



1674  
42

# Universidad Nacional Autónoma de México

## MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL

**Efecto protector del zinc en el tejido intersticial del  
testículo de ratas (*rattus norvegicus*) Fischer tratadas  
con CdCl<sub>2</sub> como agente cancerígeno.**

T E S I S

Para obtener el grado de: **Maestro en Ciencias**

**Presenta:**

**Octavio Villanueva Sánchez**

**Tutor académico:**

**Rafael Hernández González**

**Comité Tutorial:**

**Antonio Díaz Cruz**

**Patricio Santillán Doherty**

México, D.F.

2003.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**TESIS  
CON  
FALLA DE  
ORIGEN**

# PAGINACIÓN DISCONTINUA

---

## Dedicatorias.

Doy gracias a Dios, por darme la fuerza para aceptar lo que no puedo cambiar, el valor para cambiar lo que puedo y la sabiduría para saber la diferencia.

A la memoria de mi madre, que gracias a su ejemplo como ser humano integro y el amor a su familia ha sido una luz brillante en mi vida.

A mi padre, que con su disciplina y constancia sigue siendo el ejemplo en cada meta que me propongo.

A mi hermana Leticia y a mis hermanos José, Fernando y Humberto por ser un ejemplo como hermanos y seres humanos.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional

NOMBRE: Carlos V. Sánchez

Sánchez

FECHA: 4 de Febrero del 2003

FIRMA: [Firma]

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **Agradecimientos.**

Al Dr. Rafael Hernández González por su invaluable ayuda, apoyo y asesoramiento para que la realización de este trabajo fuese posible.

A la M. en C. Rosa María Vigueras Villaseñor, por su amistad y su participación para la realización y desarrollo de las técnicas histológicas de este trabajo de tesis en el Instituto Nacional de Pediatría. Asimismo agradezco al Técnico Pedro Medina Granados del mismo Instituto por su valiosa ayuda para la realización de este trabajo.

Al M. en C. Mario Cárdenas León y al Biólogo Roberto Chavira Ramírez por su valiosa ayuda, asesoramiento y colaboración para la realización en el procesamiento de las técnicas para las determinaciones de hormonas en este estudio.

Al Dr. Eduardo Murphy Stack por su valiosa colaboración en el diagnóstico patológico en este estudio y al Dr. Antonio Villa por su asesoramiento y ayuda en el análisis estadístico de este trabajo.

A mi comité tutorial, les agradezco su paciencia y voluntad para que este trabajo pudiera llevarse a cabo, muchas gracias.

A mis sinodales: Dra. Elizabeth Morales Salinas, M. en C. Mario Cárdenas León, Dr. Antonio Díaz Cruz, Dr. Patricio Santillán Doherty y Dr. Rafael Hernández González, por su valiosa ayuda en la revisión y corrección de este trabajo.

Un sincero agradecimiento al personal del Departamento de Investigación Experimental y Bioterio del INCMNSZ. Agradecimiento especial al Sr. Eleazar Camerino López Salazar quien dio un especial cuidado a las ratas que fueron utilizadas en el trabajo de tesis.

A mis alumnos de servicio social: Mariana Larios Fernández y Ruy Guerra, por su valiosa ayuda y apoyo para la realización de este trabajo.

Agradecimiento especial al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, cuya beca otorgada (No. de registro 129561) hizo posible estudiar la maestría en ciencias de la producción y de la salud animal.

# INDICE GENERAL

	<b>Páginas</b>
<b>DEDICATORIAS</b>	i
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	ii
<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	2
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	3
1.1. Carcinogénesis	3
1.2. Sustancias potencialmente carcinogénicas	5
1.3. Estudios de carcinogénesis en animales.	5
1.4. El cadmio y su utilización como agente carcinogénico	6
1.5. El zinc y su papel en la prevención del daño producido por el cadmio	7
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b>	8
<b>III. HIPÓTESIS</b>	8
3.1. Hipótesis alterna	8
3.2. Hipótesis nula	8
<b>IV. OBJETIVO</b>	8
4.1. Objetivo general	8
4.2. Objetivos específicos	9

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

111

<b>V. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE MUESTRA</b>	<b>9</b>
5.1. Método: Ecuaciones Matemáticas	9
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>10</b>
6.1. Formación de grupos	11
6.2. Criterios de exclusión	11
6.3. Preparación de sustancias	12
6.4. Método de eutanasia	12
6.5. Técnicas de preservación e histología	12
6.6. Técnica para determinar la densidad numérica de células de Leydig	12
6.7. Prueba para la determinación de testosterona	13
6.8. Prueba para la determinación de la hormona luteinizante	13
6.9. Análisis de los datos	14
<b>VII. RESULTADOS</b>	<b>14</b>
7.1. Comparación entre grupos	23
7.2. Sobrevida	26
7.3. Hallazgos a la microscopía óptica	32
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	<b>39</b>
<b>IX. CONCLUSIÓN</b>	<b>42</b>
<b>X. LITERATURA CITADA</b>	<b>43</b>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## LISTA DE GRÁFICAS

	Páginas
<b>Gráfica 7.1. Número de Células de Leydig en Testículo derecho versus Testículo izquierdo por grupo</b>	16
<b>Gráfica 7.2. Peso del Testículo derecho e izquierdo por grupo</b>	17
<b>Gráfica 7.3. Niveles de Testosterona Basal versus Final por grupo</b>	18
<b>Gráfica 7.4. Niveles de LH Basal Versus Final por grupo</b>	19
<b>Gráfica 7.5. Peso Corporal Inicial y Final por grupo</b>	20

## LISTA DE TABLAS.

	Páginas
<b>Tabla 7.1. Relación del peso testicular promedio y densidad numérica de las células de Leydig con sus respectivas desviaciones estándar</b>	21
<b>Tabla 7.2. Niveles basales y finales de Testosterona y LH con sus respectivas desviaciones estándar</b>	21
<b>Tabla 7.1.1. Comparación de variables entre los cuatro grupos. Prueba de Wilcoxon</b>	22
<b>Tabla 7.1.2. Comparación de variables. Prueba Mann Whitney (dos colas) Grupo 1 (Cadmio) versus Grupo 2 (Cadmio-Zinc)</b>	22
<b>Tabla 7.1.3. Comparación de variables. Prueba Mann Whitney (dos colas) Grupo 1 (Cadmio) versus Grupo 3 (Zinc)</b>	23
<b>Tabla 7.1.4. Comparación de variables. Prueba Mann Whitney (dos colas) Grupo 1 (Cadmio) versus Grupo 4 (Testigo)</b>	23
<b>Tabla 7.1.5. Comparación de variables. Prueba Mann Whitney (dos colas) Grupo 2 (Cadmio-Zinc) versus Grupo 3 (Zinc)</b>	24

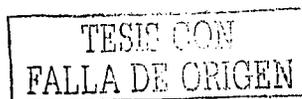
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

✓

<b>Tabla 7.1.6. Comparación de variables. Prueba Mann Whitney (dos colas) Grupo 2 (Cadmio-Zinc) versus Grupo 4 (Testigo)</b>	<b>24</b>
<b>Tabla 7.1.7. Comparación de variables. Prueba Mann Whitney (dos colas) Grupo 3 (Zinc) versus Grupo 4 (Testigo)</b>	<b>25</b>
<b>Tabla 7.1.8. Comparación de variables entre todos los grupos. Prueba Kruskal Wallis</b>	<b>25</b>
<b>Tabla 7.2.1. Número de animales fallecidos de los grupos experimentales y el testigo</b>	<b>26</b>
<b>Tabla 7.2.2. Sobrevida de los grupos experimentales y el testigo</b>	<b>27</b>
<b>Tabla 7.2.3. Sobrevida del Grupo 1 (Cadmio)</b>	<b>28</b>
<b>Tabla 7.2.4. Sobrevida del Grupo 2 (Cadmio-Zinc)</b>	<b>29</b>
<b>Tabla 7.2.5. Sobrevida del Grupo 3 (Zinc)</b>	<b>30</b>
<b>Tabla 7.2.6. Sobrevida del Grupo Testigo</b>	<b>31</b>

## LISTA DE FIGURAS.

	<b>Páginas</b>
<b>Figura 7.3.1. Efectos de la acción del cloruro de cadmio en el tejido testicular de rata cepa Fischer (Grupo 1)</b>	<b>32</b>
<b>Figura 7.3.2. Efectos de la acción del cloruro de cadmio (Grupo 1) en el tejido testicular de rata cepa Fischer</b>	<b>33</b>
<b>Figura 7.3.3. Efectos de la acción del cloruro de cadmio y su protección con zinc (Grupo 2) en el tejido testicular de rata cepa Fischer</b>	<b>34</b>
<b>Figura 7.3.4. Efectos de la acción del cloruro de cadmio y su protección con zinc (Grupo 2) en el tejido testicular de rata cepa Fischer</b>	<b>35</b>
<b>Figura 7.3.5. Efecto de la acción del acetato de zinc sobre el tejido Testicular (Grupo 3)</b>	<b>36</b>
<b>Figura 7.3.6. Efecto de la acción del acetato de zinc (Grupo 3) sobre el tejido testicular</b>	<b>37</b>
<b>Figura 7.3.7. A. Génesis normal de las células germinales del tejido testicular de rata cepa Fischer de 14 meses de edad (Grupo Testigo)</b>	<b>38</b>



## Resumen

El papel del zinc y los mecanismos para prevenir la carcinogénesis producida por el cadmio en los testículos de las ratas no ha sido aclarado por completo. En los testículos de los roedores el cadmio produce una severa necrosis acompañada posteriormente por una degeneración crónica. Una dosis de cadmio produce alta incidencia de tumores de células de Leydig. Los mecanismos para evitar la muerte de las células de Leydig no se conocen completamente, sin embargo la retroalimentación de la hipófisis incrementa la producción de la hormona luteinizante (LH) en respuesta a una baja de andrógenos en la circulación, esto último ha sido relacionado con lesiones proliferativas y degenerativas testiculares. De tal manera, que en el presente trabajo fue estudiado el papel del zinc para prevenir la toxicidad de cadmio en las células de Leydig de rata cepa Fischer. A dos grupos (n = 22) con ratas de 6 meses de edad se les administró por vía subcutánea (sc) 20  $\mu$ mol de CdCl<sub>2</sub> / Kg de peso semanalmente durante 4 semanas ( dosis total de 100  $\mu$ mol de CdCl<sub>2</sub> /Kg. de peso ). A los animales de uno de estos grupos se les administró vía sc 1 mmol de acetato de zinc / Kg. de peso cada semana durante 4 semanas (dosis total de 5 mmol de acetato de zinc /Kg. de peso). A un tercer grupo se les administró vía sc 1 mmol de acetato de zinc / Kg. de peso semanalmente, también durante 4 semanas. Al último y cuarto grupo ( testigo) se les administró solución salina (0.9%) vía sc también por cuatro semanas. Ocho meses más tarde fueron sacrificados las ratas de todos los grupos, antes de que aparecieran de acuerdo a la bibliografía las primeras neoplasias espontáneas. Los resultados indicaron que el número de células de Leydig destruidas fue mayor ( $p \leq 0.05$ ) en el grupo que recibió cadmio (92.66%) que en el grupo de cadmio-zinc (79.15%), en el grupo testigo (8.8%) y éstos comparados con el grupo que sólo recibió zinc, si bien no existió diferencia significativa entre éstos dos últimos grupos. El nivel de LH en suero fue más alto ( $p \leq 0.05$ ) en el grupo cadmio ( 43.3 ng/ml ) en comparación con el grupo cadmio-zinc ( 33.58 ng/ml ), grupo zinc ( 21.86 ng/ml ) y el grupo testigo ( 16.46 ng/ml ). El nivel de testosterona circulante fue más bajo ( $p \leq 0.05$ ) en el grupo zinc ( 0.32 ng/ml ) en comparación con el grupo cadmio-zinc ( 0.37 ng/ml ), grupo testigo ( 0.60 ng/ml ) y grupo cadmio (1.54 ng/ml ). Se concluye que el acetato de zinc evitó la muerte de células de Leydig por acción del cadmio, lo que permitió que las células sobrevivientes produjeran un nivel similar al normal de testosterona evitando el incremento en la producción de LH y el posible desarrollo de neoplasias.

