diferencia significativa ($p < 0.05$). En las siguientes exposiciones, se observa claramente que la exposición a acetato de plomo + cloruro de cadmio es la que ocasiona mayor daño, y que el cloruro de cadmio induce mayor daño que el acetato de plomo existiendo diferencias significativas ($p < 0.05$).

TABLA 6

Alteraciones ultraestructurales ocasionadas por la inhalación de acetato de plomo, cloruro de cadmio y acetato de plomo+cloruro de cadmio en células de Sertoli de ratones macho CD-1

Alteraciones	Día 2 de exposición				Día 4 de exposición				Día 6 de exposición				Día 8 de exposición			
	T	Pb	Cd	Pb + Cd	T	Pb	Cd	Pb + Cd	T	Pb	Cd	Pb + Cd	T	Pb	Cd	Pb + Cd
Vacuolización en c. de Sertoli	-	+	+	+	-	+	++	++	-	++	+++	+++	-	++	+++	+++
Degeneración del citoplasma de la célula de Sertoli	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	++	++	-	++	+++	+++
Estructuras similares a cuerpos residuales en c. de Sertoli	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	++
Pérdida de continuidad de membranas plasmáticas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
Células germinales degeneradas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
Espermátides tardías con núcleo deforme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Pérdida de crestas mitocondriales en célula de Sertoli	-	+	+	+	-	++	++	++	-	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++
Células espermatogénicas con crestas mitocondriales electrodensas u deformes	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	++	+++

(-) Normal

(+) Leve

(++) Moderado

(+++) Severo

T= Testigo

Pb= acetato de plomo

Cd= cloruro de cadmio

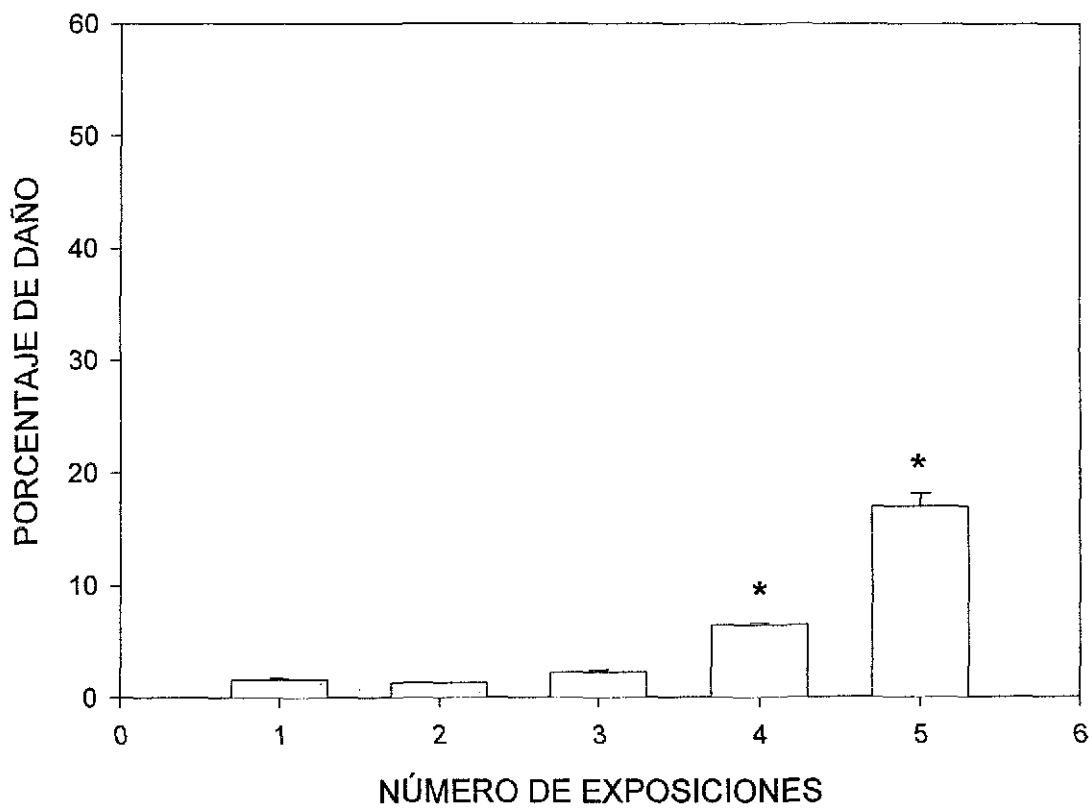
Pb+Cd= acetato de plomo y cloruro de cadmio

Tabla 7

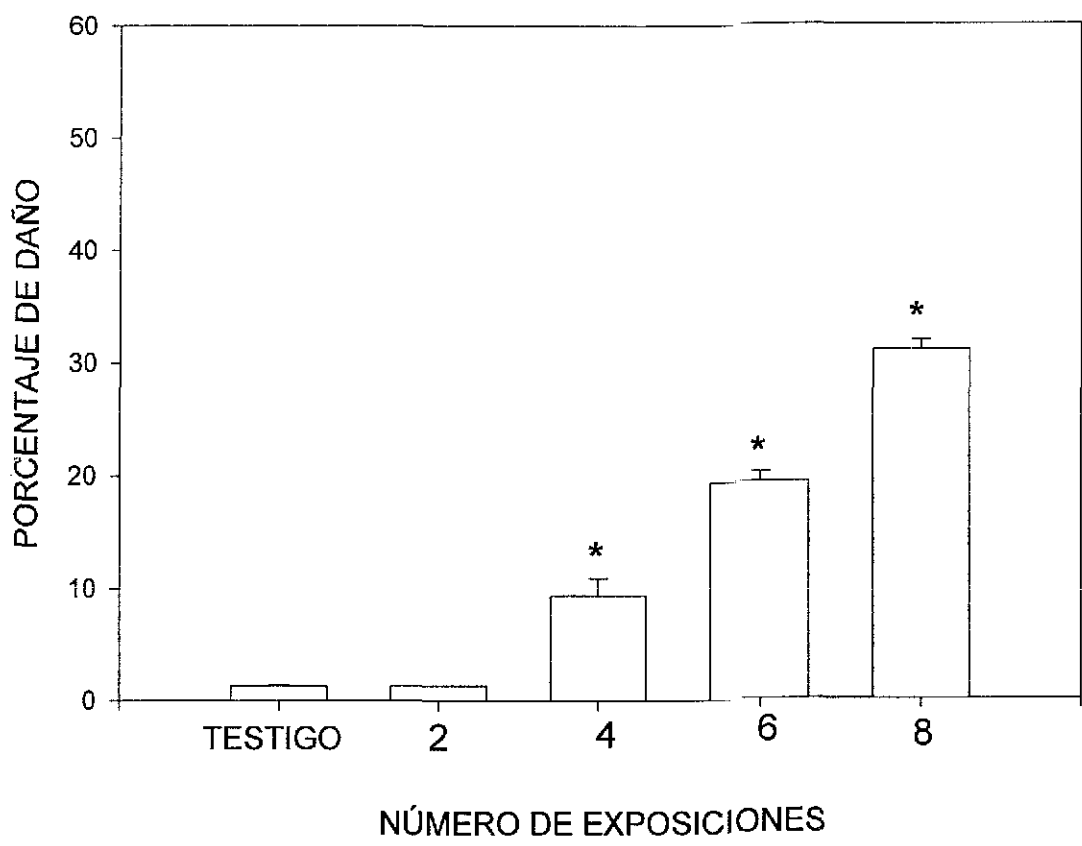
Porcentaje de mitocondrias con pérdida de crestas en las células de Sertoli de ratones expuestos a acetato de plomo, cloruro de cadmio o acetato de plomo y cloruro de cadmio

Metal	Grupo testigo	2 exposiciones (Agudo)	4 exposiciones (Subcrónico)	6 exposiciones (Subcrónico)	8 exposiciones (Subcrónico)
Acetato de plomo	1.6±0.11	1.3±0.01	2.24±0.19	6.48±0.14*	16.99±1.17*
Cloruro de cadmio	1.30±0.13	1.29±0.02	9.35±1.54*	19.35±0.8*	31.05±0.92*
Acetato de plomo + cloruro de cadmio	1.66±0.3	4.86±0.29*	25.84±0.32*	36.39±0.37*	50.19±0.97*

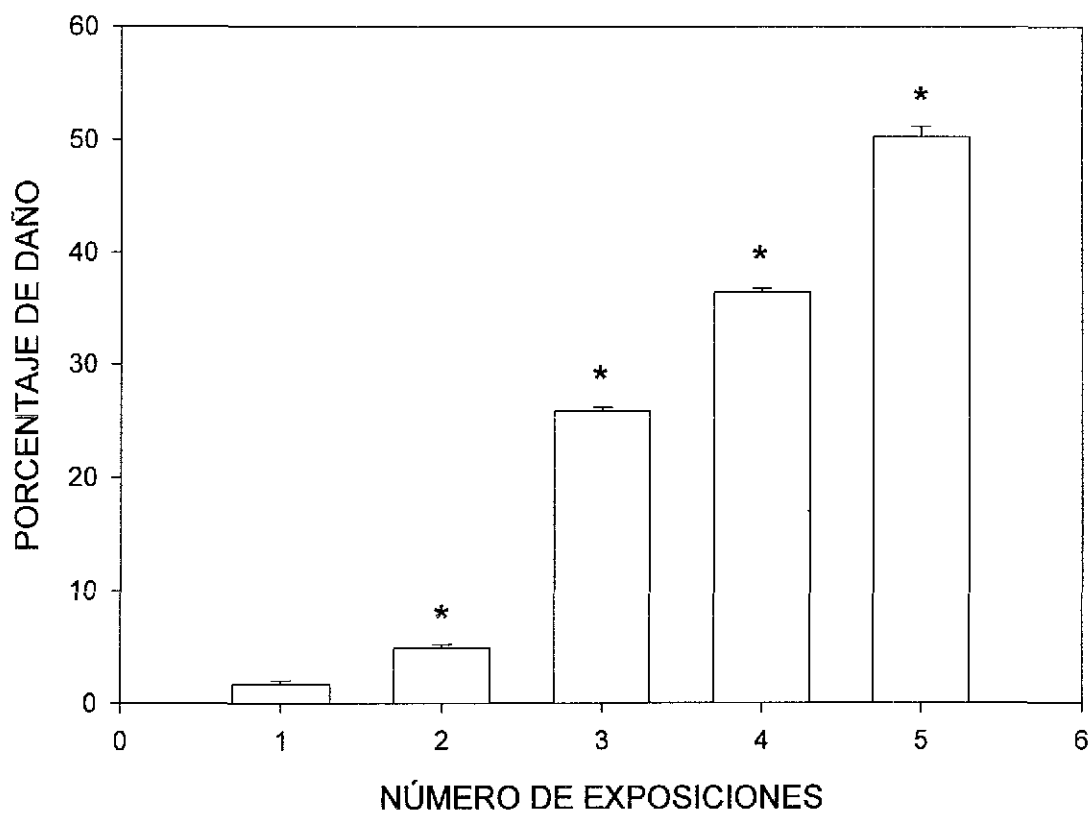
*p<0.005 (ANOVA contra testigo)



Gráfica 1. Representación de las medias y error estándar de las mitocondrias que presentaron pérdida de crestas observadas en una superficie de $100 \mu\text{m}^2$ de 30 células de Sertoli de ratones expuestos a la inhalación de acetato de plomo (0.001M).
 * $p < 0.05$. (ANOVA)