**Palabras Clave:** Células de Leydig, Cadmio, Zinc, Hormona Luteinizante, Testosterona.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Abstract

The role of the zinc to investigate mechanisms to prevent cadmium carcinogenesis in the rat testis is not clearly of all. In the rodent testes, cadmium induces severe necrosis followed by chronic degeneration. A single dose produces high incidence of Leydig cells tumors. The mechanism to avoid the death of Leydig cells is unknown, but pituitary feedback increased luteinizing hormone (LH) production due to low circulating androgen, has been implicated in causation of proliferative lesions within degenerate, hypofunction testes. Thus, the role of the zinc to prevent the toxicity of cadmium in Leydig cells in Fischer rats was studied. 44 rats were used. 2 Groups of 6 months-old rats were given either 20  $\mu\text{mol CdCl}_2/\text{Kg. sc}$ , weekly for the next 4 weeks (total dose 100  $\mu\text{mol/Kg}$ ), one of the group were given either 1 mmol of Zinc Acetate sc, weekly for 4 weeks too (total dose 5 mmol/Kg.). The third group were given either 1 mmol of Zinc Acetate sc, weekly for five weeks. The last group was given saline solution sc. for 4 weeks too. All the animals were killed 8 months later before arise of spontaneous lesions as indicated the reports. The number of Leydig cells killed was higher ( $p \leq 0.05$ ) in cadmium group (92.66%) than in cadmium-zinc group (79.15%), control group (8.8%) in relation with the zinc group. The LH level was higher ( $p \leq 0.05$ ) in cadmium group (43.3 ng/ml) than in cadmium-zinc group (33.58), zinc group (21.86) and the control group (16.46). The testosterone level was lower ( $p \leq 0.05$ ) in cadmium-zinc group (0.37 ng/ml) than zinc group (0.32), control group (0.60) and cadmium group (1.54ng/ml). The acetate zinc minimizes that cadmium killed Leydig cells and as a consequence to avoid an increase of the testosterone level when zinc is present.

**Key Words:** Leydig cells, cadmium, zinc, luteinizing hormone, testosterone hormone

## INTRODUCCIÓN.

El cáncer es después de las enfermedades cardiovasculares, la segunda causa de muerte en las comunidades en donde la desnutrición, malnutrición y enfermedades infecciosas no son los mayores problemas. En el Reino Unido tan sólo el cáncer fue el culpable del fallecimiento de aproximadamente diez mil personas en los últimos años (1).

### 1.1. Carcinogénesis.

El cáncer ha sido estudiado gracias a la carcinogénesis inducida por sustancias químicas, la cual ha sido investigada extensivamente mediante la aplicación de conocidos cancerígenos sobre la piel de ratones y en pruebas de transformación celular *in vitro*. Estos estudios han revelado como se lleva a cabo la carcinogénesis, lo cual implica un proceso de muchos pasos que incluyen dos fases distintas: iniciación y terminación. El efecto de la carcinogénesis en el ADN de una célula se basa principalmente en no transformar por completo la célula, sin embargo de cierta manera la modifica así como a su progenie, la cual será irreversiblemente susceptible al mismo o diferentes químicos. A las sustancias químicas responsables de estos eventos se les conoce como iniciadores y promotores en la génesis de ciertas neoplasias. Es interesante mencionar que para que exista la transformación neoplásica se requiere que la exposición a un agente inicial deba ser precedida a la exposición de un promotor. De otra manera, si la administración de un agente cancerígeno se realiza aisladamente, entonces la neoplasia no ocurrirá. Sin menospreciar la iniciación, la cual ocurre rápidamente y a veces después de una simple exposición a la sustancia electrofílica altamente reactiva, la promoción generalmente requiere de múltiples exposiciones ya sea de la misma o diferente sustancia química a dosis críticas por un período de semanas o meses. Los promotores no son compuestos electrofílicos y por tanto no alteran el ADN celular. Ellos actúan interfiriendo con los caminos de la transducción de los signos normales que controlan la diferenciación y proliferación celular (2).

Existe una opinión general de que la carcinogénesis producida por sustancias químicas involucra la alteración genética de las células somáticas con la activación de oncogenes o bien la inactivación de genes supresores del cáncer. De esta manera los carcinógenos son definidos como sustancias químicas que causan ya sea directamente o indirectamente alteraciones genéticas en células específicas. El término carcinógeno genotóxico indica una sustancia química capaz de producir cáncer directamente alterando el material genético de las células blanco. Por otro lado el término carcinógeno no tóxico, representa a la sustancia química capaz de producir cáncer mediante un mecanismo secundario no relacionado que cause directamente el daño al gen (3).

Los carcinógenos genotóxicos usualmente requieren la bioactivación de reacciones intermedias antes de que eventualmente puedan producir daño en el ADN celular. Un criterio general para los carcinógenos no genotóxicos no ha sido todavía establecido, debido a los diferentes tipos existentes, así como a la variedad de mecanismos que han sido reportados. Sin embargo, después de una revisión exhaustiva de la literatura a este

respecto, se deduce que los efectos epigenéticos a lo largo del experimento son los que causan la proliferación celular o hiperfunción o hipofunción de la célula que predispone a su transformación neoplásica (3).

Otros autores mencionan que existe una clasificación de carcinógenos químicos (cuadro 1). Por otra parte existen carcinógenos de acción directa, los cuales son metabolizados y reaccionan como metabolitos altamente reactivos (carcinógenos activos indirectamente). Asimismo existen pocos carcinógenos químicos, los cuales son electrófilos y altamente reactivos (químicos que reaccionan con centros de otros compuestos cargados negativamente, incluyendo al ADN). La mayor parte de los carcinógenos son del tipo acción indirecta. Estos compuestos son inertes por sí mismos, pero si son metabolizados por las enzimas de la citocromo P-450 del sistema detoxificador del hígado, entonces generan metabolitos altamente carcinogénicos. Sucede entonces que en estas reacciones de oxido-reducción, los compuestos orgánicos solubles en grasa que tienen una afinidad por la grasa del cuerpo y membranas ricas en lípidos son convertidos en metabolitos solubles en agua que pueden ser acompañados con glucorónidos y ser excretados en la bilis. Algunos de esos metabolitos secundarios, quizás puedan ser altamente electrofilos y causen mutaciones en los protooncogenes celulares, de tal manera que generan que los oncogenes celulares no puedan responder a los signos normales para regular la transcripción del gen. Por lo tanto estos metabolitos de los carcinógenos que actúan indirectamente causan neoplasias de manera similar a otros cancerígenos. (2).

**Cuadro 1. Clasificación de los carcinógenos químicos**

Carcinógenos de Acción Directa	Carcinógenos de Acción Indirecta
<p>Agentes alquilantes:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <math>\beta</math> Propiolactona</li> <li>2. Sulfato Dimetyl</li> <li>3. Diepoxbutano y otros epóxidos</li> <li>4. Metasulfonato etil,</li> <li>5. Gas mostaza,</li> <li>6. Drogas terapéuticas cancerígenas.</li> </ol> <p>Agentes aciclantes:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 1-Acetilimidazole</li> <li>2. Cloruro de Dimetil carbamil</li> </ol>	<p>Aminas aromáticas y amidas:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 2- Naftilamina</li> <li>2. Benzidina</li> <li>3. 2-Actilaminofluorene</li> <li>4. Dimetilaminobenzene</li> </ol> <p>Plantas y productos microbianos:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aflatoxina B1</li> <li>2. Griseofulvina</li> <li>3. Safrole</li> </ol> <p>Otras sustancias químicas:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Nitrosaminas y amidas</li> <li>2. Insecticidas y fungicidas.</li> <li>3. Humo de cigarro</li> <li>4. Benzopirene.</li> </ol>

## 1.2. Sustancias potencialmente carcinogénicas.

El interés para el estudio de las sustancias carcinogénicas y su posible daño a la salud del ser humano se concreta en los estudios realizados para determinar las sustancias potencialmente carcinogénicas en el medio ambiente, donde se ha visto que los hidrocarburos policíclicos, el humo del tabaco, las aminas aromáticas y las nitrosaminas son potencialmente peligrosos para la salud ( 1 ). Uno de los cancerígenos en el medio ambiente que más ha llamado la atención es el cadmio. Durante los últimos 100 años los niveles de cadmio en el medio ambiente se han incrementado dramáticamente. Este incremento de contaminación por cadmio se ha reflejado en un marcado incremento (4.7%) del cadmio en el peso corporal de poblaciones humanas en el mismo periodo. La influencia en la salud humana de esta exposición al cadmio es una creciente preocupación, y la posible asociación del cadmio y la carcinogénesis es el mayor componente. Por otra parte se ha visto una alta incidencia de cáncer pulmonar en poblaciones expuestas al cadmio. También se ha demostrado que el cadmio produce cáncer en riñones y próstata (4). La exposición oral al cadmio es una de las formas comunes de presentación en las poblaciones humanas y su efecto cancerígeno por esta ruta tiene implicaciones importantes en riesgo de la salud humana (5).

Teniendo en cuenta la información antes mencionada, en los estudios de carcinogenicidad en animales de laboratorio la variable primaria de interés es el tiempo de aparición del tumor. Sin embargo, muchas veces no es posible saber con cuanta anticipación apareció el tumor en el animal, por lo que se llega a utilizar una medida que es: el tiempo para morir con el tumor. Si el tumor adquiere la capacidad de ser rápidamente letal esto equivale esencialmente al tiempo de morir con la aparición del tumor (5).

Por otro parte en la utilización de un agente cancerígeno es importante determinar los efectos potenciales de esa sustancia. Por lo que deben considerarse los efectos de algunos tóxicos. En el presente estudio en donde se evaluará el tejido intersticial del testículo, es importante mencionar que la toxicidad de un compuesto administrado en un periodo corto de tiempo, no puede en la mayoría de los casos ser detectado microscópicamente. Similarmente, cuando los testículos son examinados para saber si se han recuperado de la agresión del tóxico, existe suficiente tiempo para completar la espermatogénesis seguida por la interrupción del tóxico. Los cambios atróficos atribuidos a pruebas químicas son difíciles de evaluar al final de 2 años de estudios cuando los cambios degenerativos espontáneos y neoplasias de células intersticiales están presentes (6).

## 1.3. Estudios de carcinogénesis en animales.

Con respecto a los modelos animales usados en la carcinogenesis, la rata Fischer ha sido utilizada para estudios de inducción de cáncer, por lo que es importante tomar en cuenta los siguientes estudios. Durante las pasadas dos décadas, en el Instituto Nacional de Cáncer y el Programa Nacional de Toxicología de los Estados Unidos de América se han realizado más de 200 estudios de carcinogenicidad espontánea en ratas macho y hembra Fischer 344. Estos estudios han mostrado que las neoplasias más frecuentemente encontradas en ratas

macho son: tumor de las células intersticiales del testículo (88%). Estos resultados se observaron en animales mayores de 2 años (7). Asimismo se ha visto hasta un 98% de incidencia de tumores espontáneos de células intersticiales en ratas F344/DuCrj de acuerdo a Maekawa y colaboradores (1983) y de 94.7% de tumores espontáneos de células intersticiales en ratas F344 informado por Solleved y colaboradores en 1984 (8). Por otra parte, Maekawa y colaboradores observaron que entre las 53 a 79 semanas de edad hay aparición de al menos 1% de neoplasias espontáneas de células de Leydig, para este fin 296 ratas cepa F344 fueron utilizadas. En relación a esto último, Goodman y colaboradores informaron que en ratas cepa Fischer de 53 a 79 semanas de edad se encontraron 1% de neoplasias de células de Leydig (8).

De acuerdo a lo anterior, la rata es un importante modelo en el estudio de la carcinogénesis, especialmente la cepa Fischer. Se conoce que esta cepa tiene una respuesta similar a otras cepas o líneas con respecto a sustancias químicas tóxicas y carcinógenos potenciales. Por ejemplo cuando fue comparada la toxicidad del tetracloroetileno y el tricloroetileno en ratas Fischer y ocho cepas más se observó que las respuestas fueron similares (7). En relación a la inducción de tumores, Maekawa y colaboradores demostraron que puede inducirse tumor de células de Sertolli en ratas con N-nitrosoureas (9). Otros investigadores han logrado inducir tumores de células de Leydig (hasta un 53% de incidencia) con diferentes dosis y repeticiones de N-Nitrosobis (2 oxopropylamine) (10). En otros estudios realizados por Beth y colaboradores, informaron la reducción en la incidencia y multiplicación de cáncer mamario en ratas con dieta restringida durante 6 meses posteriores a la administración de N-methyl-N-nitrosourea (NMU) (3).

#### **1.4. El cadmio y su utilización como agente carcinogénico.**

Con respecto a la utilización del cadmio, Waalkes y colaboradores lo utilizaron en base a la dosis-respuesta para inducir tumores en próstata en ratas de 10 semanas de edad (4). Por otra parte, Waalkes y colaboradores informaron que el cadmio a dosis única produce una alta incidencia de tumores de células de Leydig. Asimismo después de 10 semanas de haberles inyectado vía sc  $\text{CdCl}_2$  (  $20\mu\text{mol}$  semanalmente por cuatro semanas ) a ratas Fischer, se observó un decremento notable del peso testicular ( 70 % ) con respecto del testigo, esto debido a una marcada degeneración y atrofia testicular ( 4 ). En otro estudio, Waalkes observó en ratas de 10 semanas de edad la producción de neoplasias y lesiones proliferativas en adrenales, riñones, próstata y testículos, cuando a las ratas se les administró en el agua de bebida diferentes dosis de  $\text{CdCl}_2$  (11).

Continuando con la utilización del cadmio. Waalkes y colaboradores utilizaron ratas Fischer de 10 semanas de edad y demostraron que la inducción de tumores por cadmio en células de Leydig es un fenómeno endocrino mediado, y que la ocurrencia de tales tumores depende de la reducción de niveles de testosterona causados por la acción del cadmio al producir la hipofunción testicular, caracterizada por la baja producción de andrógenos. Estos estudios demostraron que como resultado de la acción del cadmio se produce la hipofunción testicular, y que ésta es la responsable de las lesiones testiculares iniciales y consecuentemente la degeneración y atrofia testicular. Sin embargo la degeneración no es la única causa para que ocurra la formación del tumor, ya que existe un incremento en la

estimulación de la hipófisis, y por tanto también un incremento de la hormona luteinizante cuando se detectan niveles circulantes bajos de testosterona, producidos estos niveles por los remanentes de las células de Leydig, las cuales son sobrevivientes de las lesiones iniciales producidas por el cadmio y que forman una parte crítica en el desarrollo del tumor. En este estudio se observó que la inducción de tumor testicular por el cadmio es un evento endocrino mediado y que depende al menos directamente o indirectamente de los niveles circulantes de testosterona. Por lo que la acción del cadmio por sí sólo no es suficiente para la formación del tumor testicular. Además, en este estudio se concluyó que existe evidencia acumulativa de daño genotóxico por el cadmio, ya sea indirectamente a través de la interrupción en la reparación del ADN o bien dañando directamente al ADN de la célula (14).

### **1.5. El zinc y su papel en la prevención del daño producido por el cadmio.**

Si bien existen muchos agentes que pueden producir cáncer, es importante conocer el mecanismo de acción de éstos en su tejido blanco, ya que de esta manera se puedan contar con alternativas que permitan impedir su mecanismo de acción o bien minimizar su efecto. En relación a esto último, en un estudio llevado a cabo por Gunn y colaboradores, se demostró que se puede prevenir el daño ocasionado en testículo por la administración de cadmio al utilizar zinc. Inclusive en contraste con el efecto carcinogénico del cadmio, el zinc difícilmente puede producir tumores sistémicos o locales en concentraciones inclusive 33 veces más grandes que el cadmio (5). El mismo Gunn encontró que el zinc puede ser muy efectivo para evitar la ocurrencia de tumores testiculares producidos por la acción del cadmio, pero no previene la degeneración testicular producida por el cadmio (12). En otro estudio, Waalkes y colaboradores demostraron el efecto protector del zinc en ratas a la que se indujo cáncer testicular mediante cloruro de cadmio. En este estudio se observó que el zinc puede evitar o en su defecto retardar la aparición de cáncer de células de Leydig, sin embargo, el mecanismo molecular que explique este fenómeno se desconoce (13). Si bien es importante conocer el daño que realizan los agentes cancerígenos es también muy importante conocer el como poder evitarlos. De esta manera, en otros estudios se demostró que el zinc previene la toxicidad del cadmio, incluyendo la carcinogenicidad mediante la inducción de la síntesis de una proteína de bajo peso molecular con una gran afinidad por el cadmio, esta proteína se llama metalotioneína, la cual secuestra al cadmio en su forma estable y reduce su toxicidad (13).

De acuerdo a la información proporcionada, el efecto protector del zinc no está aclarado completamente. Asimismo, no existen trabajos que muestren la cantidad de células de Leydig que son afectadas. Por tanto, es necesario dilucidar si el zinc evita que un mayor número de células sean degeneradas por la acción del cadmio o bien exista otra condición que impida que se desencadene el evento endocrino necesario para que se desarrolle o no la neoplasia testicular.

## **II. JUSTIFICACIÓN.**

La obtención de un modelo que permita observar el desarrollo de la degeneración y atrofia testicular inducida por una sustancia potencialmente cancerígena para el hombre como es el cadmio, es una valiosa ayuda en el estudio de cáncer testicular en el ser humano y en los animales. Sin embargo es relevante conocer como evitar o prevenir el daño y como realiza este papel el zinc. Se sabe que los estudios experimentales a corto plazo ayudan a proporcionar información valiosa para interpretar los resultados encontrados en los bioensayos de larga duración y estudios epidemiológicos. Este tipo de información es particularmente importante para conocer las interrogantes cuando se requieren conocer los resultados basados en la dosis-respuesta. El presente trabajo pretende establecer un modelo experimental que permita esclarecer el papel del zinc y su posible efecto protector en las células de Leydig en ratas Fischer tratadas con  $CdCl_2$  como agente cancerígeno.

## **III. HIPÓTESIS.**

### **3.1. HIPÓTESIS ALTERNA.**

El efecto protector del zinc en el testículo de animales tratados con cloruro de cadmio se debe a que una cantidad importante de células de Leydig no son afectadas por la acción del cloruro de cadmio, en consecuencia la población de células de Leydig no afectadas produce los niveles necesarios de testosterona para mantener el mecanismo normal de retroalimentación de la hormona luteinizante sobre las propias células de Leydig, evitándose así, el desequilibrio del eje hipotálamo-hipófisis-testículo.

### **3.2. HIPÓTESIS NULA.**

El efecto protector del zinc en el testículo de animales tratados con cloruro de cadmio es independiente del número de células de Leydig presentes.

## **IV. OBJETIVO.**

### **4.1. OBJETIVO GENERAL.**

Cuantificar el número total de células de Leydig no afectadas de testículos de ratas Fischer tratadas con  $CdCl_2$  y por consiguiente, conocer por medio de estudios histopatológicos si el acetato de zinc tuvo un efecto protector en la población de células de Leydig.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Estos objetivos se realizaron por cada grupo.

1. Cuantificar la población de células de Leydig en testículos de ratas al finalizar el experimento.
2. Relacionar los niveles basales y finales de testosterona y hormona luteinizante en suero con el número de células de Leydig.
3. Relacionar el peso de los testículos con la población de células de Leydig.
4. Correlacionar el peso de los animales con el peso de los testículos.

## V. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE MUESTRA.

En un estudio piloto anterior realizado con ratas macho ( $n=12$ ) de 6 semanas de edad, de la cepa Fischer provenientes de Harlan, Co. (Estados Unidos), a los que se les administró una dosis de  $20 \mu\text{mol}$  de  $\text{CdCl}_2$  (marca Backer) / Kg de peso cada semana durante 4 semanas (dosis total de  $100 \mu\text{mol/Kg}$  de peso de  $\text{CdCl}_2$ ), se demostró que todas las ratas tuvieron degeneración y atrofia testicular a los 8 meses de experimentación. El resultado anterior junto con la literatura consultada permitió calcular el tamaño de muestra requerido mediante el siguiente método.

### 5.1. MÉTODO: ECUACIONES MATEMÁTICAS.

Antes de iniciar el experimento se definen los objetivos que incluyen:

1. Nivel de significación (error tipo I) 5%.
2. Potencia estadística requerida (error tipo II) 90%.
3. Efecto mínimo del tratamiento (diferencia entre la media del grupo control y del grupo experimental).
4. Estimación de la variación prevista (desviación típica).

A partir de esta información (15), es posible calcular el número de animales necesarios en cada grupo de la siguiente forma:

Se supone que se va a especificar un error tipo I del 5% y una potencia del 90% y la magnitud del efecto del tratamiento que se considera de interés. Con una sola dosis de  $\text{CdCl}_2$  ( $20 \mu\text{mol/Kg}$  de peso) durante 4 semanas (dosis total  $100 \mu\text{mol/Kg}$  de peso), el 100% de las ratas presentaron degeneración y atrofia testicular de células de Leydig (Estudio piloto).

Se estimó la variación individual prevista (desviación típica) a partir de datos o experimentos anteriores, además se tomó en cuenta que la cepa Fischer es isogénica y que la variación esperada es mínima para el presente estudio.

Cuando se conoce la desviación típica se utilizan estas pruebas.

Prueba de dos colas:

$$n=2 \left( \frac{(z - z\pi)^2}{(\mu_1 - \mu_2) / \delta)^2} \right)$$

Prueba de una cola:

$$n=2 \left( \frac{(z\alpha - z\pi)^2}{(\mu_1 - \mu_2) / \delta)^2} \right)$$

$\alpha = 0.05$   $z\alpha / 2 = 1.645$   $\pi = 0.9$  y  $(\mu_1 - \mu_2)$  (100% , eficacia del cadmio en estudios piloto)

$\delta = 100\%$  (eficacia del cadmio de producir degeneración y atrofia testicular en estudios previos)

$$n = 2 \left( \frac{(1.645 + 1.282)^2}{(00/100)^2} \right)$$

$$n = 2 ( 2.76 / 1)$$

$$n = 5.52 \text{ (6 redondeo)}$$

Por tanto, el número mínimo de animales por grupo fue de 6 y de 24 animales en total para los cuatro grupos.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS.

Se utilizaron 44 ratas macho cepa Fischer de 6 semanas de edad, provenientes de Harlan, Co (Estados Unidos). Fueron identificadas las ratas mediante un sistema convencional de marcaje en las orejas y fueron distribuidas aleatoriamente para formar 4 grupos con 11 animales cada uno. Las ratas fueron alojadas en proporción de 4 animales por caja de polifitalato-carbonato. Se utilizó alimento 5001 de PMI y material de cama de álamo de la marca Aspen Shaving (marca Northwestern). Los grupos quedaron conformados de la siguiente manera:

## 6.1. FORMACIÓN DE GRUPOS.

Grupo 1 (Cadmio): a cada rata se le administró vía sc (línea media torácica dorsal) 20  $\mu\text{mol}$  de  $\text{CdCl}_2$  (marca Backer) / Kg. de peso cada semana durante 4 semanas (dosis total de 100  $\mu\text{mol}$ /Kg de peso).

Grupo 2 (Cadmio-Zinc): a cada rata se le administró vía sc (línea media torácica dorsal) 20  $\mu\text{mol}$  de  $\text{CdCl}_2$  / Kg. de peso cada semana durante 4 semanas y se le administró simultáneamente vía sc (área lumbosacra media) 1 mmol de acetato de zinc ( marca Técnica Química) / Kg. de peso cada semana durante 4 semanas también (dosis total de 5 mmol/Kg de peso).

Grupo 3 (Zinc): a cada rata se le administró vía sc (área lumbosacra media) 1 mmol de acetato de zinc / Kg. de peso cada semana durante 4 semanas (dosis total de 5 mmol/Kg de peso).

Grupo 4 (Testigo): a cada rata se le administró vía sc (línea media torácica dorsal) un volumen similar a los grupos 1, 2 y 3 de solución salina (0.9%) cada semana durante 4 semanas.

Los animales al inicio del experimento y semanalmente fueron pesados hasta la conclusión del estudio. Asimismo, diariamente se observó su estado de salud, considerando para esto su conducta, inspección física y palpación general durante el estudio. La duración del estudio se basó en literatura consultada y en un proyecto piloto que se realizó en el bioterio del INCMNSZ, lo cual determinó la duración de 8 meses a partir de la primera administración del cloruro de cadmio. A cada animal antes de iniciar y al finalizar el experimento, se le tomó una muestra de sangre del seno infraorbitario (1.5 ml.), esto con el fin de determinar los niveles de testosterona y hormona luteinizante. Todos los animales que intervinieron en el experimento tuvieron libre acceso al consumo de alimento y agua. Las ratas fueron mantenidas en un cuarto del bioterio del INCMNSZ, con un rango de temperatura controlada (20 a 22 grados centígrados) y una humedad relativa de 50 a 60%. Asimismo el ciclo luz-obscuridad fue de 12:12 horas. Los animales fueron mantenidos de acuerdo a la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud de los E.U.A. y a los lineamientos del Comité Etico existente en el INCMNSZ.

## 6.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

Para justificar el sacrificio de un animal, durante su inspección física y palpación se tomó en cuenta el siguiente criterio: la existencia de ulceración o edema en piel (línea media torácica dorsal y área lumbosacra media), con una extensión mayor de 3 cm de diámetro, concomitante a una pérdida de peso de 50 g con base a su peso promedio alcanzado. Asimismo, se tomó en cuenta el aspecto físico, pelaje, conducta y consumo de agua y alimento. Este criterio estuvo basado a un estudio piloto previo. En su caso, la eutanasia fue realizada utilizando una cámara saturada con  $\text{CO}_2$ , y entonces se procedió a realizar la necropsia para obtener el órgano de interés.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **6.3. PREPARACIÓN DE SUSTANCIAS.**

Las preparaciones del cloruro de cadmio y acetato de zinc se llevaron a cabo utilizando solución salina (0.9%). Para este fin se homogeneizaron los solutos utilizando agitadores magnéticos y una platina. Todo el material a excepción de los solutos fue esterilizado en una autoclave y se realizó el pesaje de los solutos y su agregación al solvente en una campana de flujo laminar clase tipo II.