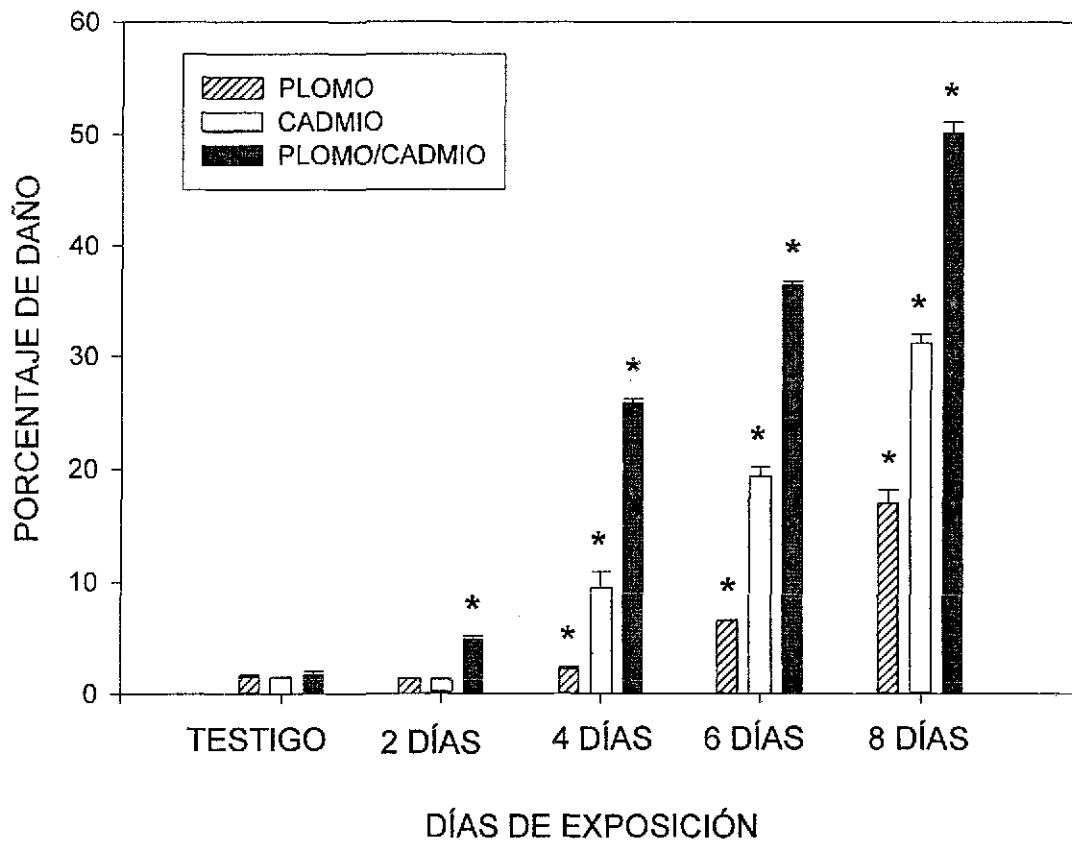


Gráfica 2. Representación de las medias y error estandar de las mitocondrias que presentaron pérdida de crestas observadas en una superficie de $100 \mu\text{m}^2$ de 30 células de Sertoli de ratones expuestos a la inhalación de cloruro de cadmio (0.006 M).
* $p < 0.05$. (ANOVA contra el testigo).



Gráfica 3. Representación de las medias y error estandar de las mitocondrias que presentaron pérdidas de crestas en una superficie de $100 \mu\text{m}^2$ de 30 células de Sertoli de ratones expuestos a la inhalación de acetato de plomo (0.001 M) y cloruro de cadmio (0.006 M).
* $p < 0.05$. (ANOVA contra el testigo)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Gráfica 4. Comparación entre los resultados obtenidos en cada modelo. En la segunda inhalación la exposición con la combinación plomo/cadmio se obtuvo una diferencia significativa ($*p < 0.05$), comparándolo con la utilización de cadmio o plomo, entre estos últimos no hubo diferencia significativa. En las siguientes exposiciones se obtuvieron diferencias significativas entre cada modelo. (ANOVA contra los testigos)

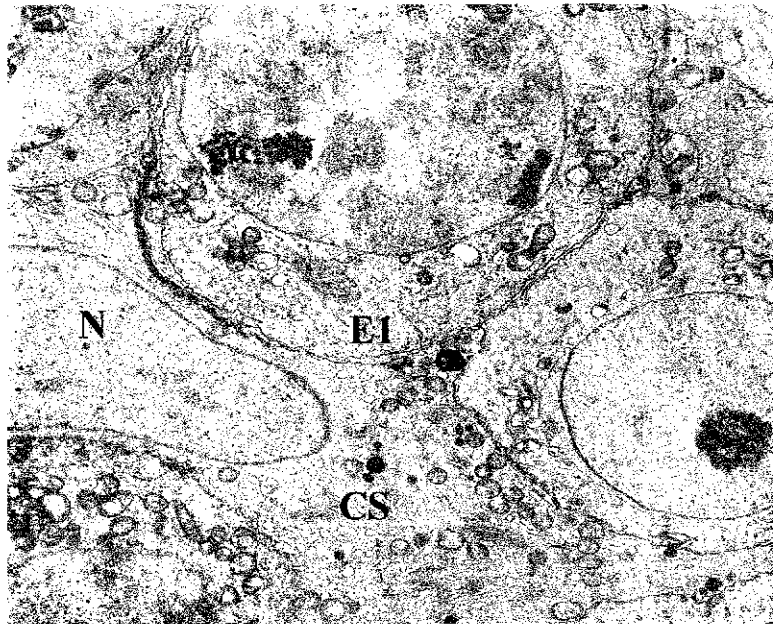


Fig 1. Micrografía electrónica de una porción del túbulo seminífero de un ratón testigo, la cual muestra parte del núcleo(N) de una célula de Sertoli(CS). Espermatocito primario(E1). 5600 X

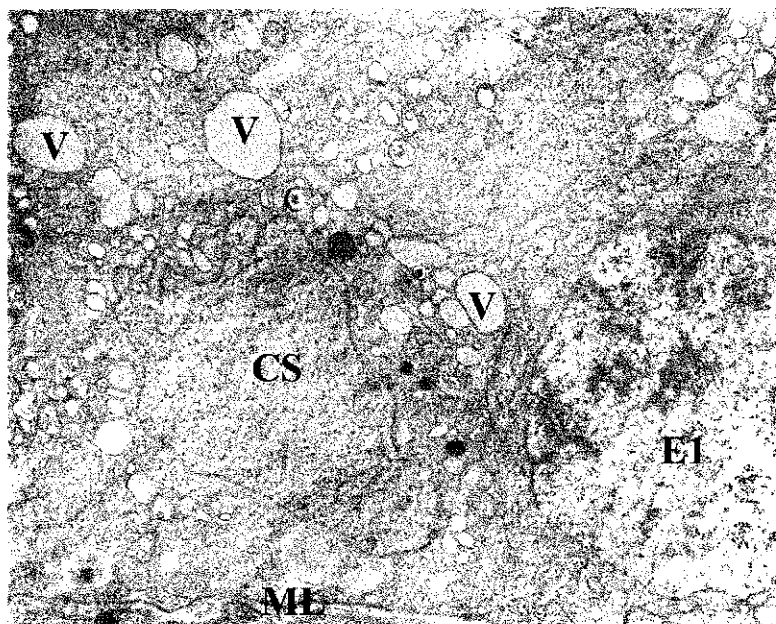


Fig. 2. Micrografía electrónica del túbulo seminífero de un ratón expuesto a dos inhalaciones con acetato de plomo. La célula de Sertoli (CS) se identifica por el núcleo irregular, el citoplasma presenta numerosas vacuolas (V). Espermatocito primario (E1); Membrana limitante (ML). 6000 X

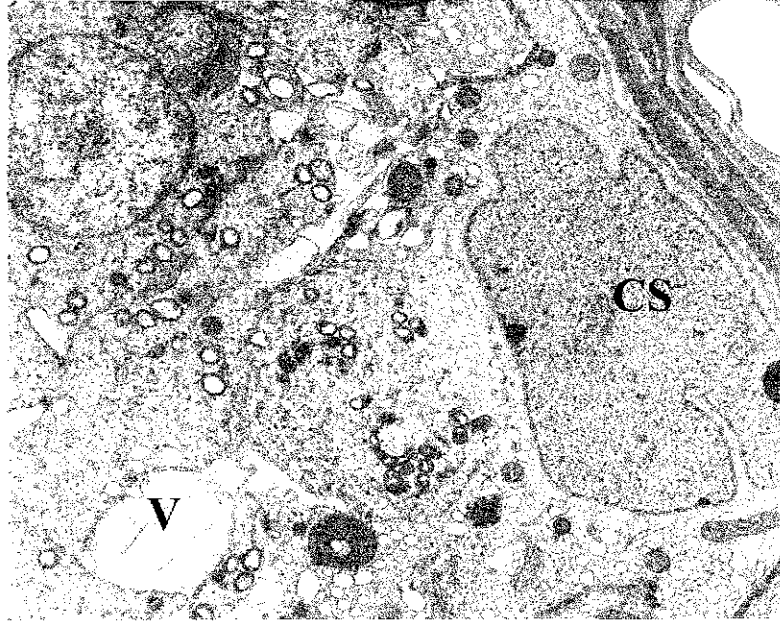


Fig. 3. Micrografía de una porción del túbulo seminífero de un animal expuesto a dos inhalaciones de cloruro de cadmio mostrando la presencia de vacuolas (V) en la célula de Sertoli. Núcleo de la célula de Sertoli (CS). 5000 X

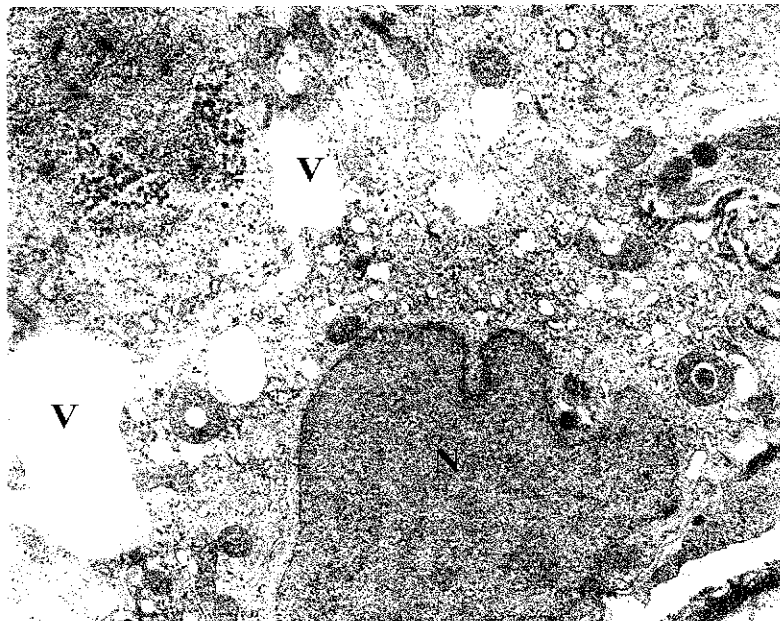
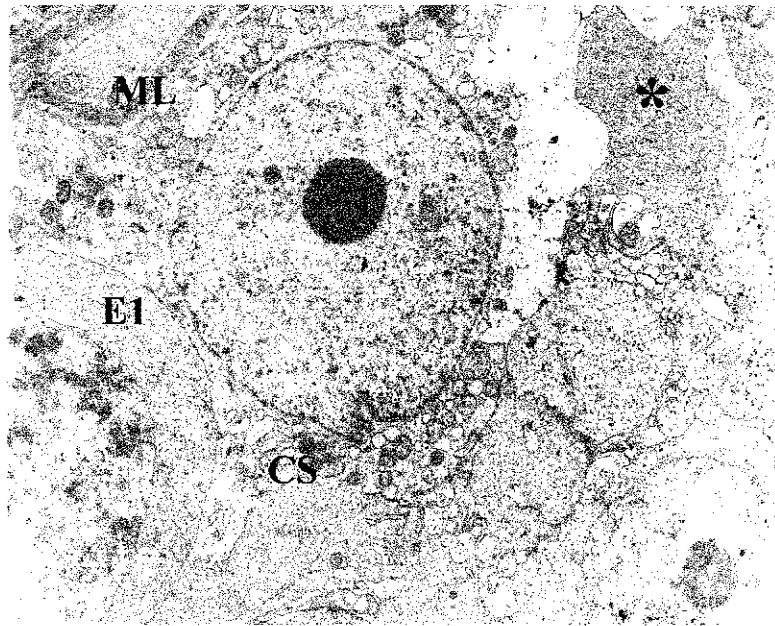


Fig. 4. Micrografía electrónica que muestra vacuolas (V) en el citoplasma de una célula de Sertoli de un animal expuesto a dos inhalaciones de acetato de plomo + cloruro de cadmio. Núcleo de la célula de Sertoli (N). 8000 X.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 5. Micrografía electrónica de una porción del túbulo seminífero de un animal expuesto a 4 inhalaciones de cloruro de cadmio mostrando la degeneración del citoplasma (*) de la célula de Sertoli (CS). Espermatocito primario (E1); membrana limitante (ML). 5700 X.