### **6.4. MÉTODO DE EUTANASIA.**

Al finalizar el experimento tanto los animales de los grupos experimentales como del grupo testigo fueron sacrificados en una cámara saturada con CO<sub>2</sub>. Se obtuvieron los testículos de cada animal, se pesaron, preservaron y procesaron para la realización de estudios histopatológicos.

### **6.5. TÉCNICAS DE PRESERVACIÓN E HISTOLOGÍA.**

Los testículos fueron perfundidos a través de la vena espermática con una solución de cacodilatos y formalina (10%) y fueron preservados en formalina amortiguada a pH neutro con cacodilatos. Previo a la inmersión en el fijador, la túnica albugínea fue abierta para permitir una mayor penetración del fijador. Los testículos fueron cortados y procesados para su inclusión en parafina y en araldita para su posterior corte y tinción. El grosor de los cortes fue 5 µm para la tinción con hematoxilina y eosina, y de 1 µm para la de azul de toluidina. A cada testículo se le hizo un corte paralelo medio sagital a lo largo del axis del testículo. El corte paralelo se hizo a lo largo de los vasos espermáticos prominentes en la túnica albugínea de un lado e incluyendo los sitios de unión del epididimo del otro lado. La sección montada y teñida con hematoxilina y eosina incluyó secciones longitudinales y cruzadas de túbulos seminíferos, túbulos rectos y la red intratesticular. Para este fin se realizaron tres cortes transversales a cada testículo tomando una parte anterior, media y posterior lo cual permitió abarcar una mayor parte del tejido (16).

### **6.6. TÉCNICA PARA DETERMINAR LA DENSIDAD NUMÉRICA DE CÉLULAS DE LEYDIG.**

La densidad del volumen de las células de Leydig (células por cm<sup>3</sup> de testículo) fue determinada por los métodos de conteo por puntos de Weibel, 1969 y de Weibel y Bolander, 1973. Estos métodos consisten en utilizar las secciones de 1µm de espesor teñidas con azul de toluidina. Se utilizó un ocular Zeiss de 81 puntos para el conteo de éstos en cuatro diferentes áreas del testículo (izquierdo superior y esquinas derechas e izquierdo inferior y esquinas derechas). Las densidades de los volúmenes fueron obtenidas con un ocular de 10X y un objetivo de 40X contando los puntos donde había células de Leydig y dividiendo el total de puntos de todo el testículo. La densidad numérica de las células de

Leydig (número de células por  $\text{cm}^3$ ) fue obtenida de acuerdo a la ecuación de Floderus (Weibel, 1969; Weibel y Bolander, 1973):  $N_v = N_a / (D+T-2h)$ , donde  $N_v$  es la densidad numérica,  $N_a$  es el número de núcleos de células contenidos por unidad de área,  $D$  es el diámetro promedio del núcleo de células de Leydig,  $T$  es el espesor del corte o sección y  $h$  es la altura es la sección más pequeña reconocible del núcleo de las células (la última estimación es 0.1 X el diámetro del núcleo). Para determinar el promedio del diámetro del núcleo de las células de Leydig, los axis cortos y largos de los centros ópticos de aproximadamente 100 núcleos por grupo, fueron medidos con un micrómetro ocular. El volumen promedio de células de Leydig por testículo fue obtenido dividiendo la densidad del volumen de las células de Leydig por la densidad numérica. El número de células de Leydig por testículo fue obtenido multiplicando la densidad numérica de las mismas células por el peso de los testículos (17).

### **6.7. PRUEBA PARA LA DETERMINACIÓN DE TESTOSTERONA.**

Esta prueba esta indicada para la medición cuantitativa de testosterona, utilizando para este fin el analizador IMMULITE. El principio de esta prueba esta basado en un inmunoensayo competitivo, de tal manera que los anticuerpos especificos de testosterona, que se encuentran en las paredes de un tubo de polipropileno, compiten con la muestra de testosterona en los sitios de los anticuerpos mencionados. Posteriormente el tubo es decantado, para separar la hormona libre de la unida y entonces es llevada la muestra a un contador gamma. La cantidad de testosterona es determinada mediante una curva de calibración. La sensibilidad analítica de esta prueba es de 4ng/dl (0.14 nmol/L)

\* Immulite Total Testosterone. DPC. Diagnostic Products Corporation. Los Angeles, CA 90045-5597.

### **6.8. PRUEBA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA HORMONA LUTEINIZANTE.**

La concentración de LH se midió por radioinmunoanálisis (RIA) de doble anticuerpo. El principio de esta prueba se basa en los siguientes pasos:

Todos los reactivos son adicionados en tubos RIA a temperatura ambiente en la siguiente secuencia: a) sustancia buffer, b) standard frío, c) NIDDK-rLH-I-9 radio-iodinado y d) antisuero diluido desde 1:70, tal y como al final, la dilución del tubo es de 1:750,000 o mayor. Los reactivos son incubados a temperatura ambiente por 24 horas, antes de adicionar el segundo anticuerpo.

Los resultados se expresaron en términos del estándar de referencia internacional LH-RP-3. Los coeficientes de variación intra e interanálisis fueron de 8.6 y 13.4 respectivamente y la sensibilidad de 0.5 mg/ml.

\* New, sensitive rat luteinizing hormone radioimmunoassay (rLH RIA). Elaborado por el Dr. A.F. Parlow, director del centro de antisuero & Hormonas de la pituitaria, Harbor-UCLA, Medical Center

## 6.9. ANÁLISIS DE LOS DATOS.

Los datos obtenidos de los pesos corporales de los animales, niveles de testosterona y hormona luteinizante, peso de ambos testículos y número de células de Leydig por testículo de cada grupo fueron examinados mediante la prueba de Wilcoxon. Así también, la correlación del peso corporal y testicular fue incluida como variable en este estudio. Para la comparación entre un grupo con otro de las variables mencionadas fue utilizada la prueba de Mann Whitney, y para la comparación de las variables entre todos los grupos simultáneamente se utilizó la prueba de Kruskal Wallis. La sobrevida fue examinada por el método de Kaplan-Mayer. Una  $p \leq 0.05$  se consideró estadísticamente significativa.

## VII. RESULTADOS.

No existieron diferencias significativas entre el número de células de Leydig de los testículos derecho e izquierdo para cada grupo. En la gráfica 7.1, se muestran los resultados tanto en testículo derecho como en el izquierdo para el número de células de Leydig. En relación al testículo derecho, el grupo 1 (Cadmio) de ratas que recibió sólo cadmio tuvo una población de células de Leydig menor ( $0.10 \times 10^9 \text{ cm}^3$ ), comparado ( $p \leq 0.05$ ) con los otros grupos 2 (Cadmio-Zinc)  $0.25 \times 10^9 \text{ cm}^3$ , 3 (Zinc)  $1.27 \times 10^9 \text{ cm}^3$  y el testigo ( $1.20 \times 10^9 \text{ cm}^3$ ). Los resultados del testículo izquierdo fueron similares, el grupo 1 tuvo una población menor de células de Leydig ( $0.09 \times 10^9 \text{ cm}^3$ ) comparado ( $p \leq 0.05$ ) que el grupo 2 ( $0.28 \times 10^9 \text{ cm}^3$ ), 3 ( $1.32 \times 10^9 \text{ cm}^3$ ) y testigo ( $1.16 \times 10^9 \text{ cm}^3$ ). En la tabla número 7.1 se muestra la relación existente entre los grupos con base al peso testicular promedio y densidad numérica de éstas con sus respectivas desviaciones estándar.

En cuanto al peso testicular, no existieron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los testículos derecho e izquierdo para cada grupo. El peso promedio de los testículos derecho e izquierdo puede apreciarse tanto en la gráfica número 7.2 como en la tabla 7.1. Los pesos promedios en ambos testículos fueron menores en el grupo 1 (Cadmio) en comparación ( $p \leq 0.05$ ) a los otros grupos ( $0.7 \pm 0.09$  /  $0.72 \pm 0.08$  versus  $0.95 \pm 0.095$  /  $0.92 \pm 0.1$ ,  $1.45 \pm 0.32$  /  $1.47 \pm 0.39$  y  $1.6 \pm 0.1$  /  $1.6 \pm 0.08$  gramos respectivamente para los grupos 2, 3 y 4.

Los valores de los niveles de testosterona basal y final de los grupos se observan en la gráfica 7.3 y tabla 7.2. En el grupo número 1 (Cadmio) se observa un mayor nivel basal de 2.07 en comparación ( $p \leq 0.5$ ) con el grupo 2 (0.79 ng/ml). Sin embargo no existió diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre el grupo 1 con los grupos 3 (Zinc) y 4 (1.58 y 1.95 ng / ml respectivamente). Con respecto a los valores finales de testosterona, éstos mostraron un nivel mayor para el grupo 1 (1.54) en comparación ( $p \leq 0.05$ ) con los otros grupos (0.37, 0.32 y 0.60 ng/ml) respectivamente para los grupos 2 (Cadmio-Zinc), 3 (Zinc) y 4 (Testigo).

En relación a los niveles de LH basal y final de los grupos, pueden observarse en la gráfica 7.4. y en la tabla 7.2. El grupo número 1 (Cadmio) tuvo de inicio valores basales menores ( $p \leq 0.05$ ) a los otros grupos (2.69 versus 6.6, 4.17 y 5.45 ng / ml respectivamente para los grupos 2, 3 y 4). Sin embargo el valor final de LH del grupo fue mayor ( $p \leq 0.05$ ) que los otros grupos (43.3 versus 33.58, 21.86 y 16.46 ng/ml respectivamente para los grupos 2, 3 y 4).

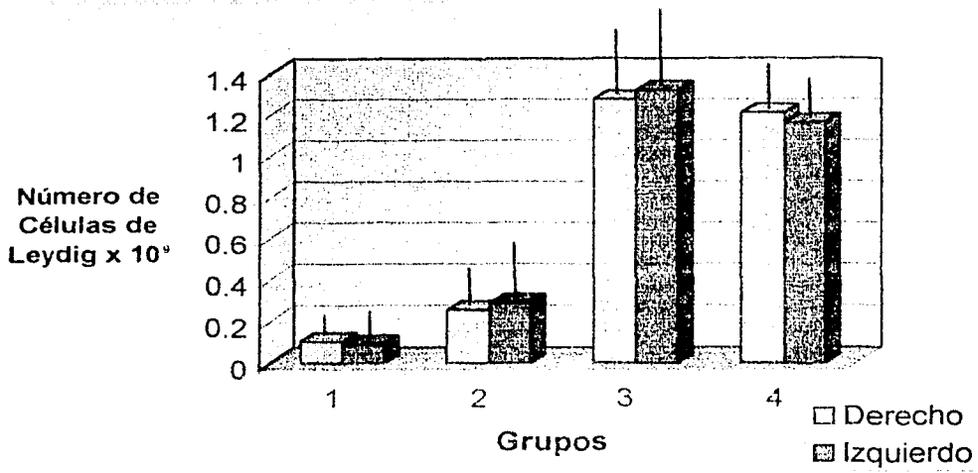
El peso promedio de los grupos al inicio y al finalizar el experimento puede observarse en la gráfica 7.5. En el peso inicial promedio no existieron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los grupos 1 y 3, 2 y 4 y 3 y 4, ( $343.36 \pm 23.88$ ,  $358.41 \pm 17.3$ ,  $367.9 \pm 14.98$  y  $331 \pm 28.94$  gramos para los grupos 1, 2 3 y 4 respectivamente). Asimismo, tampoco existieron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en el peso promedio final ( $397.66 \pm 25.16$ ,  $337.33 \pm 23.01$ ,  $424.83 \pm 24.21$  y  $399.27 \pm 34.62$  gramos respectivamente para los grupos 1, 2, 3 y 4).

Para un mayor entendimiento de los resultados obtenidos de la comparación entre los grupos, se tienen los análisis de datos de las tablas 7.1.1. a la 7.1.8..

En cuanto a la relación del peso de los animales y su peso testicular, se demostró que las ratas del grupo 1 (Cadmio) tuvieron un menor peso testicular ( $p \leq 0.05$ ) en relación a su peso corporal (porcentaje) tanto en el testículo derecho como en el izquierdo (0.178, 0.1832; 0.22, 0.23; 0.33, 0.34 y 0.4, 0.4 gramos respectivamente para los grupos 1, 2 3 y 4).

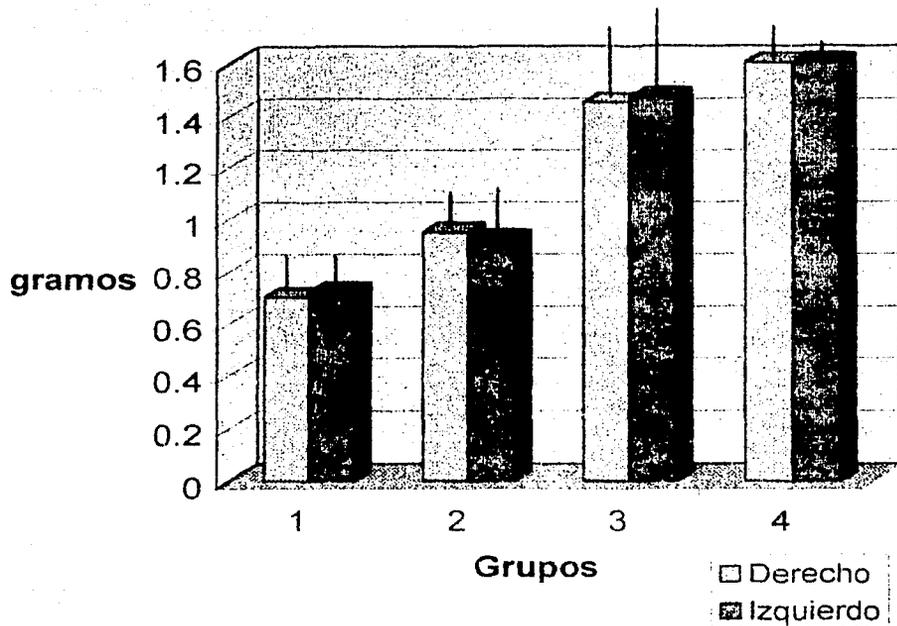
En relación a los hallazgos histológicos en los testículos se obtuvieron los siguientes resultados: en lo que corresponde al grupo 1 (Cadmio), se observó en las figuras 7.3.1 y 7.3.2, los túbulos seminíferos prácticamente sin células, con fibroblastos circundando las áreas extensas de necrosis en los lugares previamente ocupados por células de Sertoli y células germinales. Asimismo se observaron pocas células germinales tales como espermatoцитos primarios y espermatoгонias. En las figuras 7.3.3 y 7.3.4 que corresponden al grupo 2 (Cadmio-Zinc), los daños ocasionados por el cadmio fueron menores, observándose una menor pérdida de células de Leydig, si bien también existieron diversas áreas de destrucción en los túbulos seminíferos, observándose un mayor número de células germinales y de Sertoli intactas en comparación a lo observado en las figuras 7.3.1 y 7.3.2 que corresponden al grupo 1 (Cadmio). En las figuras 7.3.5 y 7.3.6 que corresponden a las ratas tratadas con zinc (Grupo 3) no se observaron daños a las células de Leydig. Asimismo no se observó destrucción o daño a los túbulos seminíferos, por tanto las células germinales y de Sertoli se conservaron intactas. Por último en la figura 7.3.7 que corresponde al grupo testigo, se observó una génesis normal tanto de células de Leydig como de células germinales.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



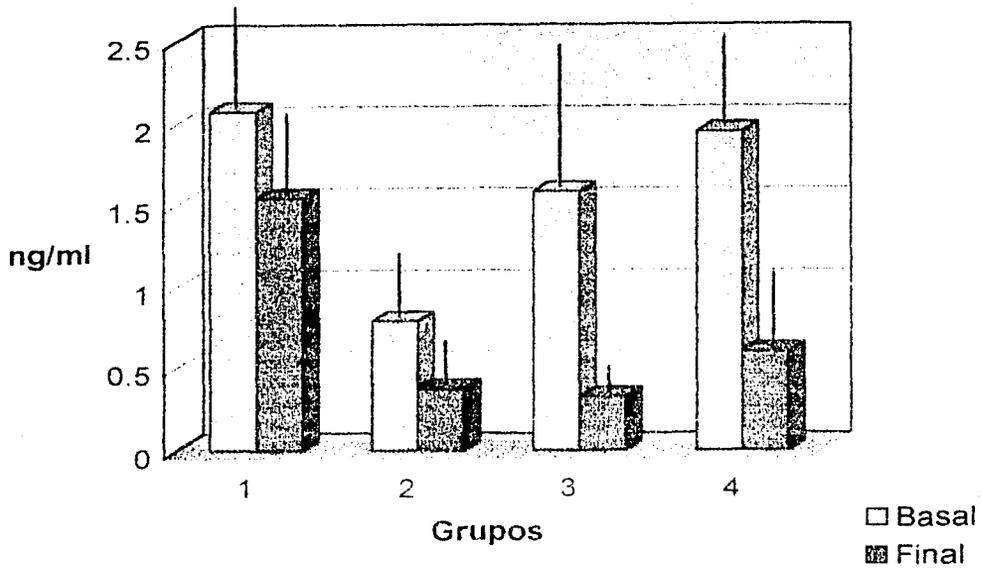
Gráfica 7.1. Número de Células de Leydig en Testículo derecho versus Testículo izquierdo por grupo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



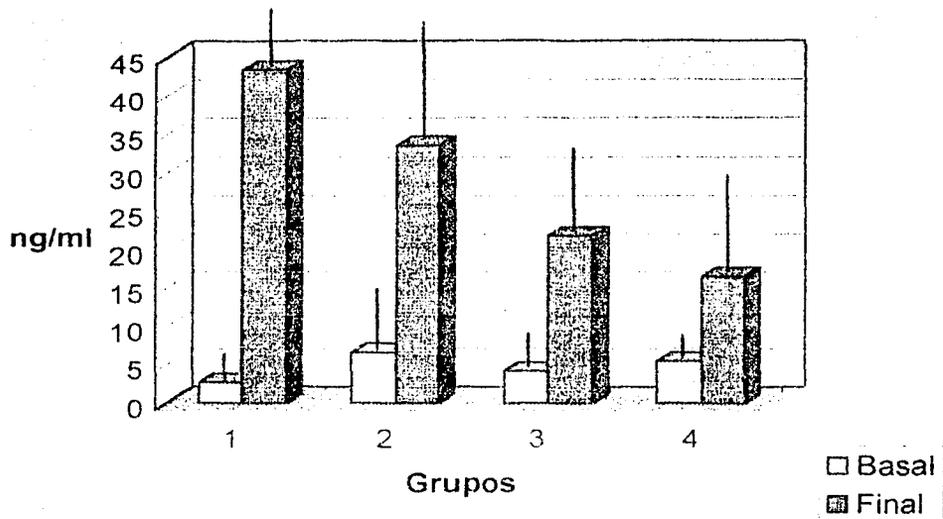
Gráfica 7.2. Peso del Testiculo derecho e izquierdo por grupo.

TESTICULO  
FALLA DE ORIGEN



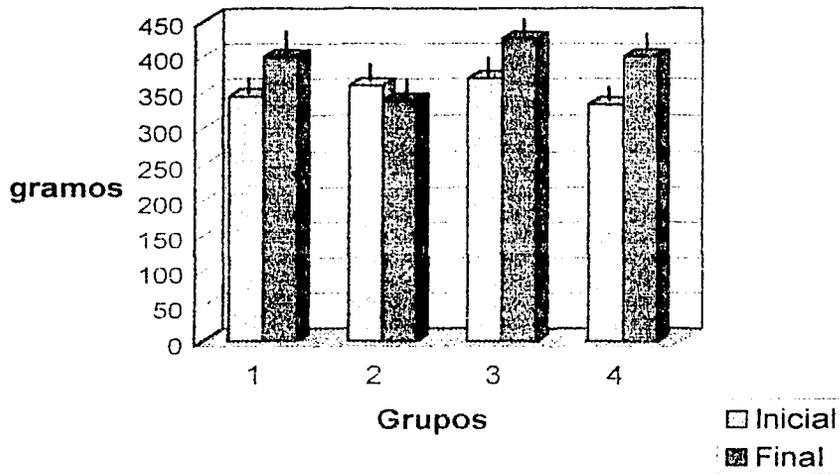
Gráfica 7.3. Niveles de Testosterona Basal versus Final por grupo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Gráfica 7.4. Niveles de LH Basal Versus Final por grupo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Gráfica 7.5. Peso Corporal Inicial y Final por grupo.

**Tabla 7.1. Relación del peso testicular promedio y densidad numérica de las células de Leydig con sus respectivas desviaciones estándar.**

Grupo	Peso Testicular (gramos)	Densidad Numérica ( $\times 10^9 \text{ cm}^3$ )
1 Cadmio	$0.73 \pm 0.01$	$0.095 \pm 0.00$
2 Cadmio-Zinc	$0.939 \pm 0.019$	$0.27 \pm 0.01$
3. Zinc	$1.4614 \pm 0.011$	$1.295 \pm 0.02$
4. Testigo	$1.605 \pm 0.0033$	$1.18 \pm 0.02$

En la tabla número 1 se observa que existe relación proporcional entre el número de células de Leydig y el peso testicular, es decir a menor número de células menor peso testicular, como se puede apreciar principalmente en el grupo 1.

**Tabla 7.2. Niveles basales y finales de Testosterona y LH con sus respectivas desviaciones estándar.**

Grupo	Testosterona basal (ng/ml)	Testosterona final (ng/ml)	LH basal (ng/ml)	LH final (ng/ml)
1 Cadmio	$2.07 \pm 1.23$	$1.54 \pm 0.66$	$2.69 \pm 0.98$	$43.3 \pm 10.14$
2 Cadmio-Zinc	$0.79 \pm 0.53$	$0.37 \pm 0.32$	$6.6 \pm 3.66$	$33.58 \pm 17.39$
3 Zinc	$1.58 \pm 0.94$	$0.324 \pm 0.15$	$4.7 \pm 1.90$	$21.86 \pm 11.05$
4 Testigo	$1.95 \pm 0.61$	$0.60 \pm 0.44$	$5.45 \pm 1.96$	$16.46 \pm 12.20$

En la tabla 2 se observa la disparidad en cuanto a los valores finales tanto de testosterona como de LH, acentuándose más la diferencia en los niveles finales de LH, principalmente en los grupos 1 y 2 con los otros grupos ( $p \leq 0.05$ ), donde tiene lugar la acción del cadmio. Por otra parte es importante hacer notar el nivel final más alto de testosterona del grupo 1 ( $p \leq 0.05$ ) en relación a los otros grupos. Con respecto a los niveles basales de testosterona se encontró una diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) del grupo 2 con respecto a los otros grupos. Caso contrario con respecto a los niveles basales de LH, donde el grupo 1 tuvo una diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) con respecto a los otros grupos. En el caso de los niveles finales de testosterona, con base a la proporción de disminución y respecto de su niveles basales, se encontró una diferencia evidente entre el grupo 1 (25%) respecto a los grupos 2, 3 y 4 respectivamente (53, 79 y 69%). Por lo que respecta a los niveles finales de LH, con base a la proporción de incremento y respecto a su niveles basales, se encontró una diferencia evidente entre el grupo 1 (609%) respecto a los grupos 2, 3 y 4 respectivamente (508, 465 y 302%).

Los niveles de significancia ( $p \leq 0.05$ ) en los grupos y entre ellos de acuerdo a los métodos estadísticos empleados se puede observar en las siguientes tablas.

## 7.1. COMPARACION ENTRE GRUPOS.

**Tabla 7.1.1. Comparación de variables entre los cuatro grupos.  
Prueba de Wilcoxon  
Diferencia significativa  $p \leq 0.05$**

Grupo	Test. derecho versus izquierdo (g)	LH Basal versus Final ng/ml	Testosterona Basal versus Final ng/ml	Número de células por testículo derecho versus izquierdo $\times 10^9 \text{ cm}^3$	Peso Corporal Inicial versus Final (g)	Correlación Peso Corporal versus Testículo derecho versus izquierdo (g)
1	0.415	0.008	0.310	0	0.003	0.479
2	0.343	0.011	0.225	0	0.043	0.257
3	0.345	0.036	0.18	0.593	0.028	0.786
4	0.859	0.003	0.003	0.109	0.003	0.670

Nótese que no existen diferencias entre los pesos testiculares en cada grupo. Por otra parte en el caso de los niveles de LH basal versus final existen diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en los grupos. Caso que no sucede a excepción del grupo 4, en los niveles de testosterona basal versus final. En relación al número de células de Leydig por testículo existen diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en los grupos 1 y 2, no así en el 2 y 3.