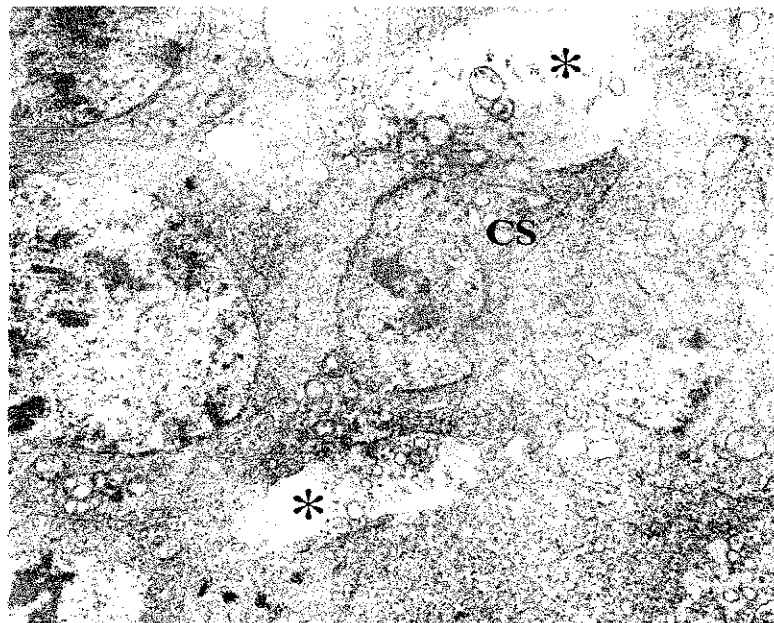
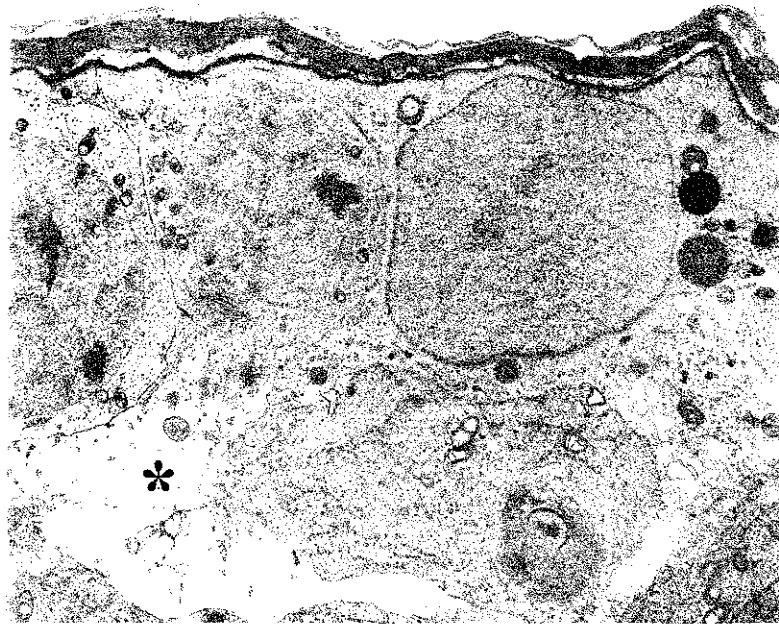


Fig. 6. Micrografía electrónica de una porción de túbulo seminífero de un ratón expuesto a la 4ª inhalación de acetato de plomo + cloruro de cadmio en la que se puede observar que el citoplasma de la célula de Sertoli (CS) presenta zonas degeneradas con pérdida de organitos (*). 4000 X.



TESIS CON
PAGINA DE ORIGEN

Fig. 7. Micrografía electrónica que muestra el área basal de un túbulo seminífero de un ratón expuesto a 6 inhalaciones con acetato de plomo. El citoplasma de la célula de Sertoli presenta zonas de degeneración (*). 4100 X.

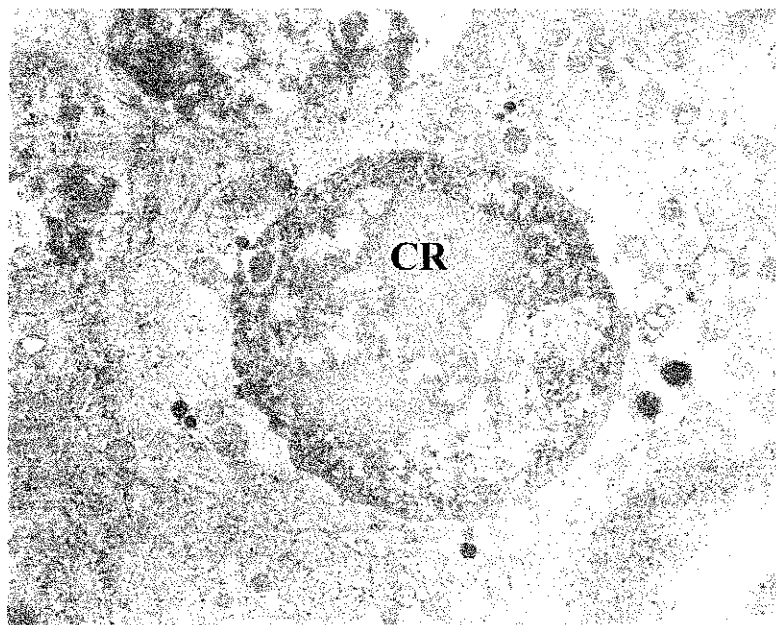
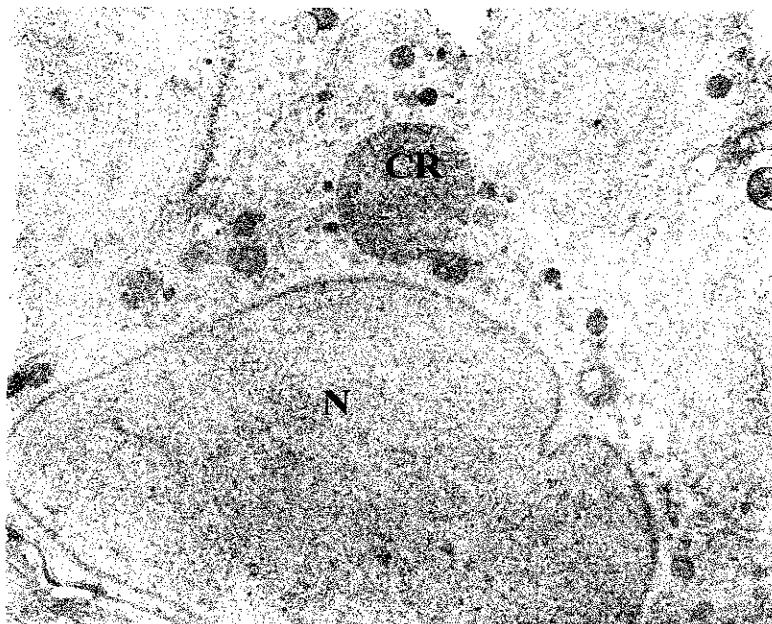


Fig. 8. Micrografía electrónica de la porción de un túbulo seminífero en un ratón expuesto a 8 inhalaciones con acetato de plomo. Muestra la estructura similar a un cuerpo residual (CR) en el citoplasma de una célula de Sertoli. 5200 X.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 9. Micrografía electrónica que muestra una estructura similar a un cuerpo residual (CR) en un ratón expuesto a 8 inhalaciones con cloruro de cadmio. Núcleo de la célula de Sertoli (N). 8000 X

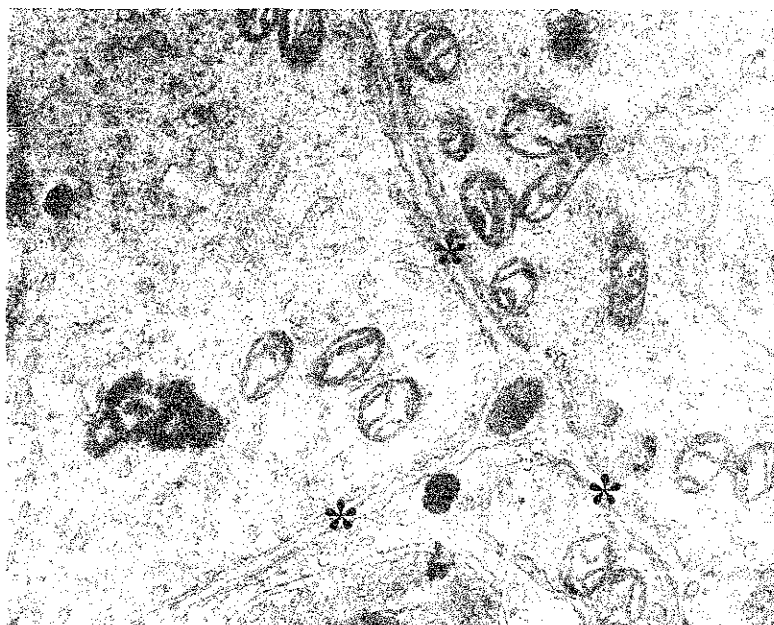
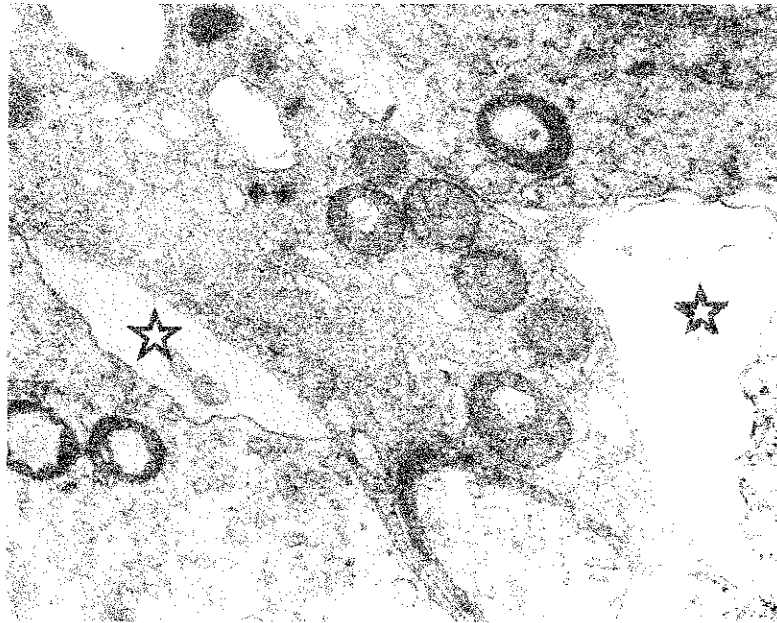


Fig. 10. Micrografía electrónica de una porción de túbulo seminífero de un ratón testigo donde se muestra la continuidad de las membranas plasmáticas de células adyacentes (*). 18650X.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 11. Micrografía electrónica de una porción de túbulo seminífero de un ratón expuesto a 6 inhalaciones de cloruro de cadmio donde se puede observar la pérdida de continuidad de las membranas plasmáticas de células adyacentes (*). 18600 X.