**Tabla 7.1.2. Comparación de variables.  
Prueba Mann Whitney (dos colas)  
Diferencia significativa  $p \leq 0.05$   
Grupo 1 (Cadmio) versus Grupo 2 (Cadmio-Zinc)**

Peso testículo derecho (g)	Peso testículo izquierdo (g)	LH basal ng/ml	LH final ng/ml	Peso Corporal Inicial (g)	Correlación peso corporal y testicular derecho (g)
0.004	0.011	0.000	0.038	0.100	0.006
Peso Corporal Final (g)	Testosterona basal Ng/ml	Testosterona final ng/ml	Número de células Test. Derecho $\times 10^9 \text{ cm}^3$	Número de células Test. Izquierdo $\times 10^9 \text{ cm}^3$	Correlación peso corporal y testicular izquierdo (g)
0.995	0.002	0.003	0.099	0.032	0.034

En esta tabla se observa que a excepción del peso inicial y final, y el número de células del testículo derecho existieron diferencias significativas entre las demás variables ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabla 7.1.3. Comparación de variables  
Prueba Mann Whitney (dos colas)  
Diferencia significativa  $p \leq 0.05$   
Grupo 1 (Cadmio) versus Grupo 3 (Zinc)**

Peso testículo derecho (g)	Peso testículo izquierdo (g)	LH basal ng/ml	LH final ng/ml	Peso Corporal Inicial (g)	Correlación peso corporal con peso del testículo derecho (g)
0.003	0.010	0.003	0.002	0.32	0.004
Peso Corporal Final (g)	Testosterona basal ng/ml	Testosterona final ng/ml	Número de células Test. Derecho $\times 10^9 \text{ cm}^3$	Número de células Test. Izquierdo $\times 10^9 \text{ cm}^3$	Correlación peso corporal con peso del testículo izq. (g)
0.056	0.332	0.001	0.032	0.032	0.011

Se observa en esta tabla, que solamente en el nivel de testosterona basal y en los pesos corporales inicial y final no se obtuvieron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ), a excepción de las otras variables observadas.

**Tabla 7.1.4. Comparación de variables.  
Prueba Mann Whitney (dos colas)  
Diferencia significativa  $p \leq 0.05$   
Grupo 1 (Cadmio) versus Grupo 4 (Testigo)**

Peso testículo derecho (g)	Peso testículo izquierdo (g)	LH basal ng/ml	LH final ng/ml	Peso Corporal Inicial (g)	Correlación peso corporal con peso del testículo derecho (g)
0.000	0.000	0.001	0.001	0.375	0
Peso Corporal Final (g)	Testosterona basal ng/ml	Testosterona final ng/ml	Número de células Test. Derecho $\times 10^9 \text{ cm}^3$	Número de células Test. Izquierdo $\times 10^9 \text{ cm}^3$	Correlación peso corporal con peso del testículo izq. (g)
0.767	0.741	0.006	0.046	0.046	0

Se observa en esta tabla, que tanto en los valores del peso corporal inicial y final así como en el valor de testosterona final no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ), no así en las restantes variables ( $p \leq 0.05$ ).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 7.1.5. Comparación de variables.  
Prueba Mann Whitney (dos colas)  
Diferencia significativa  $p \leq 0.05$   
Grupo 2 (Cadmio-Zinc) versus Grupo 3 (Zinc)**

Peso testículo derecho (g)	Peso testículo izquierdo (g)	LH basal ng/ml	LH final ng/ml	Peso Corporal Inicial (g)	Correlación peso corporal con peso del testículo derecho (g)
0.042	0.042	0.087	0.067	0.411	0.042
Peso Corporal Final (g)	Testosterona basal ng/ml	Testosterona final ng/ml	Número de células Test. Derecho $\times 10^9 \text{ cm}^3$	Número de células Test. Izquierdo $\times 10^9 \text{ cm}^3$	Correlación peso corporal con peso del testículo izquierdo (g)
0.272	0.049	0.185	0.014	0.021	0.042

En la tabla 7 se observa, que en los valores del peso testicular en general y número de células de Leydig se obtuvieron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). Por otra parte, se observó el mismo resultado en otras variables excepto en los niveles de LH basales y finales, testosterona final, y peso corporal inicial y final ( $p > 0.05$ ).

**Tabla 7.1.6. Comparación de variables  
Prueba Mann Whitney (dos colas)  
Diferencia significativa  $p \leq 0.05$   
Grupo 2 (Cadmio-Zinc) versus Grupo 4 (Testigo)**

Peso testículo derecho (g)	Peso testículo izquierdo (g)	LH basal ng/ml	LH final ng/ml	Peso Corporal Inicial (g)	Correlación peso corporal con peso del testículo derecho (g)
0.586	0.856	0.375	0.0074	0.28	0.002
Peso Corporal Final (g)	Testosterona basal ng/ml	Testosterona final ng/ml	Número de células Test. Derecho $\times 10^9 \text{ cm}^3$	Número de células Test. Izquierdo $\times 10^9 \text{ cm}^3$	Correlación peso corporal y peso del testículo izquierdo (g)
0.777	0.001	0.201	0.025	0.034	0.002

En el cuadro anterior se aprecia que existe una diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) en las variables número de células del testículo derecho e izquierdo, así como en la correlación de peso corporal y peso testicular.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 7.1.7. Comparación de variables  
Prueba Mann Whitney (dos colas)  
Diferencia significativa  $p \leq 0.05$   
Grupo 3 (Zinc) versus Grupo 4 (Testigo)**

Peso testículo derecho (g)	Peso testículo izquierdo (g)	LH basal ng/ml	LH final ng/ml	Peso Corporal Inicial (g)	Correlación peso corporal con peso del testículo derecho (g)
0.586	0.856	0.375	0.680	0.09	0.040
Peso Corporal Final (g)	Testosterona basal ng/ml	Testosterona final ng/ml	Número de células Test. Derecho $\times 10^9 \text{ cm}^3$	Número de células Test. Izquierdo $\times 10^9 \text{ cm}^3$	Correlación peso corporal con peso del testículo izq. (g)
0.145	0.293	0.316	0.724	0.480	0.069

En este cuadro solamente se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en el valor de la correlación del peso corporal y peso del testículo derecho.

**Tabla 7.1.8. Comparación de variables entre todos los grupos.  
Prueba Kruskal Wallis  
Diferencia significativa  $p \leq 0.05$   
Grupo 1 versus 2 versus 3 versus 4**

Peso testículo derecho (g)	Peso testículo izquierdo (g)	LH basal ng/ml	LH final ng/ml	Peso Corporal Inicial (g)	Correlación peso corporal con peso del testículo derecho (g)
0.000	0.000	0.000	0.001	0.15	0
Peso Corporal Final (g)	Testosterona basal ng/ml	Testosterona final ng/ml	Número de células Test. Derecho $\times 10^9 \text{ cm}^3$	Número de células Test. Izquierdo $\times 10^9 \text{ cm}^3$	Correlación peso corporal con peso del testículo izq. (g)
0.317	0.004	0.001	0.010	0.011	0

En la prueba de Kruskal Wallis solamente en las variables peso corporal inicial y final no existieron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ), no así en las demás variables donde si hubo diferencia ( $p \leq 0.05$ ).

## 7.2. SOBREVIDA.

La sobrevida en los grupos fue de la siguiente, quedando de manifiesto que la acción irritante del acetato de zinc en el tejido subcutáneo provocó que la mitad de los animales afectados fueran sacrificados, puesto que se presentó un deterioro en el peso corporal y salud de los animales.

**Tabla 7.2.1. Número de animales fallecidos de los grupos experimentales y el testigo.**

Grupo	Número de animales fallecidos
1 Cadmio	0
2 Cadmio-Zinc	6
3 Zinc	4
4 Testigo	0

Para conocer la sobrevida de los animales por grupo, se utilizó el método Kaplan-Mayer. En las tablas siguientes se observa la probabilidad acumulada (resultado obtenido  $\times 100\%$ ) de la sobrevida de los animales, resaltando que en los grupos 1 y 4 no existió mortalidad. Asimismo es necesario considerar que los animales al final del experimento alcanzaron los 14 meses de edad.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Tabla 7.2.3. Sobrevida del Grupo 1 (Cadmio).**

INTERVALO DE SEMANAS PARA SOBREVIDA GRUPO 1						
TIEMPO	$l_x$	$s_x$	$u_x$	$p_x$	$P_x$	
1 - 2	11	11	0	1	1	1
2-3	11	11	0	1	1	1
3-4	11	11	0	1	1	1
4 - 5	11	11	0	1	1	1
5- 6	11	11	0	1	1	1
6 - 7	11	11	0	1	1	1
7-8	11	11	0	1	1	1
8-9	11	11	0	1	1	1
9- 10	11	11	0	1	1	1
10 - 11	11	11	0	1	1	1
11 -12	11	11	0	1	1	1
12 - 13	11	11	0	1	1	1
13 - 14	11	11	0	1	1	1
14 - 15	11	11	0	1	1	1
15 - 16	11	11	0	1	1	1
16 - 17	11	11	0	1	1	1
17 - 18	11	11	0	1	1	1
18 - 19	11	11	0	1	1	1
19 - 20	11	11	0	1	1	1
20 - 21	11	11	0	1	1	1
21 - 22	11	11	0	1	1	1
22 - 23	11	11	0	1	1	1
23 - 24	11	11	0	1	1	1
					1	1
l <sub>x</sub> = animales vivos antes de la presente muerte						
s <sub>x</sub> = animales vivos después de esa muerte						
s <sub>x</sub> = l <sub>x</sub> - # de muertos						
u <sub>x</sub> = pérdidas de seguimiento entre ésta y la siguiente muerte						
p <sub>x</sub> = probabilidad de sobrevivir ese período						
p <sub>x</sub> = s <sub>x</sub> /l <sub>x</sub>						
P <sub>x</sub> = probabilidad acumulada						
P <sub>x</sub> = (p <sub>x</sub> ) ( P <sub>x</sub> del período anterior)						
Siguiete l <sub>x</sub> será: l <sub>x</sub> + 1 = s <sub>x</sub> - u <sub>x</sub>						

En la tabla 7.2.3., se observa que no existió ningún fallecimiento durante el período experimental, manteniéndose al final del estudio una probabilidad acumulada de sobrevivir de 1.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tabla 7.2.4. Sobrevida del Grupo 2 (Cadmio-Zinc).

INTERVALO DE SEMANAS PARA SOBREVIDA GRUPO 2						
TIEMPO	$l_x$	$s_x$	$u_x$	$p_x$	$P_x$	
1 - 2	11	11	0	1	1	1
2-3	11	11	0	1	1	1
3-4	11	11	0	1	1	1
4 - 5	11	11	0	1	1	1
5- 6	11	10	0	0.9	0.9	0.9
6 - 7	10	9	0	0.9	0.81	0.81
7-8	9	6	0	0.66	0.53	0.53
8-9	6	6	0	1	0.53	0.53
9- 10	6	5	0	0.83	0.43	0.43
10 - 11	5	5	0	1	0.43	0.43
11 -12	5	5	0	1	0.43	0.43
12 - 13	5	5	0	1	0.43	0.43
13 - 14	5	5	0	1	0.43	0.43
14 - 15	5	5	0	1	0.43	0.43
15 - 16	5	5	0	1	0.43	0.43
16 - 17	5	5	0	1	0.43	0.43
17 - 18	5	5	0	1	0.43	0.43
18 - 19	5	5	0	1	0.43	0.43
19 - 20	5	5	0	1	0.43	0.43
20 - 21	5	5	0	1	0.43	0.43
21 - 22	5	5	0	1	0.43	0.43
22 - 23	5	5	0	1	0.43	0.43
23 - 24	5	5	0	1	0.43	0.43
				1	0.43	0.43
$l_x$ = animales vivos antes de la presente muerte						
$s_x$ = animales vivos después de esa muerte						
$s_x = l_x - \#$ de muertos						
$u_x$ = pérdidas de seguimiento entre ésta y la siguiente muerte						
$p_x$ = probabilidad de sobrevivir ese periodo						
$p_x = s_x/l_x$						
$P_x$ = probabilidad acumulada						
$P_x = (p_x) (P_x$ del periodo anterior)						
Siguiente $l_x$ será: $l_x + 1 = s_x - u_x$						

En la tabla 7.2.4., se observa que en el grupo 2 sucedieron la mayor parte de las muertes de los animales, teniéndose al final una probabilidad acumulada de sobrevida de 0.43.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tabla 7.2.5. Sobrevida del Grupo 3 (Zinc).

INTERVALO DE SEMANAS PARA SOBREVIDA GRUPO 3						
TIEMPO	lx	sx	ux	px	Px	
1 - 2	11	11	0	1	1	1
2 - 3	11	11	0	1	1	1
3 - 4	11	11	0	1	1	1
4 - 5	11	11	0	1	1	1
5 - 6	11	11	0	1	1	1
6 - 7	11	8	0	0.72	0.72	0.72
7 - 8	8	7	0	0.87	0.62	0.62
8 - 9	7	7	0	1	0.62	0.62
9 - 10	7	7	0	1	0.62	0.62
10 - 11	7	6	0	0.85	0.52	0.52
11 - 12	6	6	0	1	0.52	0.52
12 - 13	6	6	0	1	0.52	0.52
13 - 14	6	6	0	1	0.52	0.52
14 - 15	6	6	0	1	0.52	0.52
15 - 16	6	6	0	1	0.52	0.52
16 - 17	6	6	0	1	0.52	0.52
17 - 18	6	6	0	1	0.52	0.52
18 - 19	6	6	0	1	0.52	0.52
19 - 20	6	6	0	1	0.52	0.52
20 - 21	6	6	0	1	0.52	0.52
21 - 22	6	6	0	1	0.52	0.52
22 - 23	6	6	0	1	0.52	0.52
23 - 24	6	6	0	1	0.52	0.52
				1	0.52	0.52
lx = animales vivos antes de la presente muerte						
sx = animales vivos después de esa muerte						
sx = lx - # de muertos						
ux = pérdidas de seguimiento entre ésta y la siguiente muerte						
px = probabilidad de sobrevivir ese período						
px = sx/lx						
Px = probabilidad acumulada						
Px = (px) ( Px del período anterior)						
Siguiente lx será: lx + 1 = sx - ux						

En la tabla 7.2.5., se aprecia que de las semanas 6 a la 11 sucedieron las muertes de las ratas. Quedando al final una probabilidad acumulada de sobrevida de 0.52.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 7.2.6. Sobrevida del Grupo Testigo.**

INTERVALO DE SEMANAS PARA SOBREVIDA GRUPO 4						
TIEMPO	$l_x$	$s_x$	$u_x$	$o_x$	$P_x$	
1 - 2	11	11	0	1	1	
2 - 3	11	11	0	1	1	
3 - 4	11	11	0	1	1	
4 - 5	11	11	0	1	1	
5 - 6	11	11	0	1	1	
6 - 7	11	11	0	1	1	
7 - 8	11	11	0	1	1	
8 - 9	11	11	0	1	1	
9 - 10	11	11	0	1	1	
10 - 11	11	11	0	1	1	
11 - 12	11	11	0	1	1	
12 - 13	11	11	0	1	1	
13 - 14	11	11	0	1	1	
14 - 15	11	11	0	1	1	
15 - 16	11	11	0	1	1	
16 - 17	11	11	0	1	1	
17 - 18	11	11	0	1	1	
18 - 19	11	11	0	1	1	
19 - 20	11	11	0	1	1	
20 - 21	11	11	0	1	1	
21 - 22	11	11	0	1	1	
22 - 23	11	11	0	1	1	
23 - 24	11	11	0	1	1	
				1	1	
$l_x$ = animales vivos antes de la presente muerte						
$s_x$ = animales vivos después de esa muerte						
$s_x = l_x - \#$ de muertos						
$u_x$ = pérdidas de seguimiento entre ésta y la siguiente muerte						
$o_x$ = probabilidad de sobrevivir ese período						
$o_x = s_x/l_x$						
$P_x$ = probabilidad acumulada						
$P_x = (o_x) (P_x$ del período anterior)						
Siguiete $l_x$ será: $l_x + 1 = s_x - u_x$						

En la tabla 7.2.6., se observa que no existió mortalidad quedando una probabilidad acumulada de sobrevida de 1.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 7.3. HALLAZGOS A LA MICROSCOPIA ÓPTICA.



Figura 7.3.1. Efectos de la acción del cloruro de cadmio en el tejido testicular de rata cepa Fischer (Grupo I). A. Destrucción severa de túbulos seminíferos, B. Células de Leydig sobrevivientes agrupadas en los vasos sanguíneos. 100x, H y E.

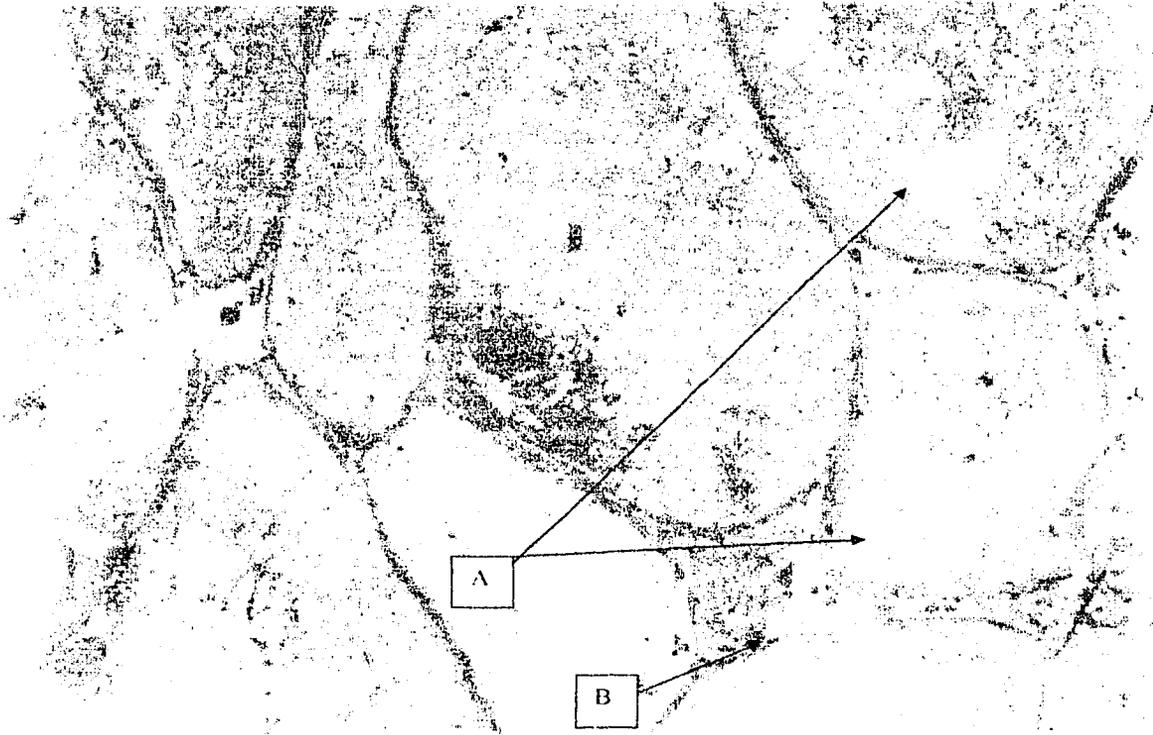


Figura 7.3.2. Efectos de la acción del cloruro de cadmio (Grupo 1) en el tejido testicular de rata cepa Fischer. A. Destrucción severa de túbulos seminíferos. Escasas células germinales. B. Células de Leydig sobrevivientes agrupadas en los vasos sanguíneos. 100x, H yE



Figura 7.3.3. Efectos de la acción del cloruro de cadmio y su protección con zinc (Grupo 2) en el tejido testicular de rata cepa Fischer. A. Se observan células de Leydig, B. Destrucción severa de túbulos seminíferos del tejido testicular, escasas células germinales. 100x, H y E.



Figura 7.3.4. Efectos de la acción del cloruro de cadmio y su protección con zinc (Grupo 2) en el tejido testicular de rata cepa Fischer. A. Se observan células de Leydig, B. Destrucción severa de túbulos seminíferos, escasas células germinales. 100x, H y E.



Figura 7.3.5. Efecto de la acción del acetato de zinc sobre el tejido testicular (Grupo 3). A. Génesis normal de las células germinales. B. Células de Leydig. 100x, H y E

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Figura 7.3.6. Efecto de la acción del acetato de zinc (Grupo 3) sobre el tejido testicular. A. Génesis normal de la células germinales excepto por la ligera vacuolización, B. Abundantes células de Leydig. 100x, H y E



Figura 7.3.7. A. Génesis normal de las células germinales del tejido testicular de rata cepa Fischer de 14 meses de edad (Grupo Testigo). B. Abundantes células de Leydig. 100x, Hy E

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 8. DISCUSIÓN.

En este estudio se evaluó el papel del zinc cuando el cadmio es utilizado como agente cancerígeno para producir degeneración y atrofia testicular. De acuerdo a los resultados obtenidos, se resalta la diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) observada en la sobrevivencia de células de Leydig protegidas por el zinc (tabla 7.1) con respecto a las células que fueron afectadas por el cadmio. lo que sin duda fortalece la hipótesis de que el zinc evita que las células de Leydig sean destruidas por la acción del cadmio. Para entender este fenómeno, se conoce que el zinc reduce la pérdida intracelular de potasio y de la transaminasa glutámica oxalacética por las células de Leydig, además de que interfiere en la difusión del cadmio hacia el núcleo de la célula. Si bien el zinc no se acumula en el testículo, generalmente actúa extracelularmente, donde tiene competencia con otros metales por los transportadores en este caso con la metalotioneína, importante transportador que utiliza el cadmio (18). De tal manera que el efecto protector del zinc exógeno es evidente. El daño ocasionado por el cadmio en testículo de ratas se describe en varias referencias (4, 11, 12 y 13). En estas se menciona, que por la acción del cadmio los testículos presentan varios grados de fibrosis peritubular y mineralizaciones intratubulares (4). Debido a la vida media prolongada del cadmio en la rata (más de 200 días), lo hace difícil de contrarrestar (20). Teniendo en cuenta esto último, el zinc exógeno tienen al inicio su efecto inmediato, el cual es muy importante, pues evita una mayor destrucción de células de Leydig como ya se mencionó y como se observa en las figuras 7.3.3 y 7.3.4, pero no impide la degeneración y atrofia testicular cuando el cadmio logra penetrar en el tejido intersticial (14). Para entender este fenómeno se requiere conocer otros factores que están implicados en su desarrollo. En primera instancia, hay que tomar en cuenta que existe un pequeño reservorio de células de Leydig (células precursoras), las cuales se convierten en células de Leydig maduras cuando existe un daño ocasionado por carcinógenos (22).

Es importante recordar el papel fundamental que tienen las hormonas LH y testosterona en el funcionamiento de las células de Leydig. La LH juega un papel muy importante en la producción de testosterona ya que estimula la biosíntesis de ésta. Además se conoce que la proliferación de las células de Leydig esta dada por la IGF-I y los factores secretados por las células de Sertoli y macrófagos del testículo (22).

En cuanto a los resultados obtenidos, se encontró que el valor basal de testosterona en el grupo 2 ( cadmio-zinc ), tuvo una diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) con respecto a los niveles basales de los otros grupos, sin embargo, este valor ( 0.79 ng/ml ) estuvo en el rango normal ( 0.62 a 2.38 ng/ml ) descrito por Waalkes y colaboradores en ratas de la cepa Fischer (14). Esta diferencia significativa tiene su explicación, ya que por azar muchas de las ratas que tuvieron los niveles basales menores de testosterona conformaron el grupo 2 (cadmio-zinc). Caso similar ocurrió con la LH, donde el nivel basal del grupo 1 tuvo una diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) con respecto a los otros grupos.

EST. TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Retomando el papel que desempeña la testosterona en este estudio, es importante recordar cual es el mecanismo de su producción para entonces entender su importancia. Este mecanismo se inicia de la manera siguiente: el colesterol se almacena como éster y entonces se mantiene a la célula libre de colesterol. Entonces, la LH estimula a la célula de Leydig a transportar al colesterol hacia las mitocondrias y a su vez a través de las membranas mitocondriales. Posteriormente, el colesterol por acción de la enzima citocromo P450scc se convierte en pregnenolona, ésta deja las mitocondrias para convertirse en testosterona (22).

Es importante tomar en cuenta que la fuente primaria de andrógenos en roedores son los testículos a diferencia de los primates que lo comparten tanto testículos como las glándulas adrenales. Del 2 al 3% de testosterona circula libre, el restante esta unido a albúminas y a la globulina ligadora de hormona esteroide (SHBG) (21). Otros factores que están implicados en el presente estudio son la predisposición genética y los desbalances hormonales, los cuales juegan un papel importante en el desarrollo de neoplasias e hiperplasia en las células de Leydig. El desequilibrio en la función del eje hipotálamo-hipófisis-testículo es dado por la hipersecreción de LH, la cual juega un papel importante en la respuesta proliferativa de las células de Leydig (21 y 22). Con la acción de la LH, se estimula la biosíntesis de la testosterona y el AMP cíclico. Cuando se encuentra un incremento marcado de LH no quiere decir que es proporcional a un incremento de la hormona unida a receptores (19). En relación a esto último, se ha descrito que el envejecimiento de la rata trae consigo niveles más altos de LH, causado esto por una desensibilización de los receptores de la células de Leydig a la LH, lo que provoca una prolongada hiperestimulación, que a su vez es suscitada por niveles elevados en forma crónica de esta hormona (21). Otro factor a considerar en el presente estudio son los trabajos realizados con cadmio en hámsters. El cadmio causa hiperplasia de las células gonadotrópicas de la hipófisis anterior, fenómeno que puede ocurrir en ratas cuando existe un estímulo proliferativo de las células sobrevivientes por la acción del cadmio. Basta dejar en claro que también llega a afectar las glándulas adrenales provocando feocromocitoma (11).