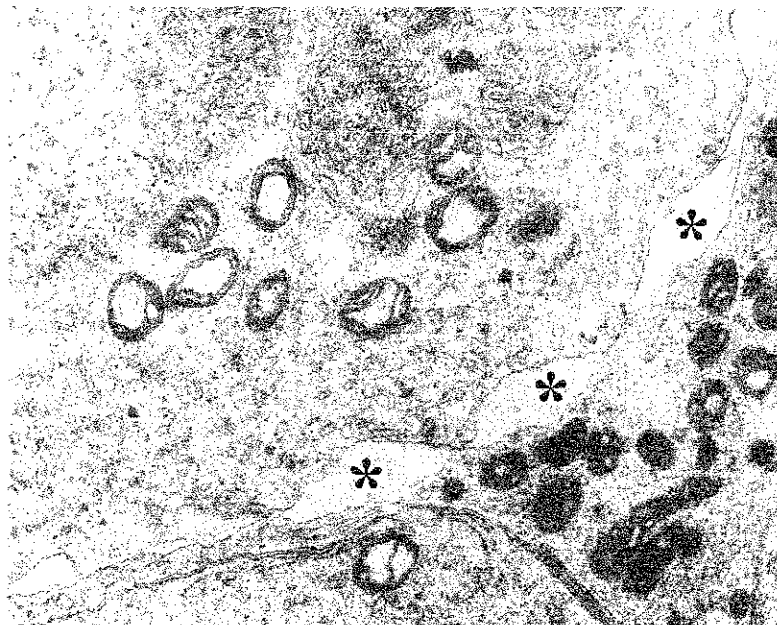
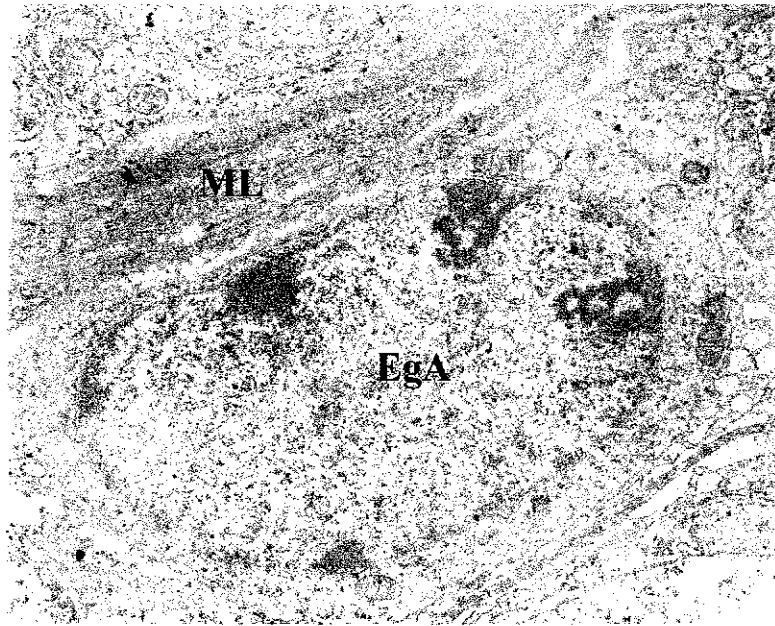


Fig. 12. Micrografía electrónica de una porción de túbulo seminífero de un ratón expuesto a 6 inhalaciones de acetato de plomo + cloruro de cadmio. Los asteriscos muestran las zonas donde hay pérdida de continuidad de las membranas plasmáticas de células adyacentes. 18650X.



TESIS CON
ORIGEN

Fig. 13. Micrografía electrónica de una espermatogonia tipo A (EgA) de un ratón testigo. La célula tiene forma oval al igual que el núcleo, el cual es oval y grande, el nucleoplasma es finamente granular con gránulos electrodensos asociados a la membrana nuclear. La célula, parcialmente rodeada por la célula de Sertoli, está en contacto con la membrana limitante (ML). 9600 X.

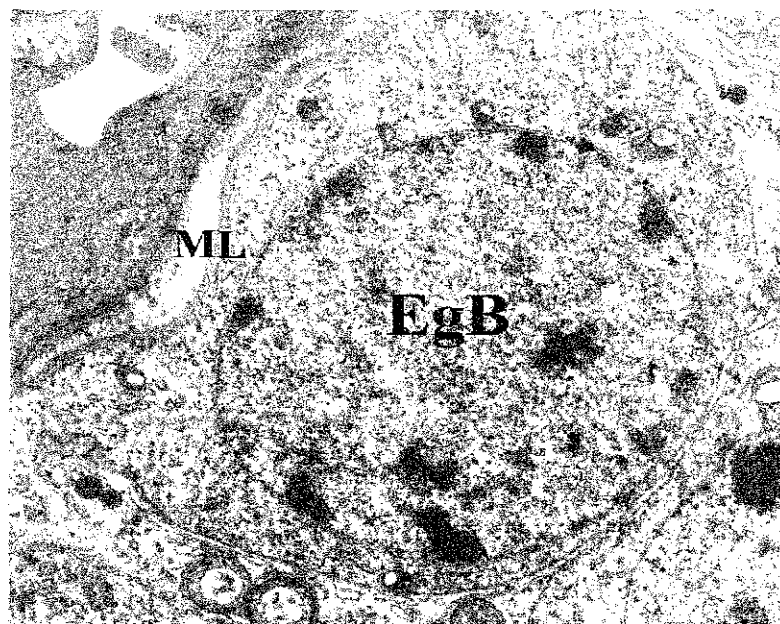


Fig. 14. Micrografía electrónica de una espermatogonia tipo B (EgB) en la que se aprecia su forma redondeada y está situada en contacto con la membrana limitante (ML). 10240 X.

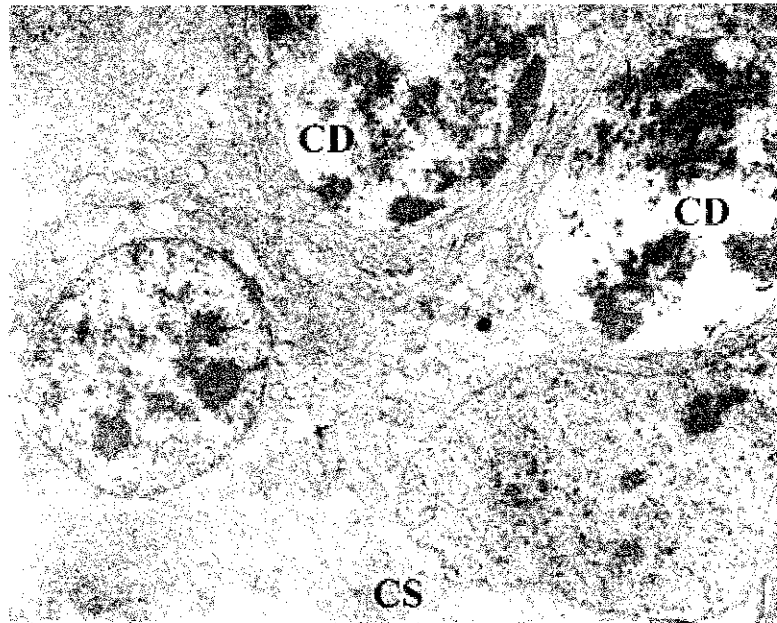


Fig. 15. Micrografía electrónica de células germinales de un ratón expuesto a 6 inhalaciones de cloruro de cadmio + acetato de plomo. Las células degeneradas (CD) presentan la cromatina irregular y el núcleo salpicado de manchas. Célula de Sertoli (CS). 5600 X.

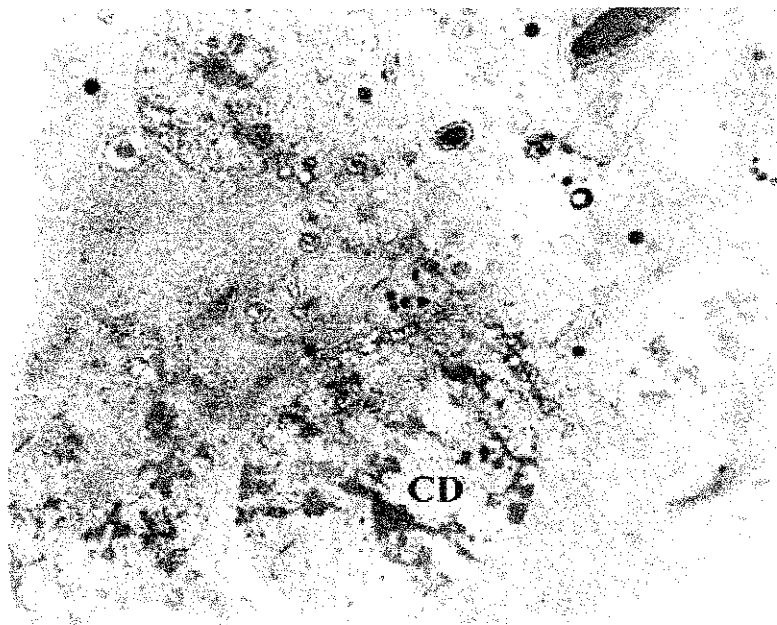
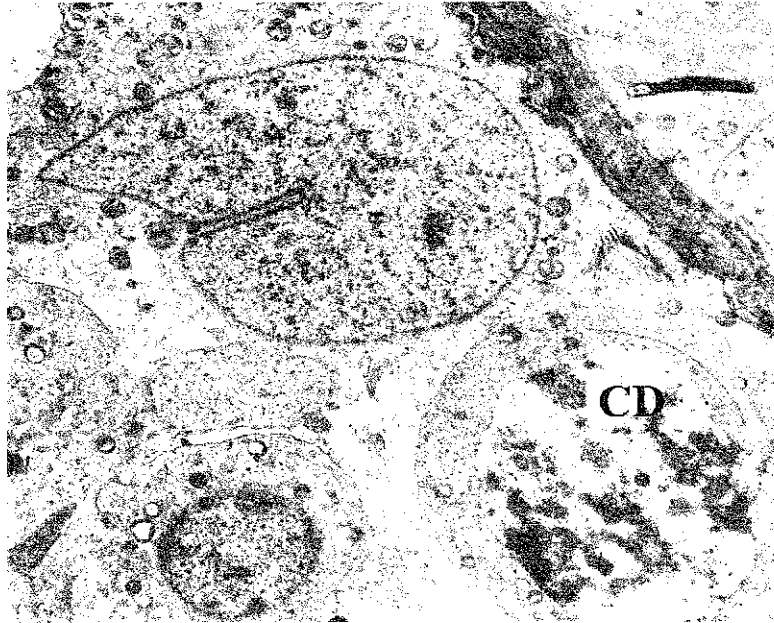


Fig. 16. Micrografía electrónica que muestra la presencia de una célula degenerada (CD) en un animal expuesto a 8 inhalaciones con acetato de plomo. 4000 X.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 17. Micrografía electrónica de una porción de túbulo seminífero en la que se observa una célula degenerada (CD) en la 8ª inhalación de cloruro de cadmio. 4400 X.

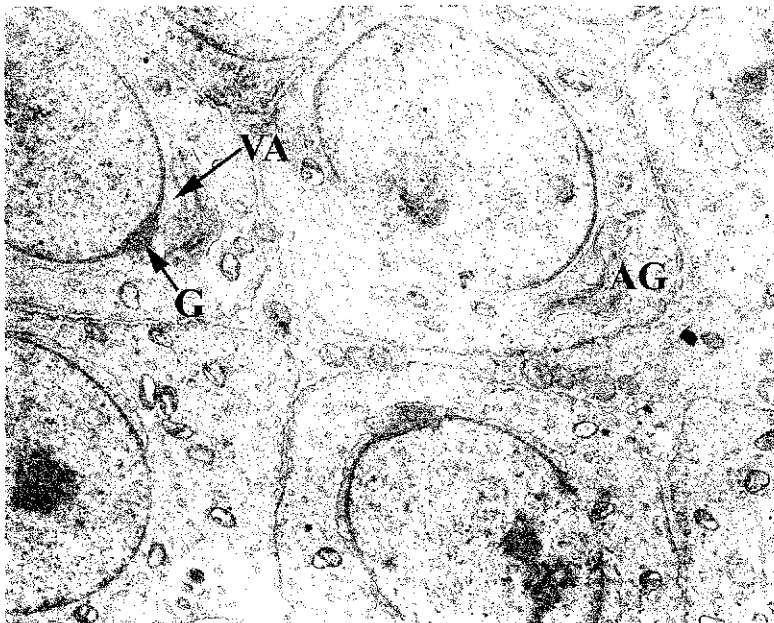
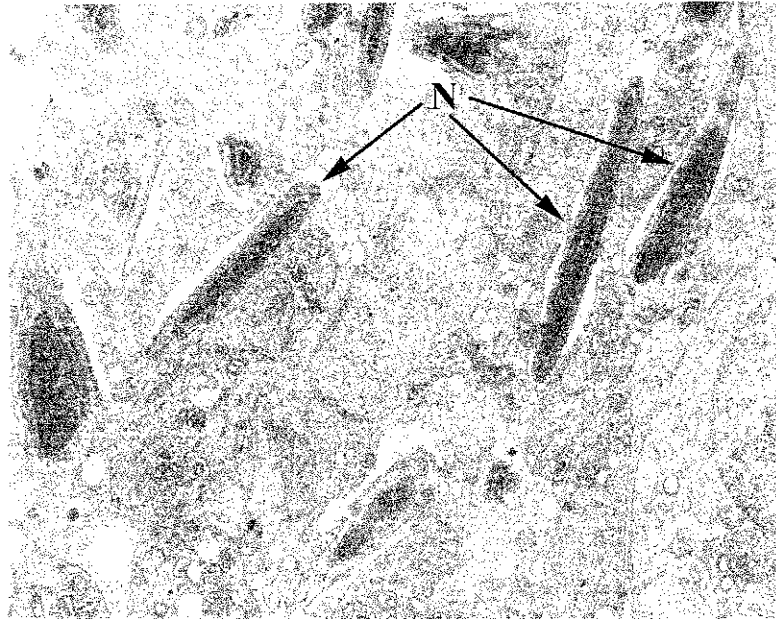


Fig. 18. Micrografía electrónica mostrando un grupo de espermátides en diferentes estados de maduración de una porción del túbulo seminífero de un ratón testigo. Sistema de Golgi (G); gránulo acrosomal (AG); vesícula acrosomal (VA). 6400 X.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 19. Micrografía electrónica de espermátides tardías de un ratón testigo que muestran la morfología normal de los núcleos (N). 5000 X.

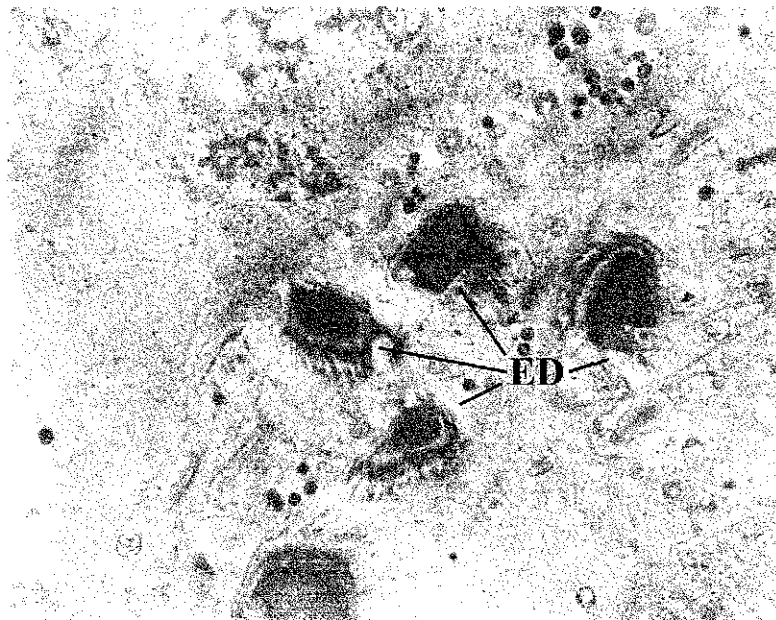
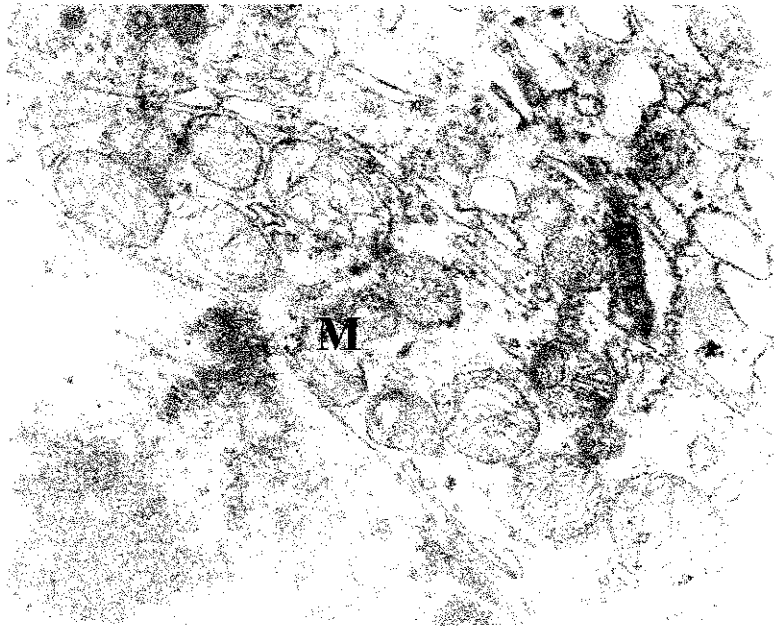


Fig. 20. Micrografía electrónica de un animal expuesto a 8 inhalaciones de acetato de plomo + cloruro de cadmio. Note que observan espermátides tardías con núcleo deforme (ED). 4800 X.



TESIS CON
CARTA DE ORIGEN

Fig. 21. Micrografía electrónica de mitocondrias con crestas vesiculares (M) de una célula de Sertoli de un ratón testigo. 20400 X.

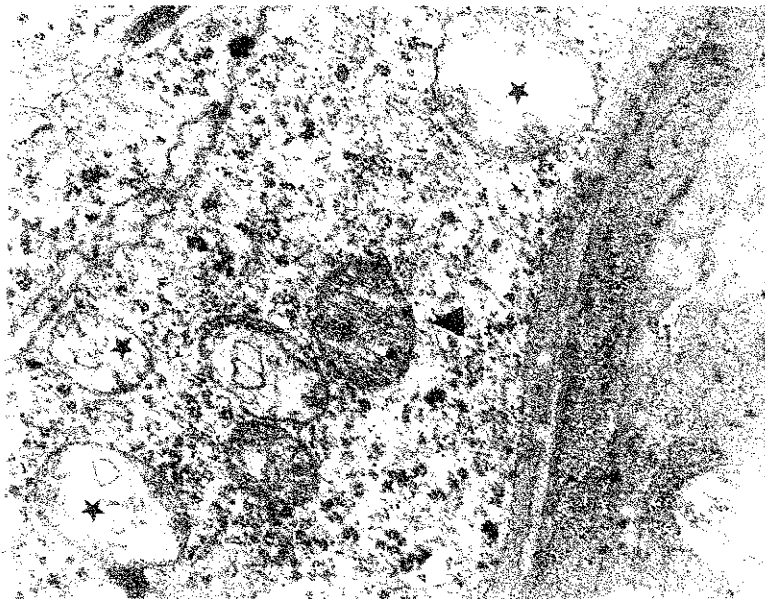
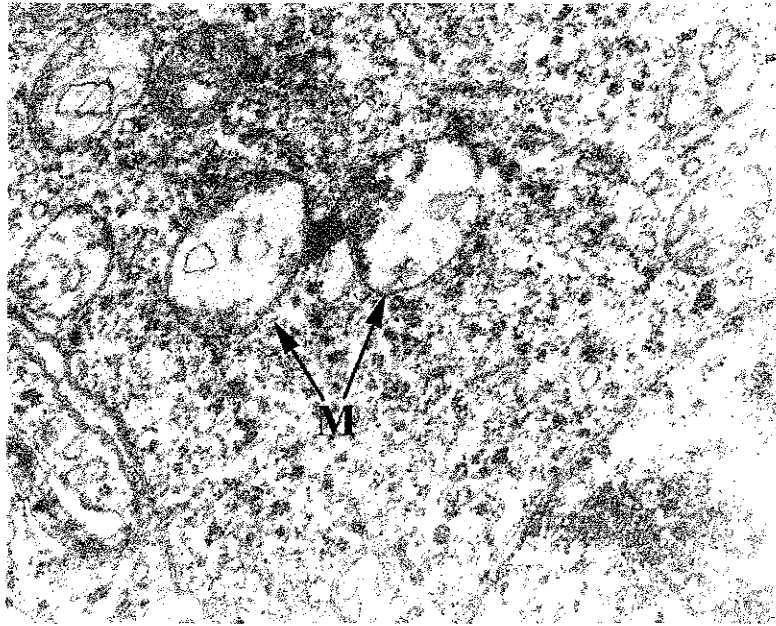


Fig. 22. Micrografía electrónica de un animal expuesto a 2 inhalaciones con acetato de plomo en la que se observan mitocondrias sin crestas (*). La punta de flecha señala una mitocondria normal. 26000 X.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 23. . Micrografía electrónica de una porción del citoplasma de una célula de Sertoli de un ratón expuesto a 2 inhalaciones con cloruro de cadmio en la que se observa la pérdida de crestas en las mitocondrias (M). 26000 X.

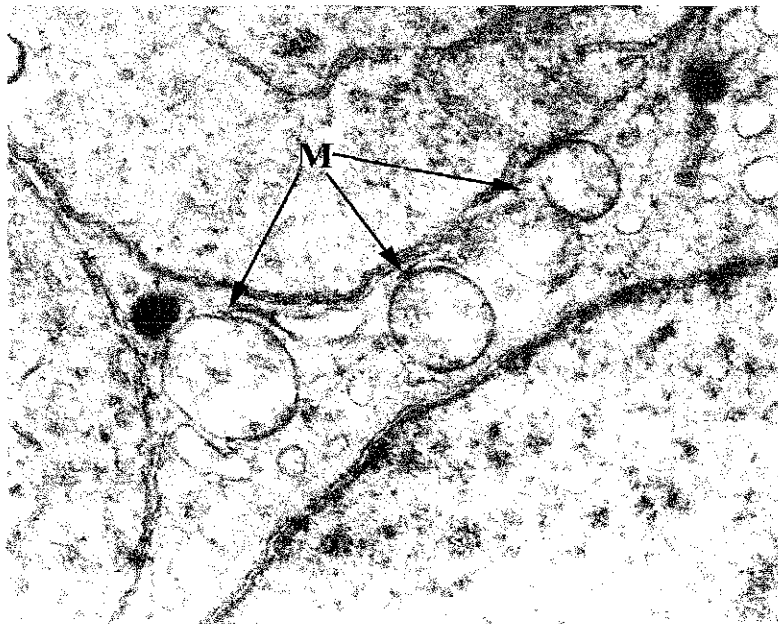


Fig. 24. Micrografía electrónica de mitocondrias que muestran la pérdida de crestas (M) de un ratón expuesto a 2 inhalaciones de acetato de plomo + cloruro de cadmio. Núcleo de una célula de Sertoli. 23000 X.

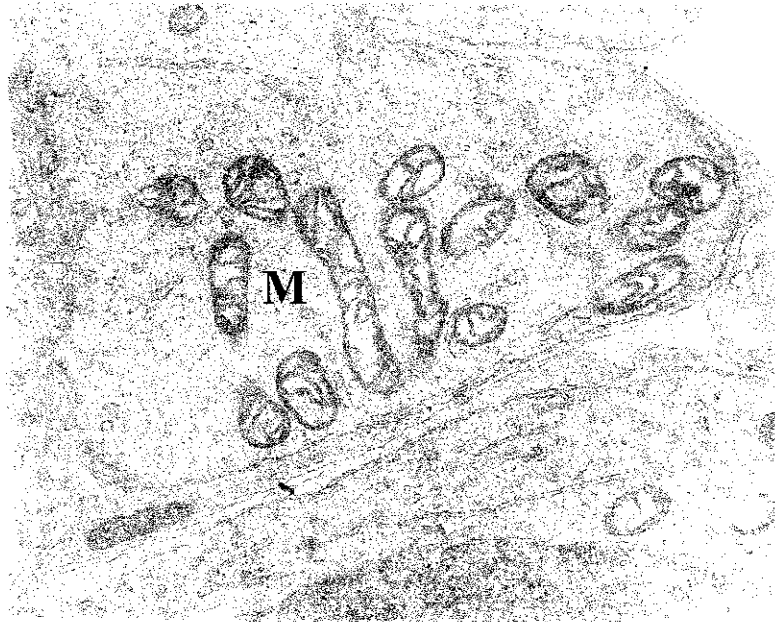


Fig. 25. Micrografía electrónica de mitocondrias (M) de un espermatocito primario donde se observa que tienen forma esférica u ovoide, con crestas curvas y cierto grado de dilatación intercrestal. 18500 X.

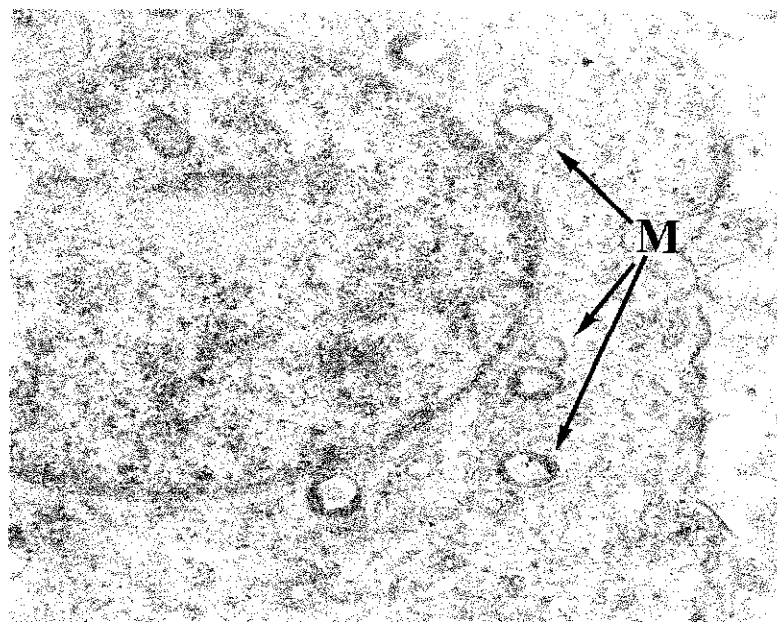


Fig. 26. Micrografía electrónica de mitocondrias (M) de una espermátide temprana, las cuales son esféricas y presentan las crestas hacia la periferia, con gran espacio intercrestal. 18000 X.

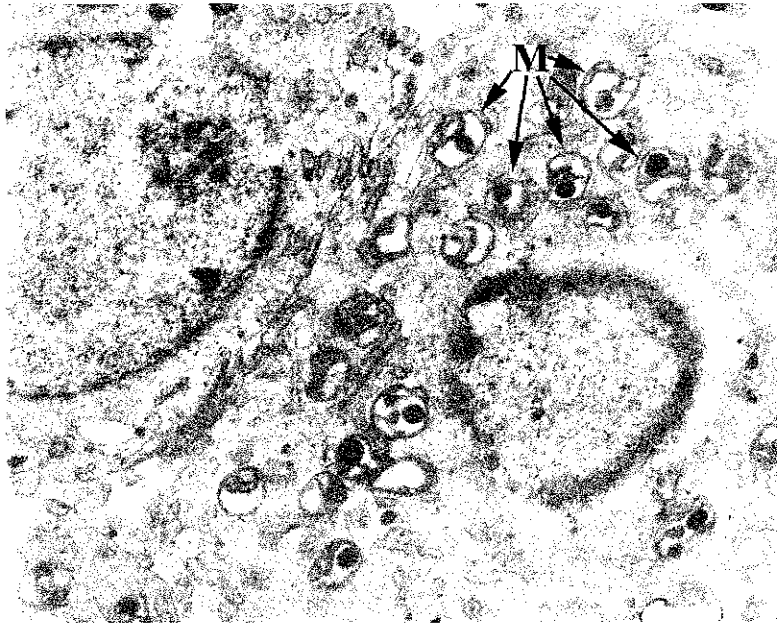


Fig. 27. Micrografía electrónica de una porción del túbulo seminífero de un ratón expuesto a 4 inhalaciones de cloruro de cadmio y acetato de plomo mostrando mitocondrias con crestas electrodensas y deformes (M) de una célula espermatogénica. 18000 X.

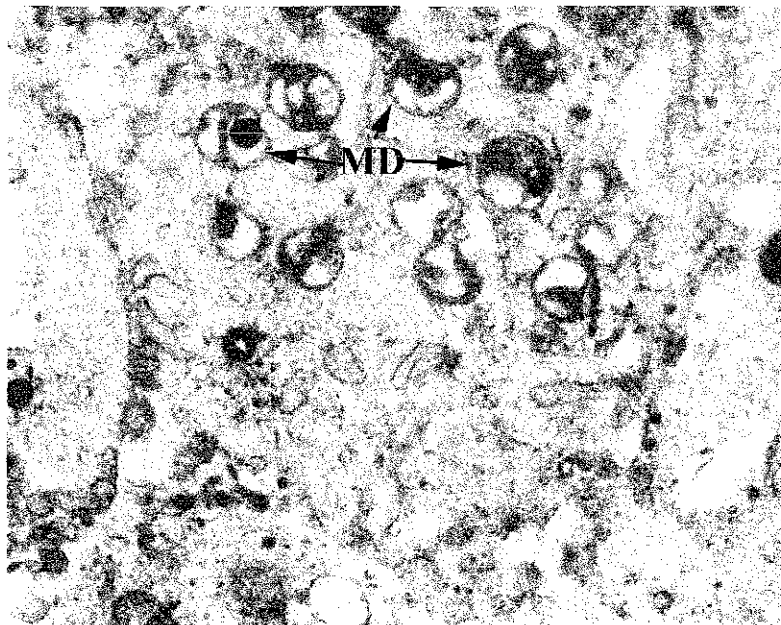


Fig. 28. Micrografía electrónica que muestra mitocondrias de células germinales con crestas electrodensas y deformes (MD) en animales expuestos a 6 inhalaciones de acetato de plomo. 18500 X.

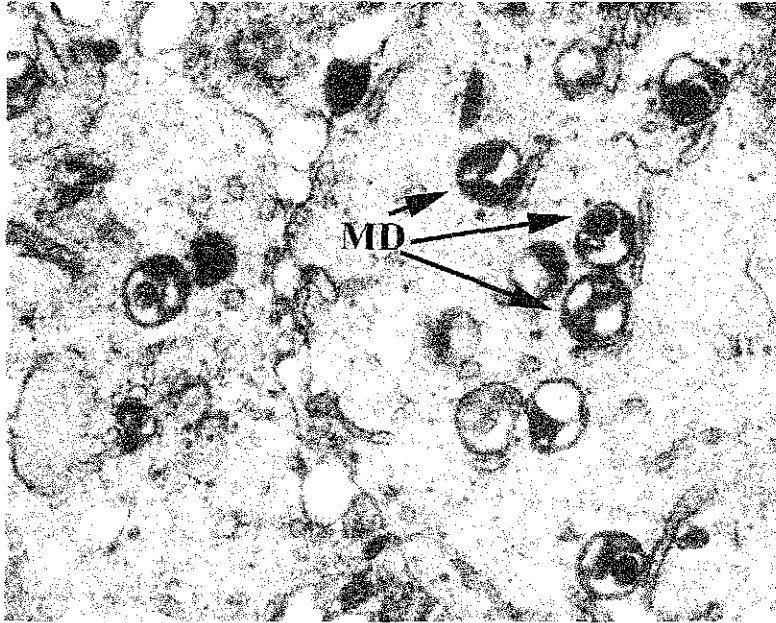


Fig. 29. Micrografía electrónica de un ratón expuesto a 6 inhalaciones de cloruro de cadmio en el que al igual que las figuras 28 y 29, se observan mitocondrias con crestas electrodensas y deformes (MD). 18500 X.

DISCUSION

Las alteraciones en las células de Sertoli y células espermatogénicas encontradas en el presente estudio fueron similares a las referidas en animales de laboratorio expuestos a cadmio y plomo administradas por vía oral o parenteral. En nuestro estudio, las células de Sertoli fueron el tipo celular dentro del túbulo seminífero más sensible a la exposición por inhalación de cloruro de cadmio y acetato de plomo. Estos resultados son comparables con otros estudios en los cuales las células de Sertoli fueron el blanco de la toxicidad aunque la vía de exposición fue diferente (Adhikari 2000).

Una de las primeras indicaciones de cambio morfológico fue la formación de vacuolas en las células de Sertoli de los animales expuestos a cadmio y plomo. Este tipo de lesión se encuentra en ratas expuestas a plomo (Murthy y col., 1991, 1995) y cadmio (Hochadel y Waalkes , 1997). Se observó un aumento gradual en la severidad de la vacuolización proporcional al número de inhalaciones. La diferencia en la severidad del daño pudo ser debida a la duración de la exposición. Además de la vacuolización del citoplasma de las células de Sertoli, Murthy y col. (1995), encontraron que en ratas tratadas con 5 mg/kg de acetato de plomo intraperitoneal, había una aparente fragmentación del núcleo, así como la alteración en las espermátidas, observando en ellas abultamientos del contenido nuclear y de la envoltura nuclear y la dilatación del acrosoma. En el presente estudio se encontró que en los ratones expuestos a la inhalación de acetato de plomo (0.001 M) hay vacuolización de las células de Sertoli y espermátidas que presentan deformación nuclear.

Por otra parte otros autores no encuentran daño estructural sobre las células de Sertoli y las células espermatogénicas de animales expuestos a plomo. Thoreux-Manlay, y col. (1995), después de la administración de acetato de plomo (8mg/kg) en forma crónica (35 días) en ratas observan que las células germinales y las células de Sertoli no parecen dañadas, además de que observaron una espermatogénesis normal, excepto por pocos espermatozoides y terminan sugiriendo la posibilidad de que la falla en la liberación de los espermatozoides sea indicio del efecto del plomo sobre la producción de alguna de las numerosas proteínas producidas por las células de Sertoli.

Singh y col. (1993) encuentran que la exposición crónica de plomo administrado por vía oral en monos ocasiona degeneración del citoplasma de las células de Sertoli, esta alteración es similar a la encontrada en este estudio; aunque, la vía de administración y el modelo de exposición fueron diferentes.

La pérdida en la continuidad entre las membranas plasmáticas de las células de los animales expuestos a cadmio puede ser explicada en función a que este metal desorganiza y fragmenta los haces de microfilamentos asociados a las uniones ocluyentes de las células de Sertoli; de este modo altera la espermiación en ratas inyectadas IP con diferentes dosis de cloruro de cadmio (0.5 o 1 mg/kg) aplicada una sola vez (Hew y col. 1993). Está descrito que la administración de cloruro de cadmio en monocapas de células de Sertoli inmaduras compromete el mantenimiento de las uniones ocluyentes y se sugiere que el efecto del cadmio en la barrera hematotesticular precede a los cambios funcionales en la microvasculatura testicular (Janecki, 1992). También hay que recordar que el cadmio daña las uniones ocluyentes dependientes de E-cadherina y que en testículo se ha detectado la presencia de moléculas de la familia de las cadherinas, por lo que no se puede descartar la posibilidad de un mecanismo de acción similar del cadmio sobre la E-cadherina de las células epiteliales pudiese ocurrir en el túbulo seminífero (Prozialeck, 2000).

La observación de espermátides tardías con núcleos deformes y de estructuras similares a cuerpos residuales conteniendo detritus celulares en las células de Sertoli es posible que sean el resultado de células atrofiadas que son fagocitadas por las células de Sertoli. La presencia de espermátides deformes indica que estos metales inducen lesiones en la célula de Sertoli que afectan significativamente su función. Existen trabajos que han mostrado la capacidad de estos metales para dañar el funcionamiento de las células de Sertoli (Shen y Sangiah , 1995 Thoreux-Manlay y col. 1995).

Las células germinales presentaron daño en la últimas exposiciones en comparación con las células de Sertoli. Este efecto podría ser debido a la protección brindada por la célula de Sertoli puesto que una de sus funciones es actuar de barrera contra cualquier agente que pudiera causar daño a las células. Entonces, si las células de Sertoli están dañadas, no realizan adecuadamente sus funciones y podrían permitir el paso de estos metales o bien, no elaboran las suficientes sustancias que permiten el adecuado desarrollo de los gametos.

En estudios con animales, el plomo ocasiona en una relación dosis-respuesta, supresión de los niveles séricos de testosterona y de la espermatogénesis; por estos resultados Sokol y col. (1994) sugieren que el mecanismo primario de acción tóxica del plomo parece ser la alteración en el control pituitario de la secreción de hormonas y por consiguiente de la espermatogénesis. Existiría entonces la posibilidad de que también la célula de Leydig sufra daño morfológico por la inhalación de los metales utilizados en este experimento y sería interesante realizar un estudio para determinar si esta célula presenta alteraciones ultraestructurales.

Está bien documentado que la administración de cadmio y plomo ocasionan daño en las mitocondrias de las células de Sertoli (Caflish, 1994; Shing y col, 1993), aunque cabe resaltar que en el presente estudio se utilizó otra vía, la inhalada.

Las alteraciones mitocondriales observadas incluyeron la pérdida de crestas en el caso de las célula de Sertoli y la presencia de crestas electrodensas y deformes en las células espermatogénicas. Estos hallazgos se describen también por la administración oral de cadmio en ratas (Caflish, 1994). En la exposición por plomo en monos se observan mitocondrias anormales, las cuales adoptan formas de C-, O- o U (Shing y col, 1993).

Por otra parte el análisis estadístico sobre el daño mitocondrial ocasionado por los metales utilizados en este estudio indica que el daño está en relación directa con el número de exposiciones y el tipo de compuesto.

Con respecto a la combinación de acetato de plomo y cloruro de cadmio, los resultados indican un posible efecto sinérgico, puesto que el daño mitocondrial fue mayor utilizando la combinación que la exposición por separado. Además, por los resultados obtenidos, es posible pensar que la exposición aguda de acetato de plomo o cloruro de cadmio no ocasionan daño en las mitocondrias estadísticamente significativo, es en las exposiciones subcrónicas que estos metales producen daño mitocondrial. En cambio, la utilización de acetato de plomo y cloruro de cadmio simultáneamente inducen daño desde la primera exposición.

El daño mitocondrial en las células de Sertoli por estos metales pudiera ser explicado de varias maneras. Un mecanismo podría ser la habilidad que tiene estos metales para unirse a ácidos grasos como fosfatidilcolina en el caso del plomo y fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina en el caso del cadmio (Valle y Ulmer, 1972); estos ácidos grasos se encuentran en abundancia en las membranas celulares.

Así mismo, está comprobado que el cadmio y el plomo interactúan con una amplia variedad de enzimas, incluyendo las enzimas implicadas en los procesos oxidativos mitocondriales (Aoki y Hoffer, 1978; Chung y Maines, 1987; Corey y Galvao, 1989; Vallee y Ulmer, 1972).

El plomo y el cadmio están relacionados con la inducción de estrés oxidativo puesto que alteran la función de las enzimas que evitan el daño ocasionado por los radicales libres. Aoki y Hoffer (1978) muestran que el cadmio inhibe la actividad de enzimas testiculares como la glutatión peroxidasa y la glutatión disulfuro reductasa; por su parte el plomo inhibe a la superóxido dismutasa y a la catalasa en testículo. La inactivación puede ser debida a la interacción de estos metales con otros metales presentes en las enzimas (cobre, zinc o manganeso) o por la afinidad que tienen hacia grupos sulfidriilo (Nigam y col., 1999, Oteiza y

col, 1999; Patra y col., 1999; Yiin y col., 1999). Esto nos lleva a pensar que debido a la inactivación de estas enzimas se generen peróxidos lipídicos en la membrana de la mitocondria y se presente el daño observado.

Otro punto importante es la competencia que tienen sobre elementos esenciales, uno muy importante es el calcio, el cual está presente en la mitocondria en forma de cristales de fosfato de calcio (Vallee y Ulmer 1972). El plomo también compite con este ión en los sitios de unión en la ATPasa y en el transporte a través de los canales de calcio (Simoms, 1986), este mecanismo permite la eficiente internalización de plomo a la célula y a la mitocondria.

El proceso reproductivo es muy complejo, y hay pocos estudios que se refieren a la acción de contaminantes atmosféricos en el sistema reproductor. Por este motivo se necesitan más estudios con este enfoque.

En el caso del daño en el túbulo seminífero ocasionado por la inhalación de plomo y el cadmio, es conveniente realizar experimentos donde se evalué el efecto de estos metales sobre otros tipos celulares presentes en testículo, como la célula de Leydig, y sobre otros organitos al igual que sobre el endotelio, sitio en el que ya se han descrito cambios utilizando otras vías de exposición.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se encontró que la inhalación de acetato de plomo (0.001M) y cloruro de cadmio (0.006M) ocasionaron cambios ultraestructurales en las células de Sertoli de ratones macho CD-1 tales como vacuolización, degeneración del citoplasma y pérdida de crestas mitocondriales, presencia de estructuras similares a cuerpos residuales y pérdida de contacto entre las membranas celulares. Así como también en las células espermatogénicas se detectó la presencia de mitocondrias con crestas electrodensas y deformes, células con cromatina condensada y espermátides tardías con núcleo deforme.

Por lo anteriormente expuesto se puede considerar que la magnitud del daño ultraestructural fue dependiente de la duración de la exposición y del metal utilizado

Ahora bien, las exposiciones subcrónicas produjeron mayor daño mitocondrial en las células de Sertoli que las exposiciones agudas con la utilización de acetato de plomo o cloruro de cadmio y las exposiciones con la combinación de acetato de plomo y cloruro de cadmio ocasionaron daño mitocondrial en éstas células desde la exposición aguda.

En cuanto al número de inhalaciones, a mayor exposición, mayor daño mitocondrial. Así mismo se observó que el cloruro de cadmio ocasionó alteraciones mitocondriales más severas que el acetato de plomo, mientras que la combinación de los metales fue mas agresiva.

Finalmente los resultados sugieren que el acetato de plomo y el cloruro de cadmio tienen un efecto sinérgico en el daño a las células de Sertoli.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adhikari N, Sinha N y Saxena DK (2000). Effect of lead on Sertoli-germ cell coculture of rat. *Toxicol. Letters* **116**: 45-49
- Aoki A y Hoffer AP (1978). Reexamination of the lesions in rat testis caused by cadmium. *Biol. Reprod.* **18**: 579-591.
- Batra N, Nehru B y Bansal MP (1998). The effect of zinc supplementation on the effects of lead on the rat testis. *Reprod. Toxicol.* **12**: 535-540.
- Caflisch C.R. (1994) Effect of orally administered cadmium on *in situ* pH, PCO₂, and bicarbonate concentration in rat testis and epididymis. *J Toxicol Environ Health* **42**: 323-330.
- Chávez E, Jay D y Bravo C (1987). The mechanism of lead-induced mitochondrial Ca²⁺ efflux. *J. Bioenergetics and Biomembranes* **19**:285-295.
- Chung A y Maines MD (1987). Differential effect of cadmium on GSH-peroxidase activity in the Leydig and the Sertoli cells of rat testis. *Biochem. Pharmacol.* **36**: 1367-1372.
- Corey OG y Galvao L (1989). Plomo. Serie Vigilancia 8. *Centro Panamericano de Ecología Humana y salud*. OMS.
- Courot M, Hochereau-de Reviers M y Ortavant R (1970). Spermatogenesis. In: Johnson A, Gomes w and Vandemark N Eds. *The Testis. Volume I. Development, anatomy and physiology*. Academic Press. New York.
- Elinder C, Kjellström T, Linnman L, Lind B, Piscator M. y Sundstedt K. (1983) Cadmium exposure from smoking cigarettes: variations with time and country where purchased. *Environ. Res.* **32**: 220-7.
- EPA (1984). Environmental progress and challenges: an EPA perspective. Office at Management Systems and evaluation (PM-222). Washington DC. pp 22-24.
- Espinosa A. (1989) Influencia de ocho elementos químicos en la respuesta inmunitaria. Tesis de Licenciatura. Fac. de Química. UNAM. México. 105-133 p.
- Fernández I, Escobedo J, Hernández D, Tudón H, Ramírez J, Benítez M, Zárate A y Madrazo M. (1997) Consumo de tabaco en la población derechohabiente del Instituto Mexicano del Seguro Social. *Salud Pública de México* **39**: 125-132.
- Fleisher LN, Yorio T y Bentley PJ (1975). Effect of cadmium on epithelial membranes. *Toxico. Appl. Pharmacol* **33**:384-387.

- Flickinger C y Fawcett DW (1956). The junctional specializations of Sertoli cells in the seminiferous epithelium. *Anat. Rec.* 158: 207-222.
- Foote RH (1999). Cadmium affect testes and semen of rabbits exposed before and after puberty. *Reprod. Toxicol.* 13: 269-277.
- Fortoul I. y Saldívar L. (1996) Metals in lung tissue from autopsy cases in México City residents. Comparison between cases from the 1950's and the 1980's. *Environ. Health Perspectives* 104:630-632.
- Fourtoul I, Saldívar L, Moncada S y Salgado R. (1997) Plomo y sus efectos en la Salud. En Gutiérrez, Romleu, Corey y Fortoul (eds):Contaminación del aire; riesgos para la salud.Ed. Manual Moderno. p 452.
- Friberg L, Piscator M, Nordberg, G y Kjellström, T. (1974) Cadmium in de environment, 2nd ed., Cleveland, Ohio, CRC Press, 284 pp.
- López, I.; Sánchez, I.; Saldívar, L. y Fortoul, T. (1997) Cadmio y sus efectos en la salud. En Gutiérrez, Romleu, Corey y Fortoul (eds.): Contaminación del aire; riesgos para la salud. Ed. Manual Moderno. p 452.
- Gardner PJ (1964) Fine structure of seminiferous tubule of the Swis mouse. The spermatid. *Anat. Rec.* 155: 235-250.
- Gardner PJ y Holyoke EA. (1964). Fine structure of seminiferous tubule of the Swiss mouse. I. The limiting membrane, Sertoli cell, spermatogonia, and spermatocytes. *Anat. Rec.* 150: 391-404.
- Gardner L y Hiatt J. (1997). Histología Texto y Atlas. McGraw-Hill. Interamericana. 506.pp.
- Geneser F. (1988). Histología. Panamericana, México, 740 pp.
- Goyer R (1991). Toxic effects of metals. In: Amdur MO, Doull J and Klaassen J (eds.): Casarret and Doull's Publishers, Toxicology the Basic Science of Poison Toxicology. Pergamon Press. USA. 1033 pp.
- L-Ashmawy I y Youssef SA (1999). The antagonistic effect of chorpromazine on cadmium toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 161: 34-39.
- Hew K, Health G, Jiwa A y Welsh M. (1993) Cadmium in vivo causes disruption of thigh junction-associated microfilaments in rat Sertoli cells. *Biol. Reprod.* 49: 840-849.
- Hildebrand DC, Der R, Griffin W y Fahim MS (1973). Effect of lead acetate on reproduction. *Am. J. Obstret. Gynecol.* 115: 1058-1065

- Hochadel J y Waalkes M. (1997). Sequence of exposure to cadmium and arsenic determines the extent of toxic effects in male Fischer rats. *Toxicology* **116**: 89-98.
- Hsu PC, Liu M, Hsu C, Chen L y Leon Guo Y (1997). Lead exposure causes generation of reactive oxygen species and functional impairment in rat sperm. *Toxicology* **122**: 133-143.
- INEGI (1999). Estadísticas del medio ambiente del Distrito Federal y Zona Metropolitana.
- Janecki A, Jakubowiak A y Steinberger (1992). Effect of cadmium chloride on transepithelial electrical resistance os Sertoli cell monolayers in two-compartment cultures- A new model for toxicological investigations of the "Blood- Testis" barrier *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **112**: 51-57.
- Kipling M.D. y Waterhouse J. (1967) Cadmium and prostatic carcinoma. *Lancet* **1**:730-731.
- Koizumi T y Waalkes (1989). Effects of zinc on the distribution and toxicity of cadmium in isolated interstitial cells of the rat testis. *Toxicology* **56**: 137-146.
- Koizumi T, Li ZG y Tatsumoto H (1992). DNA damaging activity of cadmium in Leydig cells, a target cell population for cadmium carcinogenesis in the rat testis. *Toxicol. Letters* **63**: 211-220.
- Koizumi T, Yokota T, Shirakura H, Tatsumoto H y Suzuki K (1994). Potential mechanism of cadmium-induced cytotoxicity in rat hepatocytes: inhibitory action of cadmium on mitochondrial respiratory activity. *Toxicology* **92**: 115-125.
- Lablack A, Bourdon V, Defamie N, Batias C, Mesnil M, Fenichel P, Points M y Segretain D (1998). Ultrastructural and biochemical evidence of gap junction and connexin 43 expression in a clonal Sertoli cell line: a potential model in the study of junctional complex formation. *Cell Tissue Res* **294**: 279-287.
- Lamb J, Gulati D, Choudhury H, Chambers R y Poonacha K. (1997). Lead acetate trihydrate. *Env. Health Persp.* **105**:317-318
- Lancranjan I, Papescu H, Garanescu O, Klepsch I y Serbanesco M. (1975) Reproductive ability of workmen occupationally exposed to lead. *Arch. Environ. Health.* **30**: 396-401
- Lesson T, Lesson C, y Paparo A (1990). Texto/Atlas Histología. Interamericana, México, 741 pp.
- López I. (1994). Alteraciones alveolares secundarias a la inhalación aguda de

- diferentes dosis de cloruro de cadmio (0.006 M y 0.012 M) en ratón. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- López I, Sánchez I, Saldívar L y Fortoul T. (1997) Cadmio y sus efectos en la salud. En Gutiérrez, Romleu, Corey y Fortoul (eds.): Contaminación del aire; riesgos para la salud. Ed. Manual Moderno. p 452.
 - Lucas J. (1975) Our polluted food a survey of the risks. The General Publishing Company Limited. Toronto, Canada. pp. 156-165.
 - Meinhardt A, McFarlane JR, Seitz J y Kretser DM (2000). Activin maintains the condensed type of mitochondria in germ cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **168**: 111-117.
 - Moorman WJ, Skaggs SR, Clark JC; Turner TW, Sharpnack DD, Murrell JA, Simon SD, Chapin RE y Schrader SM (1998). Male reproductive effects of lead, including species extrapolation for the rabbit model. *Reprod. Toxicol.* **12**: 333-346.
 - Mruk DD y Cheng CY. (2000). *In vitro* regulation of extracellular superoxide dismutase in Sertoli cell. *Life Sci.* **67**: 133-145.
 - Murthy R, Saxena D, Gupta S y Chandra S. (1991) Lead induced ultrastructural changes in the testis of rats. *Exp. Pathol.* **42**:95-100.
 - Murthy RC, Shrawan KG y Saxena DK (1995). Nuclear alterations during acrosomal cap formation in spermatids of lead-treated rats. *Reprod. Toxicol.* **9**:483-489.
 - Nigam D, Shukla GS y Agarwal AK (1999). Glutathione depletion and oxidative damage in mitochondria following exposure to cadmium in rat liver and kidney. *Toxicol. Lett.* **106**: 151-157.
 - Oakberg E (1956). A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am. J. Anat.* **99**:391-413.
 - OMS Organización Mundial de la Salud (1978). Riesgos del ambiente urbano para la salud. Contaminantes ambientales seleccionados. Panamá, pp. 159-171, 256-260 y 329.
 - Ono H, Funakoshi T, Shimada H y Kojima S (1997). Comparative effects of disulfiram and diethyldithiocarbamate against testicular toxicity in rats caused by acute exposure to cadmium. *J. Toxicol. Environ. Health.* **50**:389-399.
 - OPS Organización Panamericana de la Salud (1979). Manual de la calidad del aire en el medio urbano. Publicación científica no. 401. México pp. 37-43.

- Oteiza PI, Adonaylo VN and Keen CL (1999). Cadmium-induced testes oxidative damage in rats can be influenced by dietary zinc intake. *Toxicology* **137**: 13-22.
- Patra RC, Swaruo D y Senapati SK (1999). Effects of cadmium on lipid peroxides and superoxide dismutase in hepatic, renal and testicular tissue of rats. *Vet. Human. Toxicol.* **41**:65-67.
- Pineau C, Dupaix A y Jégou B (1999). The co-culture of Sertoli cells and germ cells: Applications in Toxicology. *Toxicol. In Vitro* **13**: 513-520.
- Prozialeck WC (2000). Evidence that E-Cadherin may be a target for cadmium toxicity in epithelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **164**: 231-249.
- Rhomberg W, Schomoll HJ y Schneider B. (1995). High frequency of metalworkers among patients with seminomatous tumors of the testis: A case-control study. *Am. J. Industrial Medicine* **28**: 79-87.
- Ronis M, Gandy J y Badger T (1998). Endocrine mechanism underlying reproductive toxicity in the developing rat chronically exposed to dietary lead. *J. Toxicol. Environ. Health, Part A* **54**:77-99.
- Saldívar L, Luna M, Reyes E, Soto R, y Fortoul T (1991). Cadmium determination in Mexican-produced tobacco. *Environ. Res.* **55**:91-96.
- Sánchez I (1994) Cloruro de cadmio inhalado y daño bronquiolar. Estudio experimental agudo con diferentes dosis en ratón. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Saygy S, Deniz G, Kutsal O y Vural N. (1991). Chronic effects of cadmium on kidney, liver, testis and fertility of male rats. *Biol. Trace Element Res.* **31**: 209-214.
- Simoms T (1986). Cellular interactions between lead and calcium. *Br. Med. Bull.* **42**: 431-434.
- Simoms T (1993). Lead-calcium interactions in cellular lead toxicity. *Neurotoxicology* **14**:77-86.
- Setchell BP y Waites GMH (1970). Changes in the permeability capillaires and of the "Blood-testis barrier" after injection of cadmium chloride in the rat. *J. Endocrinol.* **47**:81-86.
- Simpkins CO, H-Liao Z, Gebrehiwot R, Tyndall JA, Torrence CA, Fonong T, Balderman S, Mensah E y Sokolove P (1996). Opposite effects of metallothionein I and spermine on mitochondrial function. *Life Sci.* **58**: 2091-2099.

- Singh A, Cullen C, Dykerman A, Rice D y Foster W. (1993) Chronic lead exposure induced ultrastructural alterations in the monkey testis. *J. Submicrosc. Cytol. Phatol.* **25**: 479-485.
- Sokol RZ (1987). Hormonal effects of lead acetate in the male rat: Mechanism of action. *Biol. Reprod.* **37**: 1135-1138.
- Stoker SH y Seager SL (1981). Química ambiental, Contaminación del aire y del agua. Ed. Blume, 1a. impresión . Barcelona, España. pp. 119-124.
- Sugawara N y Sugawara C. (1984) *J. Appl. Biochem.* **6**: 199.
- Thomas JA (1991). Toxic response of the reproductive system. In Amdur, M.; Doull, J. y Klaassen, C. (eds.): Casarret and Doull's Publishers, Toxicology the Basic Science of Poison. Pergamon Press. USA. 1033 pp.
- Thoreux-Manlay A, Le Goascogne C, Segretain D, Jegou B y Pinon-Lataillade G. (1995) Lead affects steroidogenesis in rat Leydig cells in vivo and in vitro. *Toxicology* **103**: 53-62.
- Todd A, Wetmur J, Moline J, Godbold J, Zevin S y Landrigan P. (1996) Unraveling the chronic toxicity of lead: An essential priority for environmental health. *Environ. Health Persp.* **104**: 141-146.
- Underwood EJ (1977). Trace Elements in Human Nutrition. 4a. ed. Academic Press.
- Valverde M. (1997). Efectos genotóxicos por la inhalación de plomo y cadmio en ratón. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México.
- Valle BL y Ulmer DD (1972). Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. *Annu. Rev. Biochem.* **41**: 91-128.
- Villalon A. y Monclus A. (1974). La contaminación ambiental, causa y valoración. Ed. Jims, Barcelona, España.
- Waalkes M, Rehm S y Devor D. (1997) The effects of continuous testosterone exposure on spontaneous and cadmium-induced tumors in the male Fischer (F244/NCr) rat: loss of testicular response. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **142**:40-46.
- Xu C, Johnson J, Singh P, Jones M, Yan H y Carter C. (1996) *In vivo* studies of cadmium-induced apoptosis in testicular tissue of the rat and its modulation by a chelating agent. *Toxicology* **107**:1-8.
- Yiin SJ, Chern CL, Sheu JY y Lin TH (1999). Cadmium induced peroxidation in rat testes and protection by selenium. *Biometals* **12**: 353-359.