En el caso del presente estudio, existe un incremento notable (tabla 7.2) en la producción de LH en los grupos 1 y 2 cuya población de células de Leydig se vieron afectadas. La LH estimuló a las células de Leydig sobrevivientes, produciéndose un nivel mayor de testosterona en el grupo 1 comparado con el grupo testigo. Esto podría tener más lógica, si en las células de Leydig estuvieran en un proceso neoplásico, sin embargo en ninguno de los testículos de las ratas de todos los grupos incluyendo el testigo se observaron neoplasias, las cuales se caracterizan por un pleomorfismo o bien por una desproporción del tamaño núcleo-citoplasma, así como la evidencia de coalescencia de masas celulares adyacentes, criterios mencionados por Mc Connell y colaborados para diferenciar entre la hiperplasia y neoplasia testicular ( 16 ). Ratificando que en el presente estudio no se encontraron neoplasias, por tanto se descartó la posible participación de células de Leydig neoplásicas en los niveles de testosterona encontrados en el grupo 1 (Cadmio).

Por otra parte, se encontró que el nivel final más alto de testosterona en suero correspondió al grupo 1 (Cadmio) y que existió una diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) respecto a los otros grupos. La explicación de este nivel mayor de testosterona en el grupo 1 requiere conocer otros factores que pudieron influir en el resultado. Por tanto es necesario considerar los hallazgos microscópicos, lo que se hace constar en las figuras 1 y 2 donde se observa una sobrevivencia mínima de células de Sertoli, menor aún en algunos casos que las células de Leydig, sabiendo que la testosterona es utilizada por las células de Sertoli y que la utilización o no de ésta se relaciona de manera directa o indirecta con la elevación de LH, además en los sueros de los animales del grupo 1 se observan un nivel final significativamente ( $p \leq 0.05$ ) más altos de LH que en los otros grupos. Por tanto, el nivel alto de LH encontrado en el grupo de ratas tratadas con cadmio es comprensible si conocemos el número de células de Leydig sobrevivientes, además que existe un decremento en la concentración de testosterona conforme el animal envejece como se demuestra en los valores de esta hormona del grupo testigo. Con este fin se ha descrito que estos cambios pueden tener 2 causas diferentes: 1) decremento en la habilidad de las células de Leydig por producir testosterona en respuesta a la LH, resultado de una reducción de los niveles de testosterona y decremento en la inhibición de la retroalimentación en la secreción de LH y 2) decremento en la sensibilidad de la hipófisis para inhibir la retroalimentación por testosterona (21). Con respecto a lo mencionado anteriormente, han sido realizados estudios para conocer los efectos agudos y crónicos de la LH sobre la biosíntesis de andrógenos en células de Leydig de roedores y líneas celulares de Leydig. En estos estudios se ha observado que en respuesta a una estimulación aguda por la LH, las células de Leydig rápidamente sintetizan una proteína llamada STAR (21), lo cual provoca un incremento en el porcentaje de colesterol dentro de las mitocondrias y entonces se genera un incremento en la síntesis de pregnenolona y a su vez de testosterona (22). En otro estudio, se menciona que existe un factor lipofílico producido por los macrófagos testiculares, el cual estimula la producción de testosterona sin seguir el camino de producción de la proteína STAR. Estos macrófagos están presentes en daño al testículo (23). Por otra parte, la estimulación crónica de las células de Leydig por la LH trae como consecuencia el incremento de todas las actividades involucradas con la síntesis de esteroides. Se ha observado en el caso de células neoplásicas, que éstas sintetizan familias de proteínas mitocondriales en respuesta a una estimulación hormonal y que la cantidad de esas proteínas producidas están altamente correlacionadas a la producción de andrógenos. Si bien no se observó indicio alguno de neoplasia como se mencionó anteriormente, las células de Leydig sobrevivientes se pueden encontrar en un estadio preneoplásico debido a la cantidad mayor de testosterona del grupo 1 (Cadmio) con respecto a los otros grupos, lo que explicaría lo que está sucediendo en estas células y su relación que guardan con los otros grupos. En el caso de los niveles de LH encontrados, se sabe que existe una pérdida de sensibilización de los receptores a esta hormona por las células de Leydig en ratas de edad avanzada (22), sin embargo hay que considerar tres alternativas para una mayor producción de LH. 1) las células de Leydig sobrevivientes empiezan a producir una mayor cantidad de testosterona debido a su carácter neoplásico, hecho descartado puesto que no se encontraron neoplasias en los tejidos observados, esto implicaría la reducción de LH, sin embargo esto no es así, ya que los niveles de esta hormona permanecen muy altos en relación a otros grupos. Las siguientes dos alternativas son las más viables para explicar lo que sucede en el presente trabajo. Una de ellas permite pensar que las células de Sertoli

juegan un papel importante en el eje hipotálamo-hipófisis-testículo, siendo su presencia importante también para que los niveles de LH sean regulados, y la otra alternativa es que exista la pérdida de sensibilización de los receptores a LH en las células de Leydig. Aunado a esto se conoce que el desequilibrio del eje hipotálamo-hipófisis-testículo contribuye a la formación de lesiones proliferativas y especialmente cuando esto se asocia con altas dosis de cadmio. En relación a esto último, se ha visto que una simple inyección de cadmio vía subcutánea suprime los niveles de andrógenos en suero y testículo, y a su vez estimula la presencia y persistencia de hiperplasia de las células gonadotrópicas de la hipófisis anterior en hámsters (22).

Por lo que respecta a la acción del cadmio en la piel, éste provocó un ligero edema, el cual se tornó posteriormente en una costra y no tuvo efecto aparente en la salud de los animales coincidiendo con el informe de otros autores (4, 13 y 14). Caso contrario en la administración del zinc, pues este provocó ulceración en el sitio de administración, hecho descrito también por Gunn y colaboradores (12). Sin embargo, esta situación originó que algunos de los animales de los grupos 2 (Cadmio más Zinc) y 3 (Zinc) fueron sacrificados debido al daño severo en su piel provocado por acetato de zinc. Por lo que es importante considerar que el daño se puede minimizar diluyendo el acetato de zinc en un vehículo como solución salina fisiológica (9%).

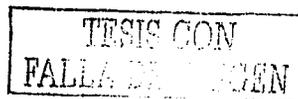
Como se observa en el presente estudio, el zinc si minimizó significativamente la destrucción de las células de Leydig. Sin embargo, muchos factores ya comentados en la presente discusión se deben de considerar, ya que pueden intervenir en el desarrollo de la degeneración y atrofia testicular. Por lo que es importante dilucidar el papel e importancia de cada uno de ellos cuando el cadmio es utilizado.

## 9. CONCLUSIÓN.

La sobrevivencia de las células de Leydig es evidente por el efecto protector del zinc. Si bien el zinc no protege completamente, pues también existió una reducción significativa de células de Leydig en el grupo 2 (Cadmio-Zinc) en comparación del grupo 3 y testigo. Por lo que es recomendable que esta protección se ejerza durante toda la vida del animal, teniendo en cuenta tanto la vida media del zinc como la del cadmio, lo que permitiría conocer las dosis razonables y el intervalo de aplicación, esto sin duda ayudaría a que el zinc exógeno aumentara la sobrevivencia de las células de Leydig al efecto destructor del cadmio. Es conveniente tomar en cuenta el efecto del cadmio en otros órganos (glándulas adrenales, hipotálamo e hipófisis), así como el posible papel de otras células del testículo, lo que permitirá de acuerdo a la información consultada conocer el importante papel en el desarrollo o no de neoplasias en las células de Leydig, y a su vez su influencia en los niveles de testosterona y LH. Para este fin habrá que dilucidar las asociaciones que puedan darse con la aparición de eventos como la vejez y sus consecuencias para este fin o bien en el caso de las ratas cepa Fischer, por su notable desarrollo de neoplasias espontáneas, asociaciones que puedan presentarse cuando se utiliza una sustancia como el cadmio para producir degeneración y atrofia testicular. Por esta razón es importante desarrollar estudios que permitan esclarecer las posibles asociaciones que existen entre los órganos antes mencionados cuando existe un daño en el tejido intersticial ocasionado por el cadmio.

## 15. LITERATURA CITADA.

1. Woolf N. Cell, Tissue and Disease. The Basis of Pathology. 2<sup>nd</sup> edition: Baillieré Tindall, 2000.
2. Jones TC, Hunt RD and King NW. Veterinary Pathology. 6th edition: William and Wilkins, 1997.
3. Hart RW, Newmann D and Robertson R. Dietary Restriction. Editors ILSI Press, 1995.
4. Waalkes M, Rehm S, Riggs CW, Bare RM, Devor DE, Poirer LA, Wenk ML, Henneman JR and Balaschak MS. Cadmiun carcinogenesis in male Wistar (Crlj(WI)BR)/rats: Dose-Response analysis of tumor induction in the prostate and testes and at the injection site. Cancer Res 1988; 48:4656-4663.
5. Haseman JK, Arnold J, Eustis S and Ward JM. Contributing causes of death and he use of this Information in the statistical evaluation of tumor data. In: Boorman GA, Eustis SL, Elwell MR, Montgomery CA and MacKenzie WF. Pathology of the Fischer Rat. Academic Press, 1990: 629-637.
6. Boorman GA, Chapin RE and Mitsumori K. Testis and Epididymis. In: Boorman GA, Eustis SL, Elwell MR, Montgomery CA and MacKenzie WF. Pathology of the Fischer Rat. Academic Press, 1990: 405-418
7. Haseman JK, Arnold J and Eustis SL. Tumor incidences in Fisher 344 rats: NTP Historical Data. In: Boorman GA, Eustis SL, Elwell MR, Montgomery CA and MacKenzie WF. Pathology of the Fischer Rat. Academic Press, 1990:555
8. Mohr U, Dungworth DL and Capen CC, editors. Pathobiology of the Aging Rat. ILSI Press, 1992.
9. Maekawa A, Onodera H, Tanigawa H, Furuta K, Kanno J, Ogiut J and Hayashi, Y. Experimental Induction of ovarian Sertolli in rats by N.- nitrosoureas. Environ Health Perspect 1987; 73: 115-123.
10. Pour PM. Transplacental induction of gonadal tumor in rats by a nitrosamine. Cancer Res 1986; 46: 4135-4138.
11. Waalkes M, Anver MR. and Diwan RA. Chronic toxic and carcinogenic effects of oral cadmium in the noble (NBL/Cr) rat: induction of neoplastic and proliferative lesions of the adrenal, kidney, prostate, and testes. J Toxicol Environ Health 1999; 58: 199-214.
12. Gunn SA and Gould TC. Cadmium and other mineral elements in the testis. Influencing factors ( Johnson AD, Gomes WR and Van Demark NL Editors ). Academic Press, New York, 1970.



13. Waalkes M., Rehm S, Riggs CW, Bare RM., Devor DE, Poirer LA, Wenk ML and Henneman JR. Cadmium carcinogenesis in male Wistar (CrI (WI) BR) rats: Dose-Response analysis of effects of zinc on tumor induction in the prostate, in the testes, and at the injection site. *Cancer Res* 1989; 49: 4282-4288.
14. Waalkes M, Rehm S and Devor DE. The effects of continuous testosterone exposure on spontaneous and cadmium induced tumor in the male Fischer (F344/Ncr) rat: loss testicular response. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 142: 40-46.
15. Van Zutphen LFM, Baumans V y Beynen AC. *Principios de la Ciencia del Animal de Laboratorio*. Elsevier, 1999.
16. Mc Connell RF, Westen HH, Ulland BM, Bosland MC and Ward JM. Proliferative lesions of the testes in rats with selected examples from mice. In: *Guides for Toxicologic Pathology*. STP7ARP/AFIP, Washington, D.C, 1992.
17. Zirkin BR. and Ewing LL. Leydig cells differentiation during maturation of the rat testis: a stereological study of cell number and ultra structure. *Anat Rec* 1987; 219:157-163.
18. Koizumi T and Waalkes M. Effects on zinc on the distribution and toxicity of cadmium in isolated interstitial cells of the rat testis. *Toxicology* 1989; 56: 137-146.
19. Moyle WR. and Ramachandran J. Effect of LH on steroid genesis and cyclic AMP accumulation in rat Leydig cell preparations and mouse tumor Leydig cells. *Endocrinology* 1973; 93: 127-134.
20. Poirier LA, Kasprzak KS, Hoover KL and Wenk ML. Effects of calcium and magnesium acetates on the carcinogenicity of cadmium chloride in Wistar rats. *Cancer Res* 1983; 43: 4575-4581.
21. Wright W. *Male Reproduction I & II*. Johns Hopkins School of Medicine. Lecture Notes ( serial on Line ).1998 May. The Johns Hopkins Hospital. Available from: URL: <http://www.jhsph.edu/reproductivebiology/wright.html>
22. Payne AH, Ardí MP and Russell LD. *The Leydig Cell*. Edited by David M Kiester, 1996.
23. Lukyanenko YO, Carpenter AM, Brigham DE, Stocco DM and Hutson JC. Regulation of Leydig cells through a steroidogenic acute regulatory protein-independent pathway by a lipophilic factor from macrophages. *J Endocrinol* 1998; 158: 267-275.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN