

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFFECTO PROTECTOR DE *Hedeoma drummondii* SOBRE EL DAÑO
GENOTÓXICO INDUCIDO POR FORMALDEHÍDO

Por

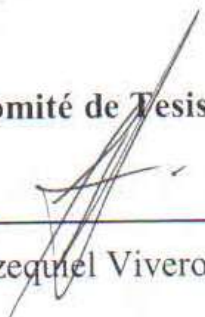
M.C. NADIA DENYS BETANCOURT MARTÍNEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN
QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

Mayo, 2016

EFFECTO PROTECTOR DE *Hedeoma drummondii* SOBRE EL DAÑO
GENOTÓXICO INDUCIDO POR FORMALDEHÍDO

Comité de Tesis




Dr. José Ezequiel Viveros Valdez

Presidente



Dra. Pilar Carranza Rosales

Secretario



Dr. Javier Morán Martínez

Vocal



Dra. María Julia Verde Star

Vocal



Dra. Azucena Oranday Cárdenas

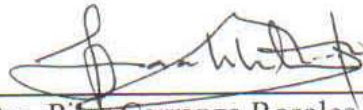
Vocal

EFFECTO PROTECTOR DE *Hedeoma drummondii* SOBRE EL DAÑO
GENOTÓXICO INDUCIDO POR FORMALDEHÍDO

Dirección de Tesis



Dr. José Ezequiel Viveros Valdez
Director



Dra. Pilar Carranza Rosales
Director externo



Dr. Javier Morán Martínez
Asesor externo

AGRADECIMIENTOS

A Todas las personas que colaboraron en este proyecto y principalmente a mis asesores:

Dr. Javier Morán Martínez.- Gracias por la confianza que siempre ha depositado en mí por hacerme crecer profesionalmente y por creer incondicionalmente en mi.

Dra. Pilar Carranza Rosales.- Gracias por ser un ejemplo en mi formación, por enseñarme no solo académicamente si no también en lo personal, gracias por todo lo que ha hecho por mí.

Dr. Ezequiel Viveros Valdés.- Gracias por la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, por la confianza y paciencia que me brindo pero sobre todo por la amistad que me ha brindado

QBP. Nohemí Cano Flores.- Eres una parte muy importante de este trabajo, muchas gracias por tu apoyo y por tu amistad.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.- Por el apoyo económico brindado con la beca No.357697.

A Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León

Al Centro de Investigación Biomédica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Coahuila

Al Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano de Seguro Social.

DEDICATORIAS

A Dios.

Por darme vida, salud y poner en mi camino a las personas adecuadas para la realización de este proyecto de vida...

A mis Padres.

Ana María e Isidro

Son el pilar de todo lo que soy y lo que puedo ser... Mi madre siempre a mi lado y mi padre desde el cielo. Los amo

A mi Hija

Circe. Eres lo más maravilloso que me ha pasado en la vida, la fuerza que me impulsa a ser y a hacer.. Te amo cachoro

A mis Hermanos

Heidi y Vladimir Los quiero...

A mis sobrinos favoritos

Sury y Lucca... Los quiero

A mis todos mis **amigos** que son como mi segunda familia, los quiero... Gracias

*“Llegar juntos es el principio.
Mantenerse juntos, Es el progreso.
Trabajar Juntos es el Éxito” ... Henry Ford*

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1.1 Formaldehido	3
2.1.2 Usos	3
2.1.3 Producción	3
2.1.4 Límites de exposición.	4
2.1.5 Efectos tóxicos	4
2.1.6 Metabolismo	5
2.1.7 Carcinogenicidad	5
2.2 Daño al ADN	6
2.2.1 Fragmentación de ADN.	7
2.2.2 Integridad del ADN y Radicales libres de Oxígeno (ROS)	8
2.3 <i>Hedeoma drummondii</i> (Poleo)	9
2.3.1 Compuestos Fenólicos	10
2.3.2 Estructuras de los compuestos fenólicos	10
2.3.3 Actividad biológica de los compuestos fenólicos	10
3. JUSTIFICACIÓN.	12
4. -HIPÓTESIS	12
5. OBJETIVO GENERAL	12
5.1 Objetivos específicos	12
6. MATERIALES Y MÉTODOS	14
PARTE I	14
6.1 Animales y tratamientos	
6.1.1 Extracción y análisis de espermatozoides de epidídimo	15
6.1.2 Análisis Histopatológico	15
6.1.3 Determinación de la Integridad del ADN	
6.1.3.1 Ensayo cometa en linfocitos	16
	16
6.1.3.2 Ensayo cometa en espermatozoides	17
6.1.3.3 Análisis de descondensación de cromatina	18

PARTE II	20
6.2.1 Material Vegetal	
6.2.1.1 Extracción del Material Vegetal	21
6.2.2 . Animales y tratamientos	21
6.3 Análisis estadístico	22
6.4 Variables	22
6.4.1 Variables dependientes	
	22
6.4.2 Variables Independientes	22
6.5 Estrategia Experimental.	23
7 RESULTADOS	24
Parte I	
7.1 Análisis de la Calidad espermática	24
7.1.1 Concentración espermática	
7.1.2 Motilidad espermática	25
7.2 Análisis Histopatológico	26
7.3 Análisis de Fragmentación del ADN inducida por formaldehído	
7.3.1 Fragmentación del ADN en linfocitos	28
7.3.2 Fragmentación del ADN en espermatozoides	30
Parte II	
7.4. Análisis de la Calidad Espermática	
7.4.1 Concentración espermática	32
7.4.2 Motilidad espermática	33
7.5 Análisis histológico	36
7.6 Análisis de Fragmentación del ADN	38
7.6.1 Integridad del porcentaje de ADN en el núcleo de linfocitos	
7.6.2 Integridad de AND en Espermatozoides por ensayo cometa	40
7.6.3 Evaluación de la integridad por la técnica de descondensación de cromatina SCD.	42

8. DISCUSIÓN	44
9. CONCLUSIONES.	49
10. PERSPECTIVAS	49
11. BIBLIOGRAFÍA	50
RESUMEN BIOGRÁFICO	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- La comparación estadística del daño en el ADN inducido por formaldehído en los linfocitos	28
Tabla 2.- Fragmentación de ADN en espermatozoides de ratas Wistar en los grupos tratados	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fenol	10
Figura 2. Fotos de <i>Hedeoma drummondii</i> .	20
Figura 3.- Diagrama esquemático que resume la estrategia general del trabajo.	23
Figura 4.- Efecto del formaldehído sobre la concentración espermática en los grupos tratados	25
Figura 5.- Efecto del formaldehido sobre la motilidad espermática en los grupos tratados	26
Figura 6.- Efectos del Formaldehído en tejido testicular.	27
Figura 7.- Escala de daño en linfocitos de ratas tratadas a diferentes dosis de FA. Fotografías representativas. a) Célula con ADN dañado corresponde al grupo tratado con 30 mg/Kg de FA, b) grupo tratado con 10 mg/Kg c) grupo tratado con 5 mg/Kg de FA d) grupo control. Tinción con bromuro de etidio. Microscopía de fluorescencia. 40X.	29
Figura 8.- Escala de daño en el ADN de espermatozoide de rata tratadas a diferentes dosis de FA, a) dosis de 30mg/Kg b)dosis de 10mg/Kg c)dosis de 5mg/Kg d)Solución fisiológica. Tinción con bromuro de etidio. Microscopía de fluorescencia. 40X.	31
Figura 9.- Concentración espermática de los grupos con diferentes tratamientos	33
Figura 10.- Concentración espermática en los grupos tratados con antioxidantes Vs grupo positivo de daño (FA), $P < .05$	33
Figura 11.- Porcentaje de motilidad espermática en los grupos tratados	34

Figura 12.- Significancia del parámetro de % de motilidad espermática entre G3 y G5 Vs G2 $P < .05$	35
Figura 13.- Efecto protector de <i>Hedeoma drummondii</i> sobre el daño morfológico inducido por formaldehído a nivel testicular en ratas Wistar	36
Figura 14.- Comparación esquemática de linfocitos de rata fotografía con microscopia de fluorescencia (a y b) y con la visualización del software TriTek CometScore™ Freeware v1.5(c y d)	39
Figura 15. - Porcentaje de ADN en la cabeza de los cometas en los grupos tratados	39
Figura 16.- % de integridad en el ADN en la cabeza de los cometas de grupos tratados con antioxidantes Vs grupo positivo de daño(FA), $P < .05$	40
Figura 17.- Porcentaje de ADN en la cabeza de los cometas de los grupos tratados, evaluada por ensayo cometa	41
Figura 18.- Fragmentación en espermatozoides por la técnica de ensayo cometa y SCD	41
Figura 19.- Porcentaje de Fragmentación de ADN en espermatozoides, evaluada por la Técnica de Descondensación de cromatina	42
Figura 20.- Fragmentación del ADN inducida por formaldehído en espermatozoides de rata Wistar. a) Espermatozoides con ADN fragmentado (asteriscos) muestran descondensación de la cromatina alrededor del núcleo.; b) Espermatozoides con ADN No fragmentado muestran descondensación de la cromatina alrededor del núcleo (flechas).	43

RESUMEN

El formaldehído (FA) es un inductor de estrés oxidativo y de daño al ADN y por ello recientemente ha sido catalogado como carcinogénico para el humano. Por otra parte, se ha demostrado que algunos agentes fitoquímicos pueden ser preventivos en distintas enfermedades. *Hedeoma drummondii* posee compuestos con potencial quimiopreventivo y antioxidante. Por lo anterior, nos propusimos evaluar el efecto protector de *H.drummondii* contra el daño genotóxico inducido por FA. Posterior a la selección de la dosis de trabajo con FA (10 mg/Kg de peso), se trabajó con 21 ratas Wistar macho divididos en grupos de 3 para los siguientes tratamientos: G1) *H. drummondii*, G2) FA, G3) *H. drummondii* + FA, G4) PBS, G5) Vitamina E +FA, G6) Vitamina E y G7) Aceite de soya. Los grupos 1,2,4,6,y 7 se trataron por 15 días c/3 días y los grupos 3 y 5 primero con *H. drummondii* y Vit E por 15 días c/3 días y luego con FA 15 días c/3 días. Al finalizar los tratamientos, se obtuvieron los órganos y tejidos y se realizaron análisis de calidad espermática, ensayo cometa en linfocitos, prueba de dispersión de la cromatina en espermatozoides y análisis histopatológico. Los resultados de concentración espermática en los grupos G2, G3 y G5 fueron: 25 ± 1 ; 23.66 ± 1.52 ; 42.33 ± 2.51 , mientras que el porcentaje de motilidad para los mismos grupos fue de 29.66 ± 1.51 ; 29.33 ± 4.04 ; 41.33 ± 2.01 , respectivamente. En ambos casos hay significancia estadística. El análisis histopatológico mostró que los animales del G2 presentaban daño en el epitelio germinal, mientras que en los grupos tratados con *H. drummondii*+FA y Vit E+Fa la estructura histológica estaba mejor conservada; éste efecto fue más evidente en los animales tratados con *H. drummondii*. En cuanto al daño al ADN de linfocitos, la combinación de *H. drummondii* + FA protegió mejor que la de Vit E+FA en comparación con los animales tratados solamente con FA ($P<0.5$). De manera similar, en espermatozoides de los grupos tratados con *H. drummondii*+FA y Vit E+FA se observó efecto protector en la fragmentación del ADN ($P<0.05$). En conclusión se determinó que el daño que provoca el FA es dependiente de la dosis y que a corto tiempo de exposición se induce daño aún a bajas concentraciones. Por otra parte *H. drummondii* posee efecto protector contra el daño genotóxico y citotóxico en ratas Wistar tratadas con formaldehído, este efecto protector fue similar al de la vitamina E, un agente antioxidante conocido.

ABSTRACT

Formaldehyde (FA) is an inducer of oxidative stress and DNA damage and therefore has recently been classified as carcinogenic to humans. Moreover, it has been shown that some phytochemicals may be preventive agents in different diseases. *Hedeoma drummondii* has chemopreventive compounds and antioxidant potential. Therefore, we proposed to evaluate the protective effect of *H. drummondii* against genotoxic damage induced by FA. After the dose selection worked with AF (10 mg / kg body weight), it worked with 21 male Wistar rats divided into groups of 3 for the following treatments: G1) *H. drummondii*, G2) FA, G3) *H. drummondii* + FA, G4) PBS, G5) Vitamin E + FA, G6) Vitamin E and G7) soybean oil. Groups 1,2,4,6, and 7 were treated for 15 days c / 3 days and the groups 3 and 5 first with *H. drummondii* and Vit E for 15 days c / 3 days and then with FA 15 days c / 3 days. At the end of the treatments, organs and tissues were obtained and analysis of sperm quality, comet assay in lymphocytes, dispersion test in sperm chromatin and histopathological analyzes were performed. Sperm concentration results in G2, G3 and G5 groups were: 25 ± 1 ; 23.66 ± 1.52 ; 42.33 ± 2.51 while the percentage motility for the same groups was 29.66 ± 1.51 ; 29.33 ± 4.04 ; 41.33 ± 2.01 , respectively. In both cases statistical significance. Histopathological analysis showed that G2 animals showed damage in the germinal epithelium, while in the groups treated with *H. drummondii* + FA and Vit E + F histological structure was better preserved; This effect was more evident in animals treated with *H. drummondii*. As for the lymphocyte DNA damage, the combination of *H. drummondii* + FA protected better than FA + Vit E compared to animals treated only with FA ($P < 0.5$). Similarly, in sperm treated groups *H. drummondii* + E + Vit FA and FA protective effect was observed in DNA fragmentation ($P < 0.05$). In conclusion it was determined that the damage from the FA is dose dependent and short exposure time damage is induced even at low concentrations. Moreover *H. drummondii* has protective effect against genotoxic and cytotoxic damage in Wistar rats treated with formaldehyde, this protective effect was similar to that of vitamin E, an antioxidant known.

1. INTRODUCCIÓN

El formaldehído (FA) o metanal, $H_2C=O$, es un gas incoloro, inflamable, de olor fuerte; otro tipo de formaldehído, conocido es la "formalina" (una solución acuosa que contiene 37 por ciento de formaldehído), se utiliza en desinfectantes, embalsamiento de fluidos, tejidos, cueros y tintes. En estados Unidos se producen al año 150 millones de libras, lo cual equivale a alrededor del 2.5 por ciento del consumo total mundial (US Consumer Product Safety Commission, Release #79-059). En México no existen datos de la producción o del consumo de formaldehído.

El FA es un poderoso inductor de estrés oxidativo y por lo tanto desencadena procesos que pueden dar lugar a carcinogénesis (OSHA, 1995), en los últimos años se ha demostrado que afecta severamente la función renal y hepática, órganos blanco de gran importancia por su papel en la destoxicación del organismo (Gulec et al. 2006; Zararsiz et al. 2006; Zararsiz et al. 2007; MacAllister et al. 2011).

Tomando en cuenta que el formaldehído se encuentra entre los principales carcinógenos a los cuales están expuestos los seres humanos, y que representa un riesgo de salud serio y potencial (Luo et al. 2011), en los últimos años se han desarrollado medidas preventivas con la finalidad de disminuir los riesgos ocupacionales de la exposición a este tóxico. Una de las estrategias para contrarrestar los efectos dañinos del FA ha sido el aumento o inclusión de agentes antioxidantes exógenos en la dieta, por ejemplo, productos naturales, infusiones, extractos, y ciertos vegetales, por mencionar algunos (Zararsiz et al. 2007; Ciftci et al. 2015; Gurel et al. 2005). El efecto de estos antioxidantes naturales ha sido útil en la prevención y/o co-tratamiento en enfermedades crónicas tales como cáncer (Jang et al. 1997; Geffen y Man 2002) y diabetes (Zhang et al. 2008; Lia et al. 2004; Manickam et al. 1997).

Los compuestos fenólicos antioxidantes (flavonoides, cumarinas, estilbenos etc.) son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en frutas, verduras e infusiones herbales, y han generado un gran interés para su estudio debido a que se les ha relacionado como protectores frente al daño ocasionado por estrés oxidativo (Robbins 2003).

En este contexto, dentro de la flora regional presente en el norte de México destaca el uso etnobotánico del poleo (*Hedeoma drummondii*), el cual es una especie que se utiliza con fines medicinales (fiebres, resfriados e insomnio), o para usos culinarios, esto último debido a su semejanza organoléptica con la menta (*Mentha spp*). El poleo se considera con potencial como quimiopreventivo, ya que posee una potente actividad antioxidante (Viveros Valdez et al. 2008) y antiproliferativa (Viveros Valdez et al. 2010). Estas actividades se han relacionado a la presencia de ácidos fenólicos simples, principalmente del ácido cafeico. Por lo anteriormente expuesto, en este trabajo nos propusimos evaluar el efecto protector del extracto hidroalcohólico del poleo sobre el daño genotóxico inducido experimentalmente en ratas macho Wistar tratadas con formaldehído.

2. ANTECEDENTES

2.1.1 Formaldehído

El formaldehído es un gas incoloro, inflamable, tiene un olor penetrante característico y cuando está presente en niveles altos en el ambiente, puede producir una sensación de ardor en ojos, nariz y pulmones. Se le conoce también como metanal, óxido de metileno, oximetileno, aldehído metílico y oxometano (ACGIH, 1992).

Nuestro cuerpo produce cantidades pequeñas de formaldehído en forma natural como parte del metabolismo diario normal; estas cantidades pequeñas no son perjudiciales (ATSDR, 1999). También se puede encontrar formaldehído en el aire que respiramos en el hogar, en el trabajo, en los alimentos que consumimos y en algunos productos cosméticos que utilizamos, tales como shampoo y alasiadores de cabello (ATSDR, 1999),

2.1.2 Usos

El formaldehído se utiliza ampliamente para diversos fines industriales, tiene 4 aplicaciones básicas (Stayner et al. 1993).

- 1) Como intermediario en la producción de resinas de tipo urea-formaldehído y fenol-formaldehído
- 2) Como intermediario en la producción de productos químicos industriales
- 3) Como bactericida o fungicida
- 4) Como componente en la formulación de artículos cosméticos como shampoo y productos farmacéuticos, como fijador y preservador de órganos y tejidos

2.1.3 Producción

El FA se produce en gran escala a nivel mundial mediante el proceso de catálisis en fase de vapor de oxidación de metanol (ACGIH. 1992).

En el año 2000, la producción anual de formaldehído en los Estados Unidos de Norteamérica superó los 4.6 millones de toneladas (ACGIH. 1992). La Administración de Seguridad y Salud Ocupacional (OSHA) estima que en 1995 aproximadamente 2.1 millones de personas en los Estados Unidos fueron expuestos a formaldehído en su lugar

de trabajo (Di Stefano et al. 1999). NO obstante, se piensa que un número sustancialmente mayor de personas puede estar expuestas a bajas concentraciones de FA en el medio ambiente. Los niveles reportados en instituciones de salud en los Estados Unidos se encuentran en promedio de 0.1 a 0.8 ppm en el ambiente (OSHA 1992; Bardana 1992).

2.1.4 Límites de exposición.

Varias organizaciones internacionales, federales y estatales han establecido normas o recomendaciones para el uso y producción de formaldehído. La OSHA ha establecido un límite promedio de exposición permisible durante períodos de 8 horas de 0.75 ppm; el límite para exposiciones de 15 minutos es de 2 ppm.

La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) y la Agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA), han establecido normas para declarar la cantidad de formaldehído que se utiliza en las empresas y la cantidad que puede liberarse legalmente del escape de automóviles. La FDA también tiene normas acerca del uso de formaldehído en los alimentos. La Conferencia Americana de Higienistas Industriales de Gobierno (ACGIH) ha establecido un límite ocupacional de 0.4 ppm, así mismo el Instituto Nacional de Seguridad y Salud Ocupacional (NIOSH) recomienda un límite ocupacional de 0.016 ppm como promedio durante 8 horas y un límite de 0.1 ppm durante períodos de 15 minutos.

2.1.5 Efectos tóxicos

La exposición al formaldehído se produce por vía tanto endógena como exógena. Se absorbe rápidamente después de la inhalación y la exposición oral; sin embargo, no se absorbe a través de la piel (NTP, 2010). La vida media de formaldehído en el plasma de ratas y monos es de aproximadamente 1 a 1.5 minutos (McMartin et al. 1979, IARC. 2006).

El FA produce irritación de nariz y faringe tanto en seres humanos como en animales de experimentación, a concentraciones de 2 a 3 ppm en periodos de entre cuarenta minutos y tres horas se han observado síntomas de irritación y dermatitis

alérgica en individuos sanos (IARC 2006). En un estudio realizado por Zhang et al. 2010 se demostró que a dosis de 100-200 μM (3–6 $\mu\text{g/mL}$) se inhibe el crecimiento de cultivos de granulocitos y macrófagos. Los niveles de formaldehído en sangre en humanos se encuentran en el rango de 50-100 μM ó 1.5–3 $\mu\text{g/mL}$ (Heck et al. 1989).

2.1.6 Metabolismo

Las diferencias de absorción y distribución del FA dependen de los patrones de respiración de cada especie. En las ratas por ejemplo, casi todo el formaldehído inhalado es absorbido por vía nasal, mientras que en los primates, esta absorción se produce en la tráquea y bronquios (Chang et al. 1983; Heck et al. 1989; Monticello et al. 1989).

El metabolismo de formaldehído es similar en todas las especies de mamíferos estudiados (IARC 2006). Aunque el FA puro es un gas, la forma dominante es metanodiol, un producto de la hidratación de FA $\text{H}_2\text{C} = \text{O}$.

El FA es rápidamente metabolizado y almacenado, se metaboliza a formato a través de la vía FA deshidrogenasa/clase III alcohol deshidrogenasa y ocurre en todos los tejidos del cuerpo; el formato es rápidamente removido por el torrente sanguíneo (Heck et al. 1989).

La FA deshidrogenasa (FDH) es la enzima metabólica que se involucra en el metabolismo del FA en todos los estudios en tejidos. Si el FA, no es metabolizado por la (FDH) este puede formar ligamientos entre proteínas, entre proteínas y cadenas de ADN simple o entre un carbono como intermediario metabólico por inicialmente creando un tetrahidrofolato (IARC, 1995; Heck et al. 1989).

Aunque el FA se metaboliza rápidamente, es un electrófilo que reacciona con una variedad de moléculas endógenas, incluyendo glutatión, proteínas, ácidos nucleicos, y ácido fólico (NTP 2010).

2.1.7 Carcinogenicidad

Desde 1981, el formaldehído se consideraba como posible cancerígeno humano sobre la base de pruebas suficientes a partir de estudios en animales de experimentación (Second annual report on carcinogens. 1981). A partir de entonces se publicaron

numerosos estudios sobre el cáncer y FA, por lo cual en el año 2011 se le declaró como carcinógeno humano. Los principales tipos de cáncer en los que se le ha implicado son el nasofaríngeo, de senos paranasales y Linfo-hematopoyético (Report on Carcinogens. 2011).

2.2 Daño al ADN

Diversos estudios realizados en animales de experimentación han demostrado que el FA es genotóxico para células espermáticas y que afecta severamente tejido testicular y la calidad espermática, disminuyendo la concentración y porcentaje de motilidad espermática (Wang et al. 2012; Cassidy et al. 1983; Majumder et al 1995). Cuando gran cantidad de radicales hidroxilo atacan una parte restringida de la molécula de ADN, se forman numerosos rompimientos de cadena sencilla, que por su cercanía podrían conducir a la formación de rompimientos de cadena doble, los que provocan daño permanente al material genético (Balasubramanian et al 1998).

Por otra parte el origen de las lesiones en el ADN del espermatozoide puede deberse a múltiples causas, como la presencia de una enfermedad, el uso de fármacos, la presencia de fiebre alta, temperatura testicular elevada, la contaminación atmosférica, el tabaquismo o una edad avanzada (Agarwal y Allamaneni 2005; Cortés et al. 2007).

El mecanismo más importante de producción de daño en el ADN del espermatozoide puede ser la presencia de un empaquetamiento anómalo de la cromatina, debido a una protaminación insuficiente, producción de radicales libres de oxígeno (ROS) y apoptosis (Agarwal y Allamaneni 2005). En diversos estudios se ha descrito que la presencia de radicales libres de oxígeno es una causa importante de lesión en el ADN del espermatozoide (Hovhannisyan 2010; Balasuriya et al. 2011; Zribi et al. 2011; Agarwal y Allamaneni 2005; Duydu et al. 2011).

2.2.1 Fragmentación de ADN.

En 1982 Balhorn describió el modelo de la estructura de la cromatina espermática que parece ser consistente con los resultados experimentales en cromatina de este tipo de células intactas y reconstituidas por complejos de ADN-protaminas.

El ADN de las células espermáticas se encuentra seis veces más condensado que el ADN de un cromosoma mitótico, por esta razón el ADN espermático de mamífero está más condensado que el ADN de una célula eucariota. Una pequeña porción de ADN de células espermáticas humanas está empaquetado por histonas; la cromatina espermática humana contiene alrededor del 15% de histonas, el porcentaje restante de histonas es reemplazado por protaminas de una manera específica durante la espermatogénesis (Ward y Coffey. 1991). Las proteínas de construcción en el ADN de células espermáticas son las protaminas, proteínas cargadas positivamente por los residuos de arginina neutralizando el lado negativo de la carga del ADN, mediante los enlaces fosfodister en la cadena de ADN (Ward. 1993).

La condensación de la cromatina se lleva a cabo en el testículo y en el epidídimo durante la espermatogénesis y más específicamente durante la espermiogénesis, donde se inicia la sustitución del complejo histona-ADN por el complejo protamina-ADN y este nuevo complejo permite compactar la cromatina. La condensación de la cromatina facilita la formación de enlaces covalentes y no covalentes entre los aminoácidos que forman las protaminas; los enlaces covalentes están representados por uniones disulfuro (S-S) creados por la oxidación de dos grupos tiol (-SH) provenientes de dos moléculas de cisteína (Hovhannisyan 2010).

La integridad del ADN en espermatozoides es indispensable para una correcta transmisión de la información genética y por lo tanto el mantenimiento de una buena salud para las futuras generaciones (Hughes et al. 1999). Es importante que la cromatina se condense y sea estable para que el espermatozoide pueda adquirir una morfología hidrodinámica que le facilite el desplazamiento a través del tracto reproductor femenino y así facilitar el transporte del ADN (Hovhannisyan 2010). Si la integridad genómica del

espermatozoide presenta daño, puede desencadenar un desarrollo embrionario anormal, o fallo en la implantación del embrión, e inclusive puede propiciar abortos en fases más tardías (Agarwal y Allamaneni 2005; Nossoni 2008).

La función y la replicación de cada célula son dependientes del ADN (Hughes et al. 1999). La principal función de la condensación de la cromatina es inactivar transitoriamente al ADN del espermatozoide y protegerlo de posibles daños mecánicos y químicos durante el almacenamiento en el epidídimo y su recorrido a través del tracto reproductor femenino, hacia el sitio de la fertilización, en este trayecto se producen alteraciones en la condensación y estabilidad de la cromatina por alteraciones cromosómicas y alteraciones en el proceso de espermiogénesis, las cuales se han asociado con la presencia de ADN dañado y una inadecuada deposición de protaminas (Agarwal y Allamaneni. 2005; Hovhannisyan 2010).

El daño al ADN puede resultar en muerte celular o en la inducción de mutaciones en los espermatozoides, lo que propicia la transmisión de mutaciones a las siguientes generaciones o resultar en infertilidad masculina (Hughes et al. 1999).

2.2.2 Integridad del ADN y Radicales libres de Oxígeno (ROS)

Por otra parte, se sabe que la generación de radicales libres de oxígeno (ROS) o alteraciones en el intercambio correcto de las histonas por las protaminas, pueden producir daño irreversible en el DNA del gameto (Gil et al. 2007; Hovhannisyan 2010; Cortés et al. 2007). El estrés oxidativo ocurre cuando hay una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno por parte de los leucocitos (Saito et al. 2005; Zribi et al. 2011) o por los espermatozoides anormales y/o se produce una disminución de la capacidad antioxidante del semen (Duydu et al. 2011). La infertilidad en varones estériles con parámetros seminales normales se podía relacionar con la presencia de un ADN dañado en los espermatozoides (Agarwal y Allamaneni. 2005; Balasuriya et al. 2011). En relación directa con estos factores, se induce apoptosis o muerte celular programada, la cual tiene lugar durante el proceso de maduración espermática (Cortés et al. 2007). En algunos pacientes estériles, el control de la espermatogénesis puede ser

menos eficiente y se pueden producir numerosos espermatozoides inmaduros con restos citoplasmáticos, que son más propensos a producir especies reactivas de oxígeno (ROS) y que se caracterizan por la presencia de anomalías en el ADN (Balasuriya et al. 2011; Gil et al. 2007; Hovhannisyán 2010; Zribi et al. 2011).

La presencia de radicales libres de oxígeno ha merecido una atención especial, tanto por su papel en la fisiología como por su implicación en las enfermedades de la reproducción humana (Nossoni. 2008; Agarwal y Allamaneni. 2005).

2.3 *Hedeoma drummondii* (Poleo)

Hedeoma drummondii, conocido también como Poleo es una planta aromática que pertenece a la familia *Lamiaceae*, la cual está representada por aproximadamente 200 géneros y más de 3000 especies distribuidas por todo el mundo, particularmente en la región mediterránea, que representa el principal centro de diferenciación de la familia.

La familia *Lamiaceae* incluye formas herbáceas, anuales y perennes, son dicotiledóneas, sus flores tienen coronas bilabiadas, simétricas y bilaterales, poseen cinco pétalos, sus hojas son simples sin estipulas, opuestas y decusadas (Irving, 1980)

H. drummondii (poleo mexicano) es una planta pequeña (4-15 pulgadas), que tiene un aroma a menta muy fuerte y agradable. Estas plantas se encuentran en América del Norte y sus partes aéreas son utilizadas por los amerindios para el tratamiento de los trastornos de la gripe, resfriado, fiebre y dolores estomacales (Foster y Hobbs, 2002). De la parte aérea de *H. drummondii* se han aislado los flavonoides luteolina-7-O-glucósido y sideritoflavona, así como compuestos fenólicos simples tales como los ácidos cafeico, clorogénico, rosmarínico y p-hidroxibenzoico; a los cuales se les ha atribuido su actividad antioxidante y antiproliferativa (Viveros-Valdez et al. 2008, 2010).

2.3.1 Compuestos Fenólicos

Las plantas vasculares sintetizan una gran cantidad de moléculas orgánicas, como consecuencia de su metabolismo secundario.

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo. Estos compuestos participan en diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la foto-síntesis, la formación de componentes estructurales, la alelopatía y la defensa ante los factores adversos del ambiente.

Los compuestos fenólicos están asociados al color, a las características sensoriales (sabor, astringencia, dureza), nutritivas y las propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal. Las propiedades antioxidantes de los fenoles se ha asociado a la reactividad del grupo fenol (Robbins 2003; Kähkönen et al. 2001).

2.3.2 Estructura de los compuestos fenólicos

El término fenoles comprende aproximadamente 8000 compuestos presentes en la naturaleza. Todos ellos poseen como estructura común un anillo fenol que corresponde a un anillo aromático que contiene al menos un sustituyente hidroxilo (figura 1).

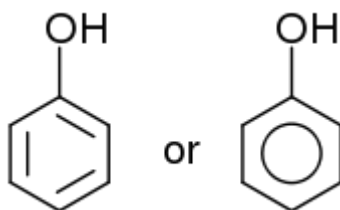


Figura 1. Fenol

2.3.3 Actividad biológica de los compuestos fenólicos

Se han descrito diversas actividades biológicas presentes en los compuestos fenólicos, por mencionar algunas, inhiben la enzima glucosil transferasas del *Streptococcus mutans*, inhiben la auto-oxidación del ascorbato, también inhiben efectos

citotóxicos, la promoción del crecimiento tumoral y a la enzima xantina mono-amina oxidasa. El efecto antioxidante de los fenoles se ha asociado a actividades biológicas tales como antimutagénica, anticancerígena y antienvjecimiento (Velioglu et al. 1998; Proestos et al. 2005).

Las plantas utilizadas para realzar y complementar los sabores de los alimentos son fuentes de compuestos fenólicos; además se ha documentado que el consumo de plantas está asociado con una baja incidencia de cáncer y baja mortalidad por esta misma enfermedad (Zheng y Wang. 2001)

Un aumento en la ingesta de antioxidantes fenólicos naturales se correlaciona con una reducción de las enfermedades coronarias, mientras que dietas ricas en compuestos fenólicos se asocian con una mayor expectativa de vida. Estas propiedades incluyen actividad anticancerígena, cardiovascular, antiviral, antiinflamatoria y antialérgica (Guohua et al. 1997; García-Alonso et al. 2004). Estos compuestos pueden moderar la peroxidación de los lípidos involucrados en la aterogénesis, trombosis y carcinogénesis. Sus propiedades conocidas incluyen la captura de radicales libres, actividad antioxidante e inhibición de las enzimas hidrolíticas y oxidativas fosfolipasa A2, ci-cloxygenasa y lipoxigenasa (Siddhuraju y Becker. 2003).

3. JUSTIFICACIÓN.

Se han identificado un gran número de agentes xenobióticos asociados a la exposición ocupacional o ambiental y que tienen un efecto adverso sobre la salud de seres humanos y animales. Uno de estos agentes es el formaldehído (FA), el cual es utilizado por diversas industrias y por lo mismo, se encuentra presente en los ámbitos laboral y del hogar. El FA induce toxicidad a nivel reproductivo, neurológico y genotóxico, por mencionar algunos de sus efectos tóxicos. Entre los mecanismos estudiados se ha demostrado, entre otros, que el FA es un inductor de estrés oxidativo y de formación de aductos de ADN. Por otra parte, la inclusión en la dieta de productos naturales, o suplementos comerciales de origen natural con propiedades antioxidantes es cada vez más común en nuestros tiempos debido a que en numerosas enfermedades se ha demostrado que ocurren procesos de estrés oxidativo. En este contexto, *H. drummondii* es una planta que posee importante efecto antioxidante debido a su contenido de compuestos fenólicos. Por lo anterior, en este trabajo consideramos importante investigar el efecto protector de *H. drummondii* sobre el daño genotóxico y calidad espermática inducidos por formaldehído en un modelo animal.

4. HIPÓTESIS

Hedeoma drummondii tiene efecto protector contra el daño genotóxico inducido por formaldehído.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto protector de *Hedeoma drummondii* contra el daño genotóxico inducido experimentalmente por formaldehído en ratas Wistar macho

5.1 Objetivos específicos

- Determinar las concentraciones de FA que inducen daño citotóxico, genotóxico y alteraciones morfológicas en ratas Wistar macho.
- Colectar *Hedeoma drummondii*. y obtener el extracto hidroalcohólico
- Evaluar la toxicidad y genotoxicidad de *Hedeoma drummondii* en ratas Wistar macho.
- Determinar el efecto protector de *Hedeoma drummondii* sobre el daño inducido por FA en ratas Wistar macho.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se dividió en dos partes: en la primera parte evaluamos diferentes dosis de FA por vía intraperitoneal para determinar cuál de ellas inducía daño genotóxico y citotóxico sobre linfocitos, espermatozoides hígado, riñón, pulmón, cerebro y testículos.

En la segunda parte, una vez seleccionada la dosis de trabajo con FA, se estudió el efecto protector de *H. drummondii* comparándolo con el efecto de un antioxidante conocido (Vitamina E). En esta segunda etapa del trabajo decidimos analizar solamente tejido testicular, ya que fue el órgano en el que se observó mayor daño, mientras que el daño genotóxico lo estudiamos en linfocitos y espermatozoides.

En esta segunda etapa del trabajo se realizaron las mismas determinaciones y se aplicaron las mismas técnicas metodológicas de la primera parte, las cuales se describen detalladamente a continuación.

PARTE I

6.1 Animales y tratamientos

Se utilizaron 20 ratas adultas macho Wistar, con peso de 226-258g, las cuales fueron proporcionadas por el Bioterio de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Coahuila, Unidad Torreón, Coah., Mex, los animales permanecieron en condiciones controladas de temperatura a 25°-26°C con ciclos luz-oscuridad 12 h, dieta especial para roedor y agua *ad libitum*

Se dividieron en 4 grupos experimentales (n=5). El grupo control (GC) recibió una inyección intraperitoneal (ip) de solución fisiológica al 0.9%. Los grupos de experimentación recibieron inyecciones de FA (37% Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) como se describe enseguida; el Grupo 1 (G1) recibió una inyección ip de FA de 5 mg/kg, el Grupo 2 (G2) recibió una inyección ip de FA de 10 mg/kg, el Grupo 3 (G3) recibió una inyección ip de FA de 30 mg/kg, por 5 días.

Trascurrido el tiempo de exposición los animales de estudio fueron sacrificados por el Médico Veterinario Zootecnista encargado del bioterio de la Facultad de Odontología. Se llevó a cabo el sacrificio por dislocación cervical, se extrajeron muestras sanguíneas por punción cardiaca, los órganos (hígado, riñón, pulmón, cerebro y testículo) fueron retirados y fijados en formalina neutra al 10%, para su posterior análisis histopatológico, así también las células espermáticas fueron obtenidas de los epidídimos.

6.1.1 Extracción y análisis de espermatozoides de epidídimo

El epidídimo fue puncionado y eluido con 4mL de solución fisiológica; para la obtención y evaluación de los espermatozoides, se colocaron en un portaobjetos 10 μ L de la suspensión obtenida, mientras que para la observación de la proporción de la motilidad con un aumento de X100, se analizaron un total de 200 células por muestra. Para el recuento de espermatozoides se utilizó el procedimiento descrito en el Manual de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2010).

6.1.2 Análisis Histopatológico

Al finalizar los tratamientos, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y los testículos fueron inmediatamente removidos y fijados en solución fresca de Bouin hasta su análisis; los demás tejidos se fijaron en formalina neutra al 10% por al menos 24 h. Una vez fijados, los tejidos fueron procesados mediante la técnica histológica convencional e incluidos en bloques de parafina los cuales fueron cortados en secciones de 5 μ y teñidos con hematoxicilina y eosina (H&E). Los cortes de tejidos fueron analizados utilizando un microscopio de luz de campo claro (Carl Zeiss, modelo Axisotar Plus).

6.1.3 Determinación de la Integridad del ADN

6.1.3.1 Ensayo cometa en linfocitos

El análisis de fragmentación de ADN de células individuales SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis assay) para linfocitos de sangre periférica se realizó basado en la metodología de (Singh et al. 1988) con algunas modificaciones menores. Esta técnica permite diferenciar y analizar las células con ADN fragmentado y así determinar el porcentaje de fragmentación mediante software especializado.

De cada tratamiento se utilizaron 10 μ L de sangre periférica que se resuspendieron en agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% en portaobjetos pre tratados con agarosa de punto de fusión normal al 0.5%, luego se cubrió con cubreobjetos y se dejó solidificar la agarosa a 4°C por 5 minutos; los portaobjetos se colocaron en un vaso de Köplin con solución de lisis (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 10% DMSO y 1% de Tritón X 100) a un pH= 10.0, a 4 °C/2 h. Terminada la lisis las muestras se llevaron a una cámara de electroforesis horizontal y se incubaron en buffer de electroforesis (NaOH0.3 M, EDTA 200 mM) a un pH de 13.0 por 20 min a 4°C para favorecer el desenrollamiento del ADN en un cuarto oscuro, terminado el reposo se corrió, la electroforesis a 25 V (1V/cm) y 300 mA, por 20 minutos.

Posteriormente, se retiraron cuidadosamente las laminillas de la cámara de electroforesis y se enjuagaron con un buffer de neutralización (0.4 mol/l Tris-HCl, pH 7.5) por 5 minutos. Se escurrió el exceso de buffer de neutralización y se colocaron en etanol, luego se dejaron secar; una vez secas las laminillas se almacenaron para su posterior lectura. Se tiñeron con solución fluorescente de bromuro de etidio para su observación.

Los cometas de los linfocitos fueron evaluados bajo microscopio de fluorescencia (Labomed LX 400, Germay), con 30 μ L de bromuro de etidio, utilizando objetivos de 40X y 100X. Las imágenes fueron tomadas con una cámara para fluorescencia (AmScope, Microscope Digital Camara #MD700) y fueron convertidas en formato Bitmaps (*.bmp) y analizadas en el software TriTek CometScore™ Freeware v1.5.

6.1.3.2 Ensayo cometa en espermatozoides

Se realizó el análisis de fragmentación de ADN de células individuales (Single Cell Gel Electrophoresis assay) para espermatozoides extraídos de epidídimos basado en la metodología descrita por Shen et al. 2000, la cual permite diferenciar y analizar las células con ADN fragmentado de espermatozoides y determinar el porcentaje de fragmentación.

De cada tratamiento se utilizaron 5×10^5 espermatozoides/mL y se resuspendieron en agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% en portaobjetos pre tratados con agarosa de punto de fusión normal al 0.5%, se colocó un cubreobjetos y se dejó solidificar la agarosa a 4°C por 5 minutos, los portaobjetos fueron colocados en un vaso de Köplin con solución de lisis número 1 (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 10% DMSO y 1% de Tritón X 100) a un pH de 10.0, a 4 °C/4 h. Posteriormente, los portaobjetos se pasaron a solución de lisis número 2 (2.5M NaCl, 100 mM Na₂ EDTA, 10 mM Tris, 200 µg/mL de proteinasa K y 300 mM de DTT) a un pH de 7.4, a 37.5 °C/18 h.

Terminada la lisis número 2, se incubaron en buffer de electroforesis (NaOH 0.3 M, EDTA 200 mM) a un pH de 13.0 a 4 °C/10 min, en un cuarto oscuro; luego se realizó una corrida electroforética a 25 V y 100 mA/10 min. Una vez apagada la fuente de poder de la electroforesis se retiraron cuidadosamente las laminillas de la cámara de electroforesis y enjuagó con un buffer de neutralización (0.4 mol/l Tris-HCl, pH 7.5) por 5 minutos.

Se escurrieron las laminillas del exceso de buffer de neutralización y se colocaron en etanol, después se sacaron cuidadosamente y se dejaron secar; una vez secas las laminillas se guardaron hasta su posterior análisis, antes de la evaluación se tiñeron con una solución fluorescente como bromuro de etidio y se observaron al microscopio de fluorescencia.

Los cometas de las células espermáticas fueron evaluados bajo microscopio de fluorescencia (Labomed LX 400, Germay), con 30 µL de bromuro de etidio, utilizando objetivos de 40X y 100X.

Las imágenes fueron tomadas con una cámara para fluorescencia (AmScope, Microscope Digital Camara #MD700) y fueron convertidas en formato Bitmaps (*.bmp) y analizadas en el software TriTek CometScore™ Freeware v1.5.

6.1.3.3 Análisis de descondensación de cromatina

Ward en 1991, relató el papel que juegan los puentes disulfuro en la compactación de la cromatina de los espermatozoides y las diferencias que existen con respecto a la línea somática.

El DNA del espermatozoide se encuentra unas seis veces más compactado que el del cromosoma mitótico. Este DNA se encuentra organizado en bucles de menor tamaño que los de las células somáticas, anclados a la matriz nuclear, dichos bucles se compactan por la acción de las protaminas intercaladas, las cuales estabilizan rígidamente la estructura a través de la formación de puentes disulfuro entre ellas, si se rompen los enlaces disulfuro y se usa una solución específica de lisis para extraer proteínas, los bucles de DNA se relajan constituyendo halos alrededor de la estructura nuclear central residual, se ha comprobado que, tras un tratamiento ácido previo, aquellos espermatozoides con DNA fragmentado no sueltan o ven impedida en gran medida la liberación de los bucles de DNA, mostrando halos muy reducidos o ausencia de los mismos, al contrario que los espermatozoides sin fragmentación de DNA (Fernández et al. 2003)

Se estandarizó el análisis de la descondensación de la cromatina en células espermáticas basado en la técnica modificada de **SCD** (Sperm Chromatin Dispersión), descrita por Fernández y colaboradores en el 2003, la cual permite diferenciar fácilmente espermatozoides con el ADN fragmentado.

Se preparó el volumen indicado de agarosa regular al 0.65 %, previamente se trataron portaobjetos con agarosa regular al 0.65% y se secaron a 85°C. Se preparó agarosa de bajo punto de fusión al 1% a 37°C.

Se realizó una suspensión celular conteniendo de 5 a 10×10^6 cels/mL, para obtener una concentración final de 0.7 % incluida la muestra celular. Se pipeteó una alícuota de 50 μ l (muestra+agarosa) luego se depositó en las laminillas pre-tratadas agarosa al 0.65 %, posteriormente se cubrió con un cubreobjetos y se dejó solidificar a 4°C por 4 minutos, se retiró cuidadosamente el cubreobjetos y colocaron las laminillas en solución de desnaturalización (0.08 M HCl) por 7 minutos, aisladas de la luz. Terminado lo anterior, se llevaron las laminillas a la solución de lisis 1 (0.4 M Tris, 0.4 M DTT, 1% SDS, y 50 mM EDTA, pH 7.5) por 10 minutos a temperatura ambiente. Después, se continuó con el proceso de lisis en solución de lisis 2 (0.4 M Tris, 2 M NaCl, and 1% SDS, pH 7.5) por 5 minutos a temperatura ambiente. Finalizado el punto anterior, las laminillas fueron lavadas en la solución buffer Tris-Borato-EDTA (0.09 M Tris-borato y 0.002 M EDTA, pH 7.5) por 2 minutos, finalmente se deshidrataron en soluciones secuenciales de etanol de 70%, 90% y 100%, por 2 minutos en cada una.

Se dejaron secar a temperatura ambiente, finalmente se tiñeron con solución de Wright y se almacenaron hasta su visualización en microscopio de campo claro.

PARTE II

6.2.1 Material Vegetal

Poleo (*Hedeoma drummondii*, *Lamiaceae*) (Figura 2)



Figura 2. Fotos de *Hedeoma drummondii*.

La planta se colectó en el municipio de Allende, Nuevo León (México), en la localidad de Atongo de Abajo (25°21'9"N, 99°59'22"O) mediante un muestreo aleatorio al azar en un área de 100 x 100 m, durante los meses de Mayo a Julio de 2014. La identificación taxonómica la realizó la Dra. Marcela González Álvarez, del herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, donde se depositó un espécimen (número de voucher: 024244).

Reino: *Plantae*

Subreino: *Tracheobionta*

División: *Magnoliophita*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Asteridae*

Orden: *Lamiales*

Familia: *Lamiaceae*

Genero: *Hedeoma*

Especie: *H. drummondii*

6.2.1.1 Extracción del Material Vegetal

Una vez seca y triturada la parte aérea de *H. drummondii* se sometió a una extracción sólido-líquido con etanol (EtOH) al 70 % por la técnica de maceración a temperatura ambiente, utilizando una relación de material vegetal/solvente 1:10, cambiándose el solvente cada 24 horas durante tres días consecutivos, posteriormente, el extracto se filtró usando papel filtro Whatman No. 1, al filtrado se le eliminó el solvente orgánico utilizando un rotavapor con temperatura y presión reducida, y para eliminar los residuos de agua se sometió a liofilización, quedando un residuo (extracto) verde con un rendimiento del 13.5 % en peso seco.

6.2.2 Animales y tratamientos

Se utilizaron 21 ratas adultas Wistar macho, con peso de 215-230 g, las cuales fueron proporcionadas por el bioterio de la facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Coahuila, los animales permanecieron en condiciones controladas de temperatura a 25°-26°C con ciclos luz-oscuridad 12 h, dieta y agua *ad libitum*

Las ratas fueron divididas en 7 grupos, (n=3); al Grupo 1 (G1) se le administró con 100 mg/Kg de peso corporal de *H. drummondii* disuelto en PBS al 1% vía oral por 15 días cada tercer día. Al Grupo 2 (G2) se administró 10 mg/Kg de peso corporal de FA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) vía intraperitoneal por 15 días cada tercer día. Al Grupo 3 (G3) se le administró 100 mg/Kg de peso corporal de *H. drummondii* disuelto en PBS al 1% vía oral por 15 días cada tercer día, después 10 mg/Kg de peso corporal de FA vía intraperitoneal por 15 días cada tercer día. Al Grupo 4 (G4) se le administró PBS 1% vía oral por 15 días cada tercer día. Al Grupo 5(G5) se le administró con 100mg/Kg de peso corporal de Vitamina E disuelto en aceite de soya vía oral por 15 días cada tercer día; después 10 mg/Kg de peso corporal de FA vía intraperitoneal por 15 días cada tercer. Al Grupo 6 (G6) se le administró con 100mg/Kg de peso corporal de Vitamina E (Sigma Aldrich, St Luis) disuelto en aceite de soya vía oral por 15 días cada tercer día. Al Grupo 7 (G7) se le administró con aceite de soya vía oral por 15 días cada tercer día.

Trascurrido el tiempo de exposición los animales de estudio fueron sacrificados por el Médico Veterinario Zootecnista encargado del bioterio de la Facultad de Medicina, se llevó a cabo el sacrificio por dislocación cervical, se extrajeron muestras sanguíneas por punción cardíaca, los testículos fueron retirados y fijados en solución fresca de Bouin para su posterior análisis histopatológico, así también las células espermáticas fueron obtenidas de los epidídimos.

Para realizar los análisis correspondientes, se llevaron a cabo las mismas determinaciones mediante las técnicas descritas en la primera parte de este trabajo. En la figura 3 se muestra un diagrama esquemático con la estrategia general.

6.3 Análisis estadístico

El programa estadístico SPSS 20.0 para Windows fue usado para el análisis de las variables estudiadas, todos los datos presentan media (\pm) y desviación estándar (SD), prueba de ANOVA de una vía (ANOVA one way) y análisis Tukey (HSD) como prueba Post-Hoc para comparar los valores de entre los grupos. Para todas las pruebas se consideró un valor de $P \leq 0.05$ como estadísticamente significativo.

Adicionalmente se realizó un análisis de correlación bivariada de Pearson, para inferir sobre la intensidad de la relación entre las variables independientes y variables dependientes.

6.4 Variables

6.4.1 Variables dependientes

Se consideraron como variables dependientes a la calidad espermática, daño al ADN en linfocitos y espermatozoides así como el daño histológico en testículo.

6.4.2 Variables Independientes

Se consideraron como variables independientes a la concentración de formaldehído y la concentración de los antioxidantes administrados.

6.5 Estrategia Experimental.

En la figura 3 se muestra un diagrama de la estrategia general de los procedimientos realizados en los experimentos

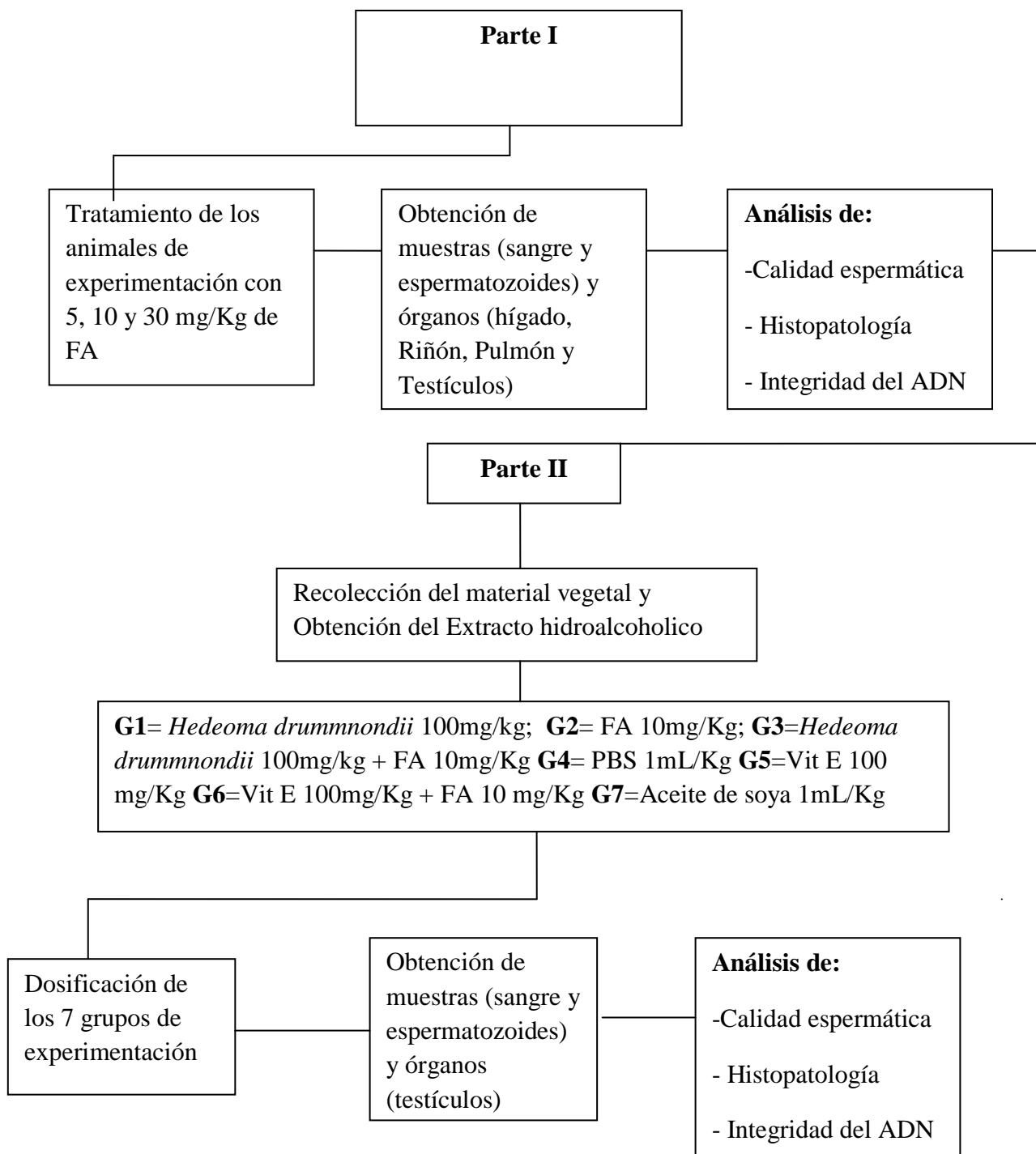


Figura 3.- Diagrama esquemático que resume la estrategia general del trabajo.

7 RESULTADOS

Parte I

En la primera parte del presente trabajo demostramos el daño ocasionado por formaldehído a diferentes dosis 5,10 y 30 mg/Kg, donde observamos que el daño producido depende de la dosis. Nosotros seleccionamos la dosis de 10 mg/Kg para la segunda parte de los experimentos ya que resultó dañina a nivel genotóxico pero tuvo baja toxicidad para los animales de experimentación en comparación de los daños ocasionados por la dosis de 30mg/Kg.

Dentro de los hallazgos más importantes destaca la disminución de la calidad espermática (concentración y % de motilidad en células espermáticas), el efecto a nivel histopatológico en testículos (degeneración del epitelio) y el daño genotóxico en linfocitos y espermatozoides, los cuales describimos en detalle a continuación.

7.1 Análisis de la Calidad espermática

7.1.1 Concentración espermática

Se realizó el análisis de espermatozoides de epidídimo, la concentración se expresó en 1×10^6 /mL, donde encontramos que comparado con los animales control sin tratamiento, el FA reduce la concentración espermática en todos los grupos (figura 4) y el efecto es dependiente de la dosis siendo más notable en la dosis de 30 mg/Kg de FA. Se observaron diferencias significativas en la concentración de espermatozoides entre los animales del grupo tratado con la dosis más alta en comparación con el grupo control con una $P < 0.05$, siendo estadísticamente significativa la comparación

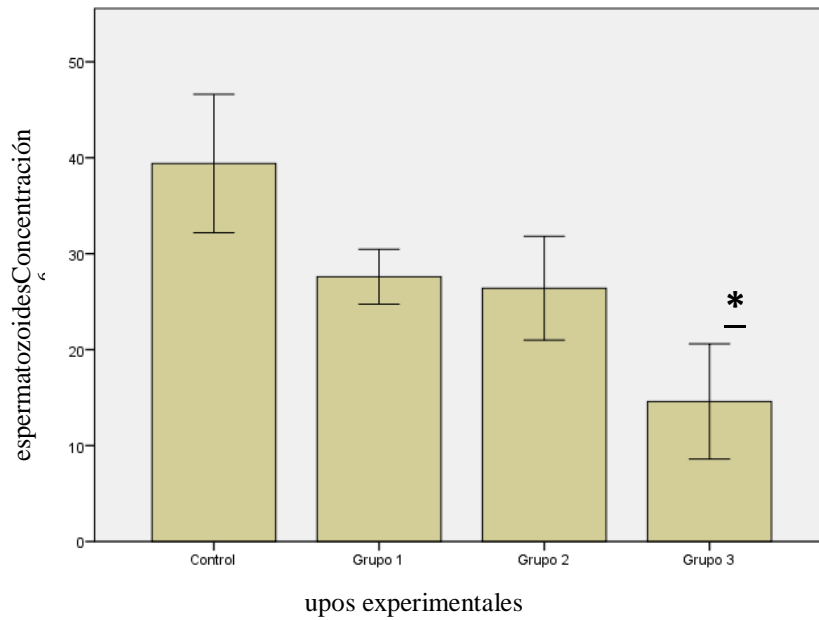


Figura 4.- Efecto del formaldehído sobre la concentración espermática en los grupos tratados.

7.1.2 Motilidad espermática

El porcentaje de movilidad de los espermatozoides en el grupo control (GC) fue de 45.60 ± 9.99 , mientras que para los grupos tratados fue de $2.8 \pm .837$, $1.0 \pm .57$, $0 \pm 0\%$ (G1, G2 y G3 respectivamente). Como puede observarse en la figura 5, el FA disminuyó notablemente la motilidad del espermatozoide de todos los grupos; ésta disminución es directamente proporcional a la concentración de FA administrada. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la motilidad de los espermatozoides entre los cuatro grupos $P < 0.01$ y la prueba post hoc de Tukey confirmó estas diferencias.

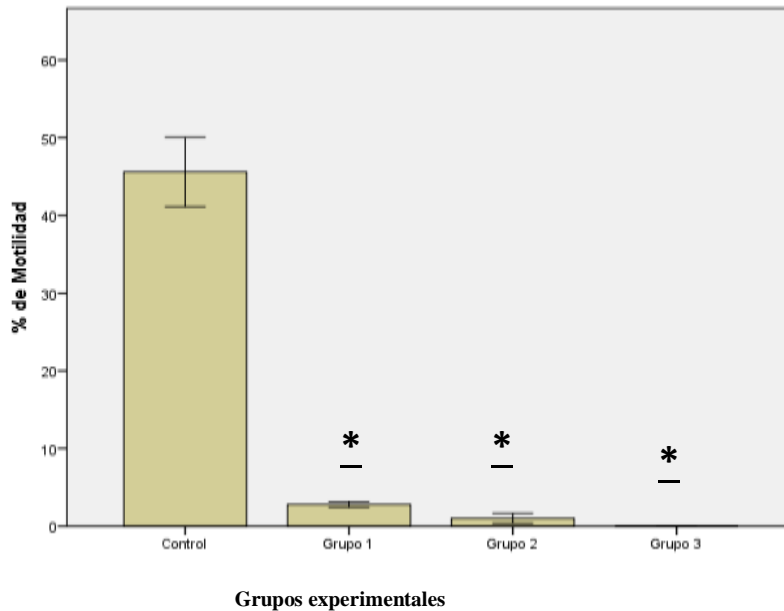


Figura 5.- Efecto del formaldehido sobre la motilidad espermática en los grupos tratados

7.2 Análisis Histopatológico

El análisis histopatológico de hígado, riñón, cerebro y pulmones de los diferentes grupos experimentales no mostró daño histológico. Solamente se observó congestión vascular sistémica en los grupos tratados con diferentes concentraciones de FA, en relación con los órganos provenientes de los animales control.

El efecto más notable fue en el tejido testicular; sin embargo, es importante señalar que las alteraciones morfológicas observadas en los tejidos de animales tratados con 5 y 10 mg / Kg de peso corporal de FA mostraron daño de leve a moderado.

En cambio, en los animales tratados con 30 mg/ Kg de FA, hubo una marcada disminución en el número de espermatozoides y la morfología de la mayoría de los túbulos seminíferos se alteró. En la figura 6 se describen y señalan los hallazgos morfológicos representativos de os grupos tratados con FA.

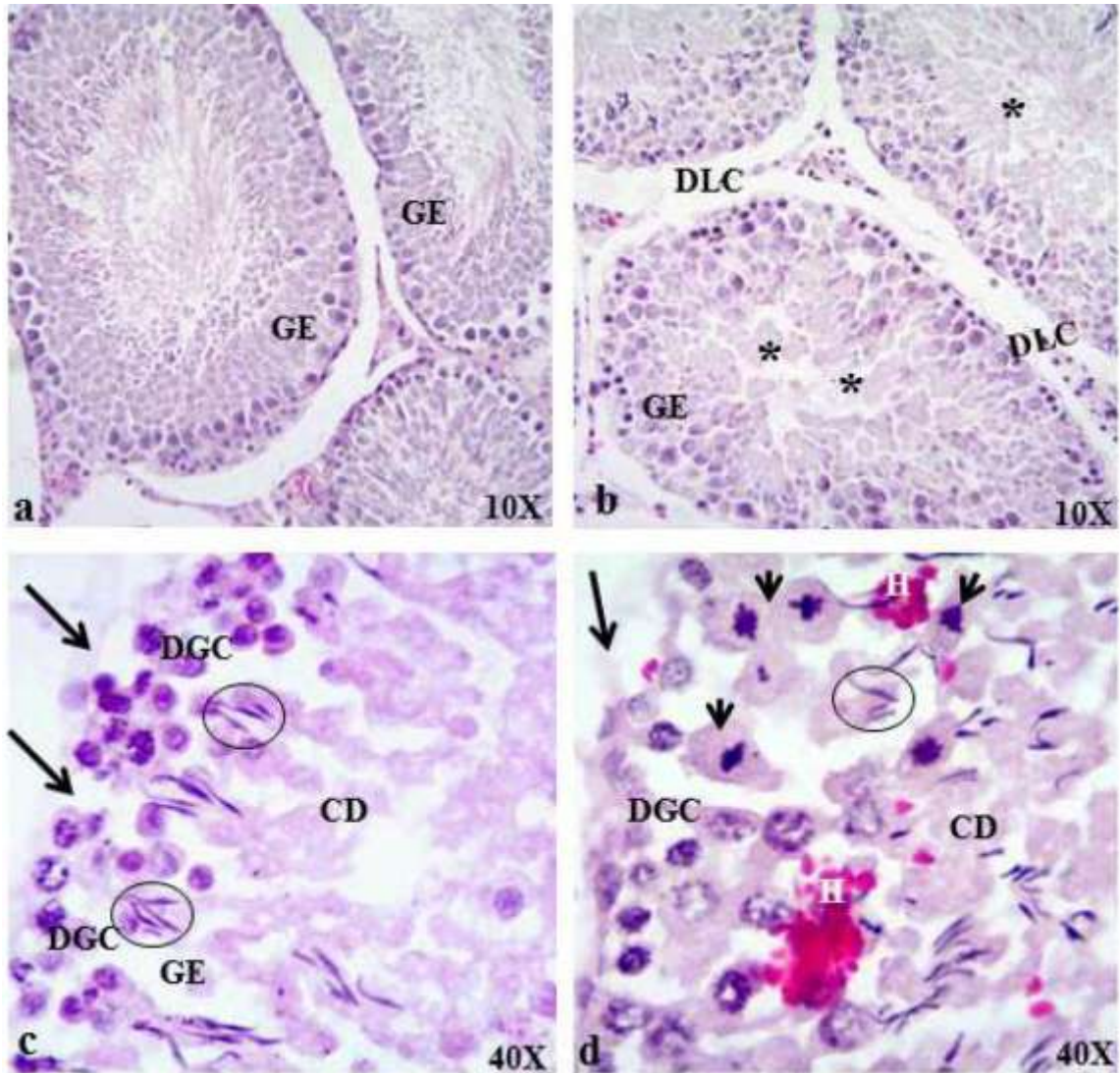


Figura 6.- Efectos del Formaldehído en tejido testicular.

En comparación con el grupo control (a), no se encontraron cambios histopatológicos significativos en los grupos tratados con FA. El efecto más notable observado fue el grupo 3, tratado con 30 mg/Kg de peso corporal de FA (b) donde pueden observarse alteraciones morfológicas en el epitelio germinal (GE) las cuales consistieron en la degeneración de las células germinales (DGC) y de las células de Leydig (DLC), así como depósitos de material amorfo proteináceo en el lumen de la mayoría de los túbulos seminíferos (*). En este mismo grupo (30mg/Kg de FA), pero a mayor aumento (c) y (d) se observa la muerte celular (CD), espermatogénesis alterada y mitosis atípicas (flechas pequeñas), hemorragia (H), disminución de la cantidad de

células de espermáticas (círculos), y alteración de la membrana basal de la túbulo seminíferos (flechas). Tinción H&E 40X.

7.3 Análisis de Fragmentación del ADN inducida por formaldehído

7.3.1 Fragmentación del ADN en linfocitos

Cuando se realizó el ensayo cometa alcalino, se detectó un aumento de rupturas de la cadena de ADN como grandes cantidades de ADN que migran fuera del núcleo, hacia la cola del cometa (Figura 7). La extensión de la migración del ADN en los cometas dependió directamente a la dosis de FA. Para el grupo control el porcentaje de daño en el ADN fue 6,79%, mientras que para los grupos 1, 2 y 3 los porcentajes fueron de 14,83%, 15,93% y 44,58%, respectivamente.

Cuando los grupos experimentales se compararon con el grupo control, se observó genotoxicidad significativa en todos los 3 grupos expuestos a FA (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación estadística del daño en el ADN inducido por formaldehído en los linfocitos

Comparación entre grupos	Daño en ADN de linfocitos (valor de P)
Control vs Grupo 1	0.572
Control vs Grupo 2	0.998
Control vs Grupo 3	0.001*
Grupo 1 vs Grupo 2	0.998
Grupo 1 vs Grupo 3	0.001*
Grupo 2 vs Grupo 3	0.001*

*Significativo para un valor de $P < 0.001$

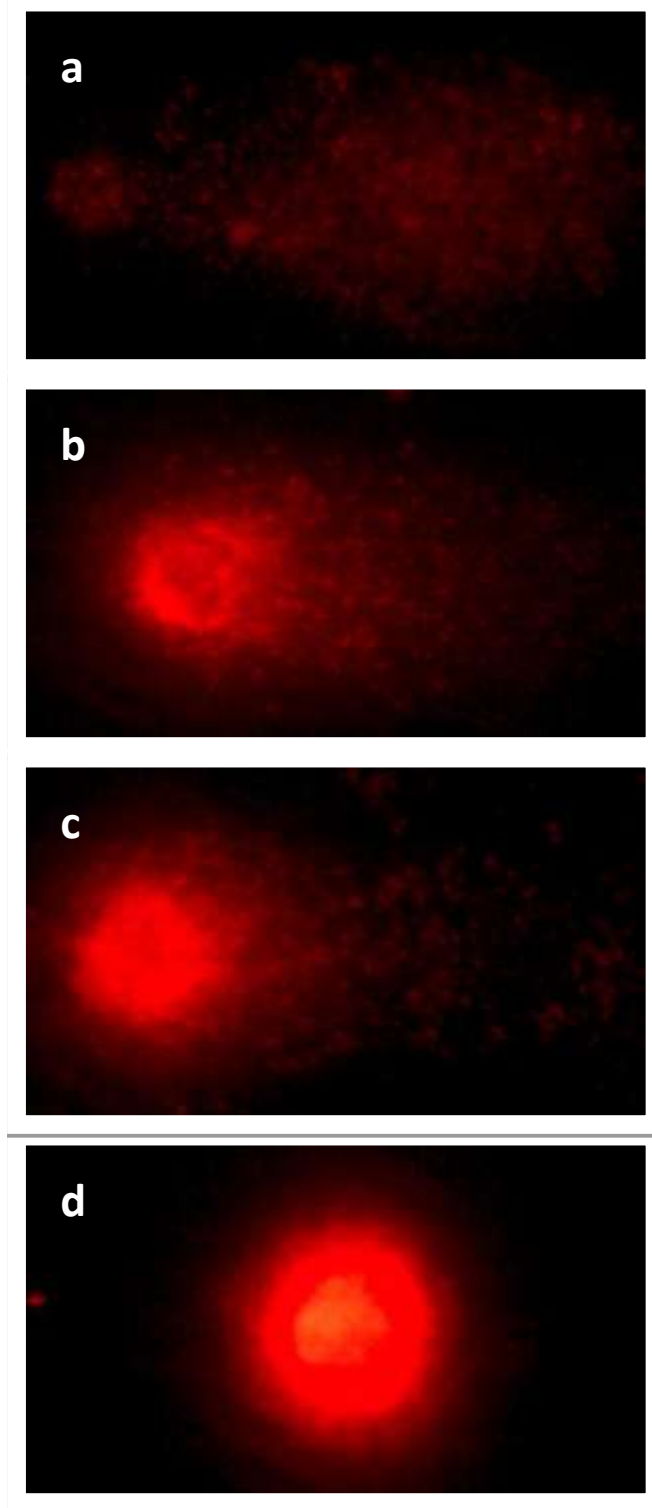


Figura 7.- Escala de daño en linfocitos de ratas tratadas a diferentes dosis de FA. Fotografías representativas. a) Célula con ADN dañado corresponde al grupo tratado con 30 mg/Kg de FA; b) grupo tratado con 10 mg/Kg; c) grupo tratado con 5 mg/Kg de FA; d) grupo control. Tinción con bromuro de etidio. Microscopía de fluorescencia. 40X.

7.3.2 Fragmentación del ADN en espermatozoides

De manera similar a los linfocitos, la migración de ADN del núcleo hacia la cola del cometa se ve claramente en los espermatozoides (Figura 8). El daño al ADN es completamente diferenciado en los grupos 1, 2 y 3 que se trataron con FA vs el daño en el ADN del grupo de control. Los valores de la fragmentación del ADN para el grupo de control, y los grupos 1, 2 y 3, fueron 14.74 ± 0.90 , 23.78 ± 3.27 , 27.55 ± 0.98 , y 32.08 ± 2.80 , respectivamente (Tabla 2). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de daño en el ADN de los espermatozoides de los grupos 1, 2 y 3, en comparación con el control ($P < 0.0001$). Además, hubo una diferencia estadística en el daño al ADN espermático entre los grupos 1 y 3 ($P < 0.0001$) y entre los grupos 2 y 3 ($P = 0,027$), (Tabla 4).

En resumen, los linfocitos y los espermatozoides de las ratas del grupo control no mostraron daño (cola del cometa) figura 8. En el caso de los linfocitos de los animales expuestos, no se observa daño con la concentración de 5 mg/Kg de peso corporal de FA (Fig 8c.); las colas de cometa fueron evidentes sólo a dosis de 10 y 30 mg/Kg de FA (Fig. 8b y 8a). Sin embargo, los espermatozoides fueron más sensibles al efecto tóxico de FA porque el daño al ADN era evidente incluso a 5 mg/Kg de peso corporal de FA (Fig. 8c), y fue notablemente superior a las dosis de 10 y 30 mg/Kg de FA (Fig. 8b y 8a).

Tabla 2.- Fragmentación de ADN en espermatozoides de ratas Wistar en los grupos tratados

Grupo	% de ADN en el Núcleo de cometas de Espermatozoides
P < (control vs. Grupo 1)	0.0001*
P < (control vs. Grupo 2)	0.0001*
P < (control vs. Grupo 3)	0.0001*
P < (Grupo 1 vs. Grupo 2)	0.075
P < (Grupo 1 vs. Grupo 3)	0.0001*
P < (Grupo 2 vs. Grupo 3)	0.027*

*La diferencia de medias son significativas para un valor de $P < 0.05$

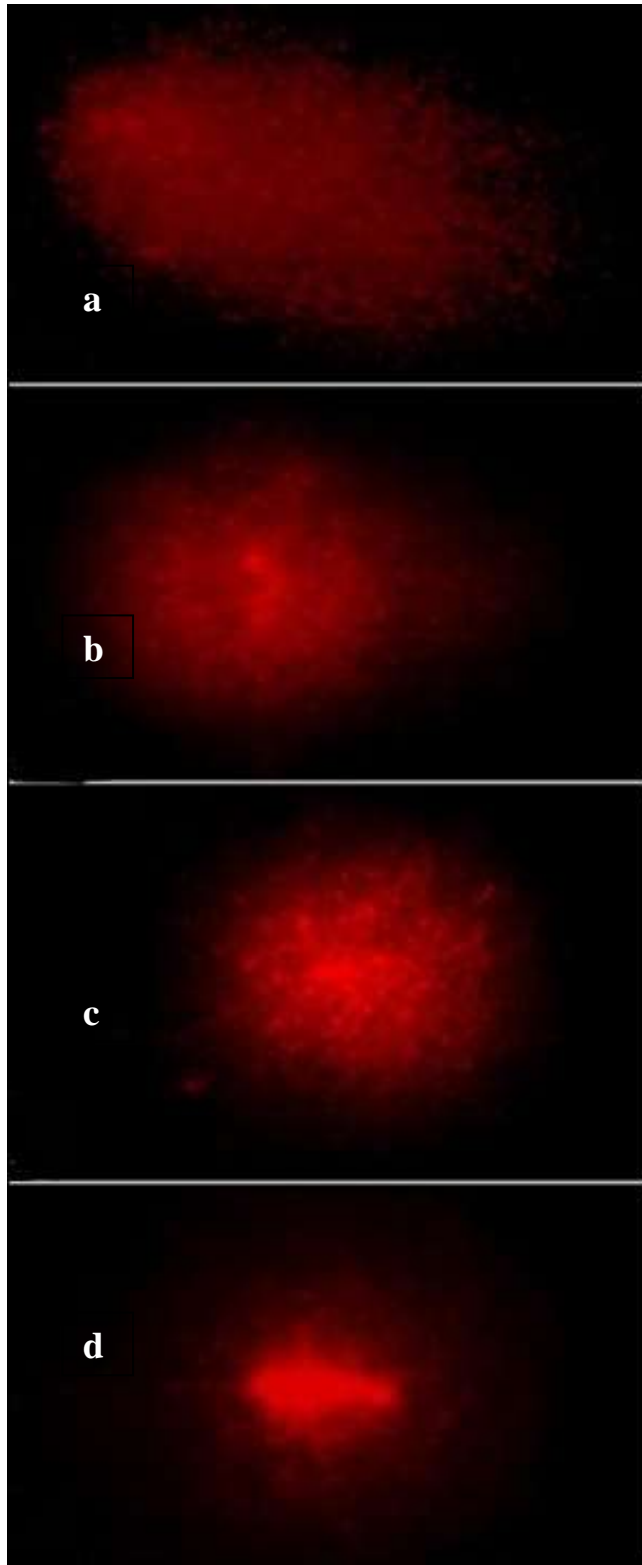


Figura 8.- Escala de daño en el ADN de espermatozoide de rata tratadas a diferentes dosis de FA, a) dosis de 30mg/Kg; b) dosis de 10mg/Kg; c) dosis de 5mg/Kg; d) Solución fisiológica. Tinción con bromuro de etidio. Microscopía de fluorescencia. 40X.

Resultados

Parte II

7.4 Análisis de la Calidad Espermática

7.4.1 Concentración espermática

Se realizó el análisis de espermatozoides de epidídimo, la concentración se expresó en $1 \times 10^6/\text{mL}$, donde encontramos que el FA reduce la concentración espermática de manera similar a los resultados encontrados en la primera parte de esta investigación con la dosis de 10mg/Kg de FA.

En esta parte del proyecto se observó homogeneidad en cuanto a la calidad espermática en los grupos que utilizamos como controles negativos de daño (G1, G4, G6 y G7), los valores reflejan una tendencia normal como lo muestra la figura 9; por otra parte en los grupos tratados con *H. drummondii* +FA (G3) y Vitamina E +FA (G5), se observaron resultados similares. Estadísticamente esta última combinación mostró un mejor efecto benéfico ante el daño provocado por el formaldehído, sin embargo, desde el punto de vista histopatológico, *H. drummondii* preservó mejor la morfología testicular, como puede observarse en la figura 13. En la figura 10 mostramos la comparación entre los grupos de interés G3 y G5 comparado con el grupo tratado con FA (G2) siendo estadísticamente significativo con una $P < 0.05$

De acuerdo a la descripción comparativa entre los grupos 3 y 5 *versus* el grupo positivo de daño, los resultados reflejan que grupos tratados con los vehículos (PBS y aceite de soya) y con solo los antioxidantes (*H. drummondii* y Vit. E) no mostraron efectos adversos en los parámetros que evaluamos.

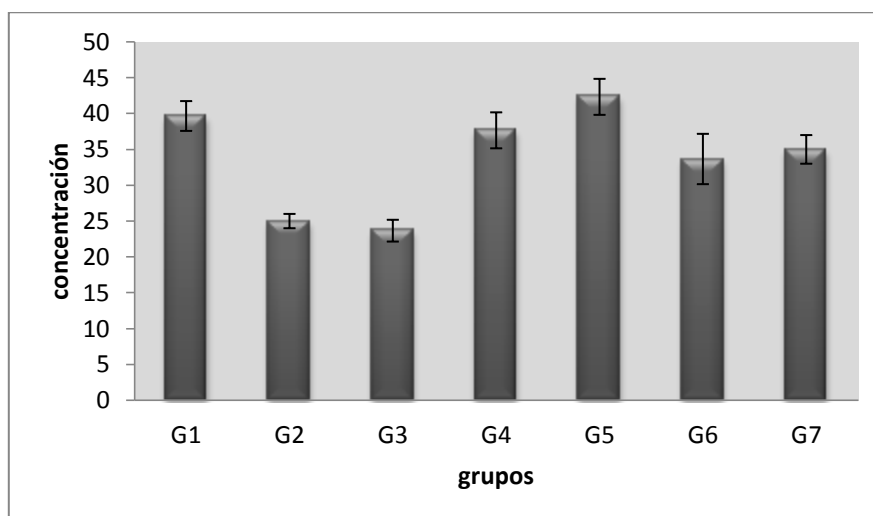


Figura 9.- Concentración espermática de los grupos con diferentes tratamientos

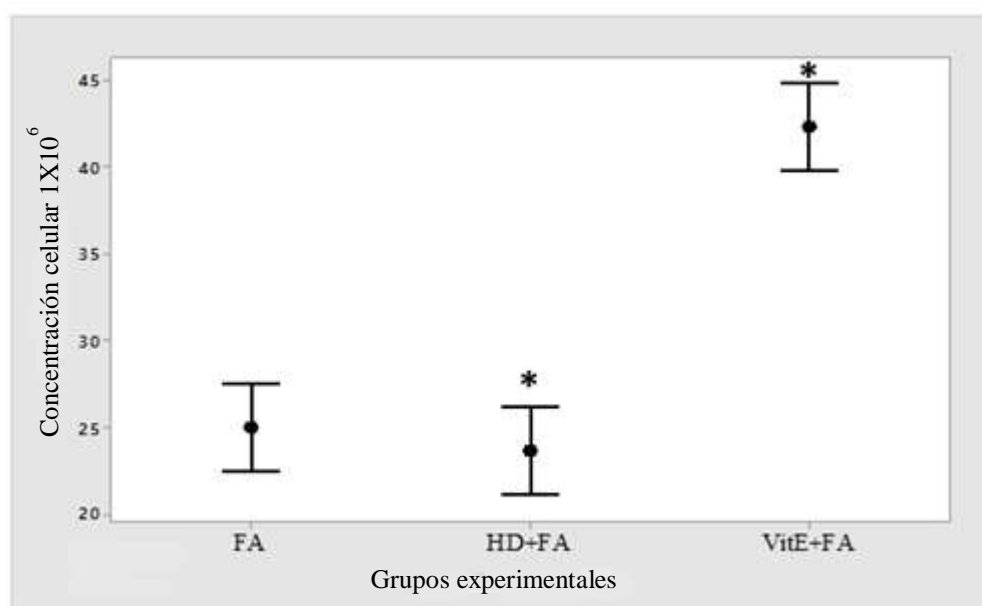


Figura 10.- Concentración espermática en los grupos tratados con antioxidantes Vs grupo positivo de daño (FA), P<.05

7.4.2 Motilidad espermática

En cuanto al porcentaje de la motilidad espermática, observamos una tendencia similar a la de la variable de concentración ya que los grupos que se esperaban como negativos de daño (G1, G4, G6 y G7) mostraron resultados muy similares entre sí, mientras que G3 tratado con *H. drummondii* + FA mostró mejoría en este parámetro en

comparación con G2 tratado solo con FA, mientras que G5 tratado con Vit E + FA resultó ser mejor que el tratamiento administrado en G3 que tuvo un promedio de 29.22 ± 4.04 en comparación con el promedio del G5 que tuvo un promedio de 41.33 ± 1.15 .

En la figura 12 mostramos los valores de los promedios y desviación estándar de los diferentes grupos, mostrando mejores resultados en el tratamiento con Vit E + FA (G5), aun y cuando se observó mejor resultado con el tratamiento de Vit E se muestran diferencias estadísticamente significativas al hacer la comparación de los grupos G3 (29.22 ± 4.04) y G5 (41.33 ± 1.15) contra el G2 (29.66 ± 1.52), en la figura 11 se muestra la comparación entre los grupos siendo el valor de $P < 0.5$.

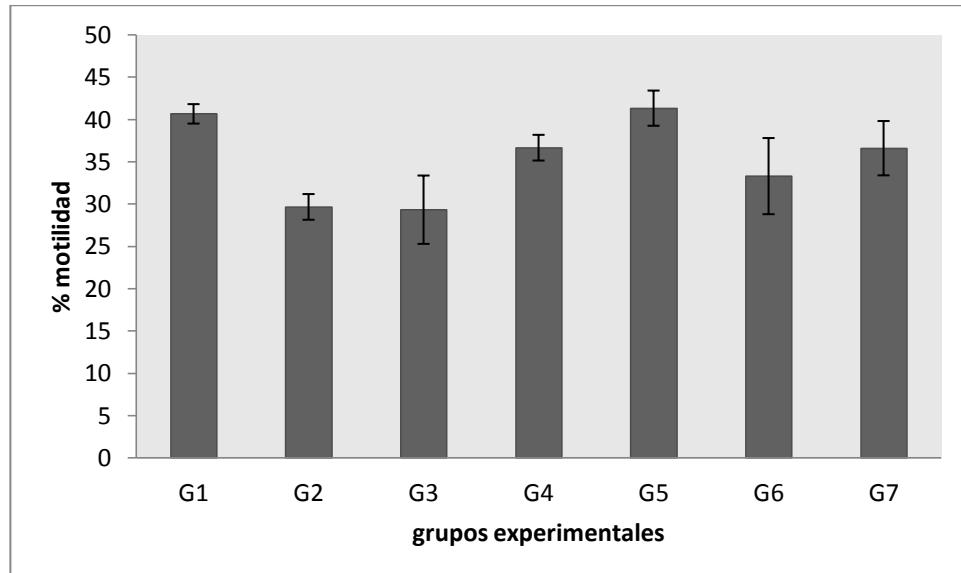


Figura 11.- Porcentaje de motilidad espermática en los grupos tratados

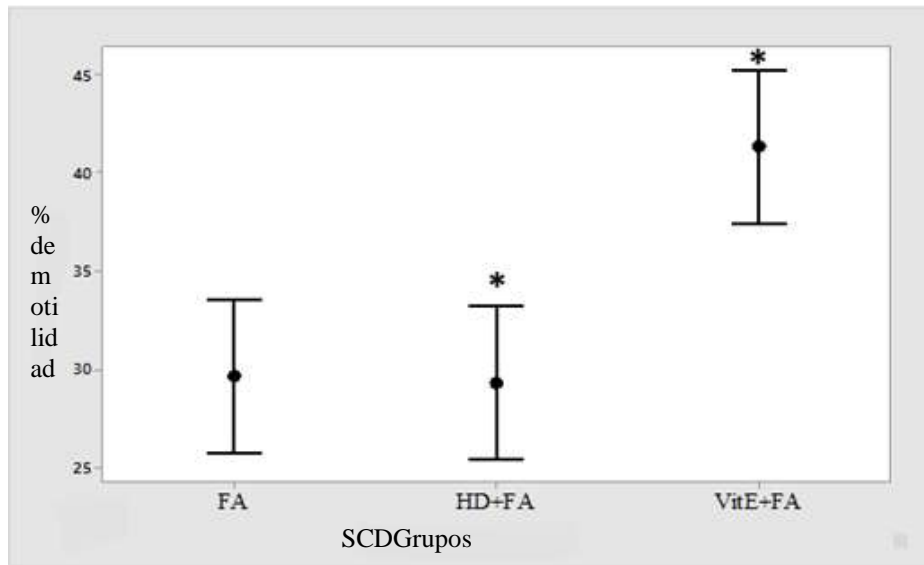


Figura 12.- Significancia del parámetro de % de motilidad espermática entre G3 y G5 Vs G2 $P < .05$

7.5 Análisis histopatológico

Los resultados de los análisis histológicos se muestran en la figura 13, donde se muestran hallazgos importantes

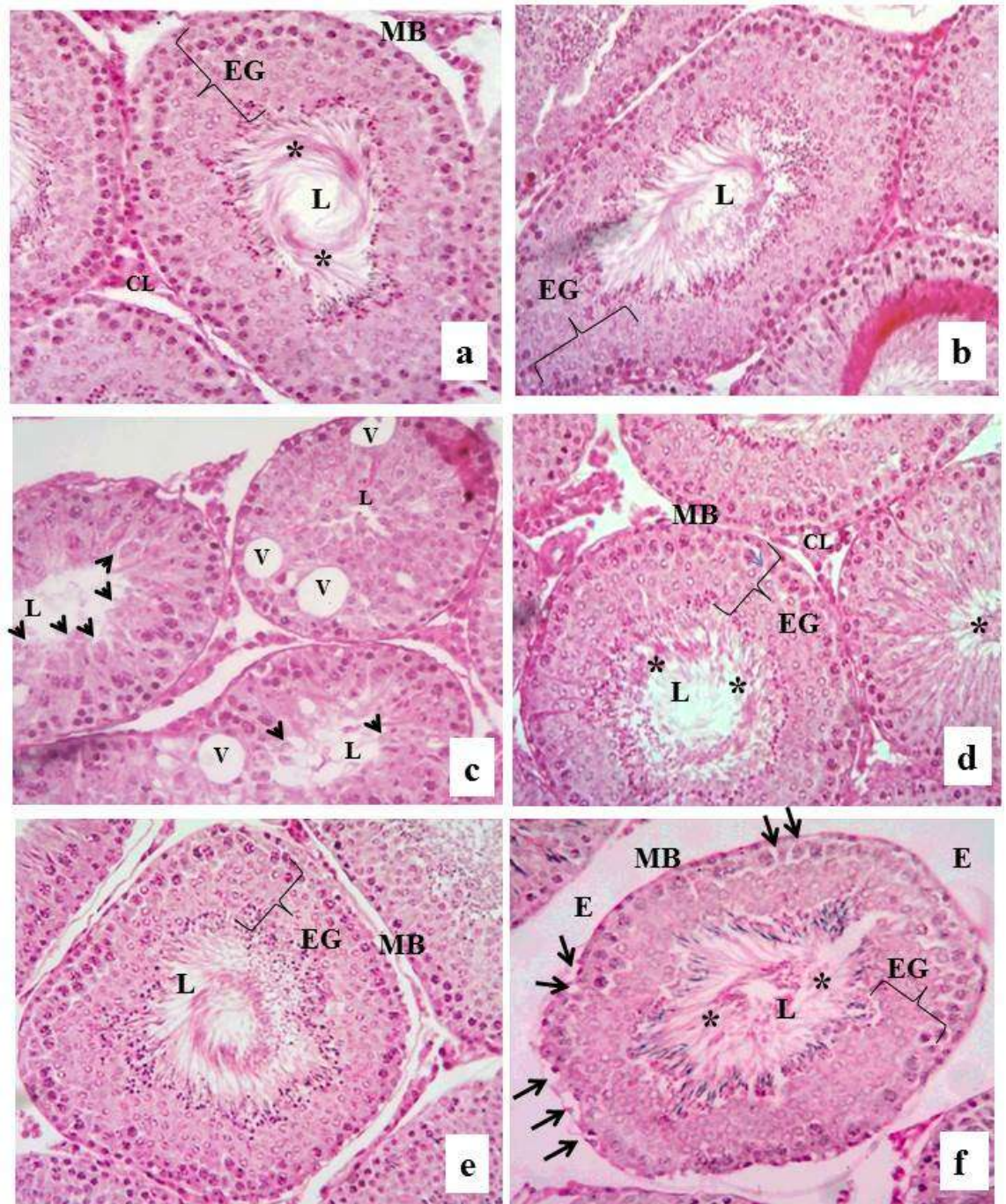


Figura 13.- Efecto protector de *Hedeoma drummondii* sobre el daño morfológico inducido por formaldehído a nivel testicular en ratas Wistar

Figura 13.- **a)** Control sin tratamiento (PBS). Se observa la estructura normal de los túbulos seminíferos con su membrana basal intacta (MB), capas de epitelio germinal (EG) con maduración normal, células de Leydig (CL) entre cada túbulo y cantidad adecuada de espermatozoides (*) en el lumen tubular (L); **b)** *Hedeoma drummondii*. Al igual que en el control normal, se observa la estructura conservada de los túbulos seminíferos, con adecuada maduración del epitelio germinal y de la espermatogénesis. **c)** Formaldehído. En las muestras provenientes de animales tratados con 10 mg/Kg de formaldehído se observa atipia celular y desorganización del epitelio germinal, así como la presencia de múltiples vacuolas de gran tamaño (V), presencia de células necróticas intraluminales (cabezas de flecha), disminución del diámetro del lumen de los túbulos y marcada reducción, o casi nula, presencia de espermatozoides. **d)** *Hedeoma drummondii* + FA. La administración de 100 mg/Kg del extracto etanólico de *H. drummondii* antes del tratamiento con FA previno el daño morfológico inducido por el FA en el tejido testicular. Comparado con el control sin tratar, se pueden observar epitelio germinal con maduración adecuada, espermatogénesis conservada y adecuada cantidad de espermatozoides intraluminales. **e)** Vitamina E. En las muestras de animales tratados solamente con vitamina E como control, también se observan las capas de epitelio germinal normales y adecuada cantidad de espermatozoides en el lumen tubular. **f)** Vit E + FA. El efecto protector de la vitamina E (100 mg/Kg) administrada previamente a un grupo de animales tratados con FA es menor que el observado con *H. drummondii*. A diferencia del grupo que recibió el extracto, aún es posible observar pequeñas vacuolas anormales en la unión de la membrana basal (flechas), así como un mayor espacio (E) de separación entre los túbulos seminíferos, no obstante, la maduración de las células germinales en las capas del epitelio al interior del túbulo se encuentran conservadas, así como la espermatogénesis. H Y E (40X).

7.6 Análisis de Fragmentación del ADN

7.6.1 Integridad del porcentaje de ADN en el núcleo de linfocitos

La forma de esquematizar el daño mediante la técnica de ensayo cometa es representado por un aumento de fragmentos del ADN que migran fuera de las células del núcleo bajo una forma característica similar a la cola de un cometa (Sing et al. 1988).

En la figura 14 mostramos imágenes con fluorescencia (a y c), y como se evalúan mediante el software de estas mismas imágenes transformadas en mapa de bits (b y d) y evaluadas con el software TriTek CometScore™ Freeware v1.5. El software mide la migración del ADN hacia el polo positivo, haciendo una escala de medición donde mide la cantidad de ADN contenido en la cabeza y en la cola del cometa. Una célula considerada con ADN íntegro debe contener el 100% en la cabeza del cometa.

El promedio de integridad del núcleo de los linfocitos en los diferentes grupos tratados lo podemos observar en la figura 15, donde en los grupos utilizados como controles negativos de daño y con los vehículos en los cuales administramos la vitamina E y el extracto hidroalcohólico de *H. drummondii*. Se puede observar más del 90% de integridad contra el grupo positivo de daño que fue de 80% de integridad, en la figura 16 se ve la comparación del G3 (*H. drummondii* + FA) y G5 Vit E y + FA, resultando estadísticamente significativa con una $P < 0.5$, el grupo 3 y 5 contra el grupo tratado con FA, mostraron una protección del 10% y 14% más que el grupo tratado con FA

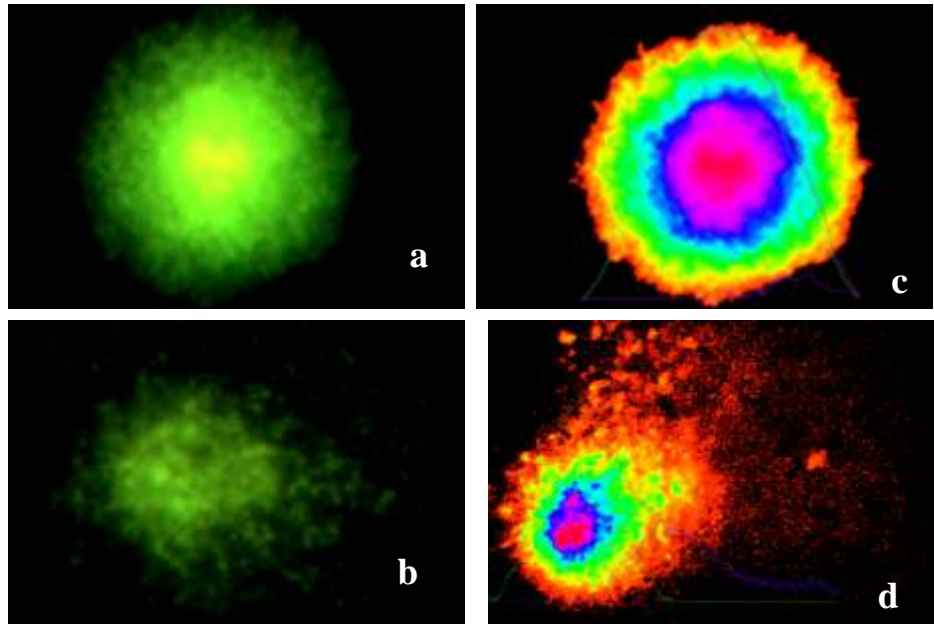


Figura 14.- Comparación esquemática de linfocitos de rata fotografía con microscopía de fluorescencia (a y b) y con la visualización del software TriTek CometScore™ Freeware v1.5(c y d)

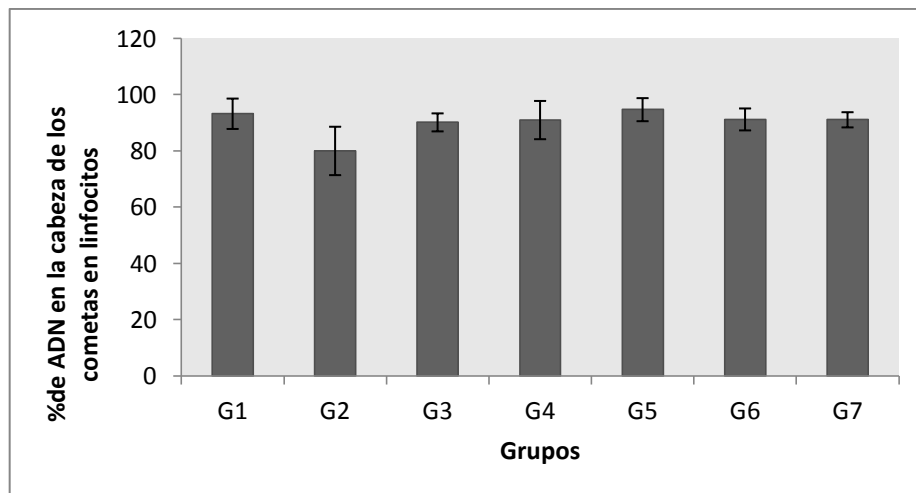


Figura 15. - Porcentaje de ADN en la cabeza de los cometas en los grupos tratados

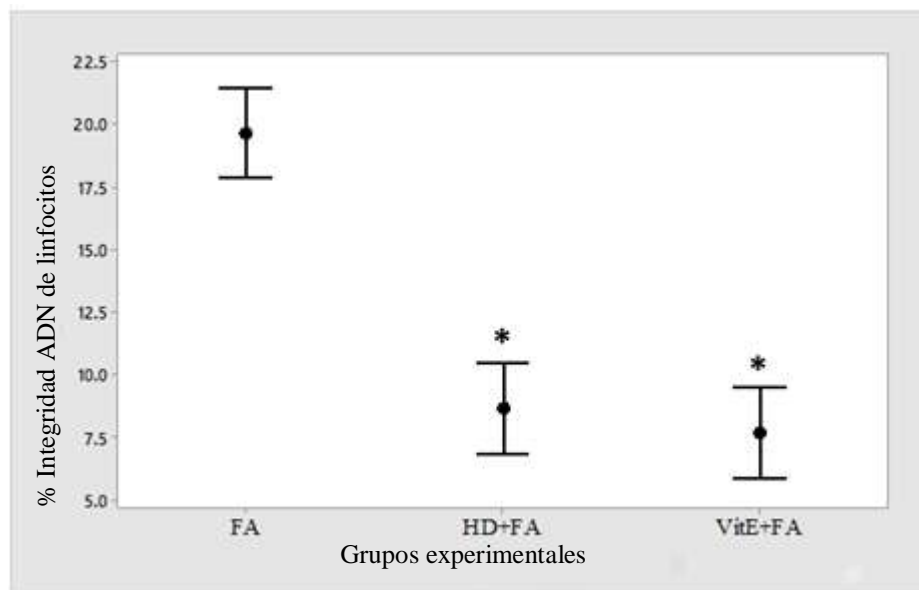


Figura 16.- % de integridad en el ADN en la cabeza de los cometas de grupos tratados con antioxidantes Vs grupo positivo de daño (FA), $P < .05$

7.6.2 Integridad de AND en Espermatozoides por ensayo cometa.

La integridad en espermatozoides se evaluó mediante las técnicas de ensayo cometa y descondensación de cromatina (SCD), en la primera evaluamos la integridad de porcentaje de ADN contenida en el núcleo celular, mientras que la técnica de SCD mide el porcentaje de fragmentación del ADN en cada célula evaluada

En la figura 17 podemos observar el porcentaje de integridad en el núcleo espermático evaluado por ensayo cometa. En esta parte del proyecto observamos que la integridad del ADN disminuyó en la misma dosis administrada en el primer parte del presente trabajo (10mg/Kg), el porcentaje de ADN de la cabeza de los cometas fue de 71.64% de ADN.

El grupo 2, tratado con FA (10mg/Kg) tuvo daño con un promedio de porcentaje de integridad de 66 ± 11.28 , el tiempo de exposición fue mayor en esta parte ya que se administró por 15 días cada tercer día, mientras que el G3 (H. drummondii + FA) y G5 (Vit E + FA) tuvieron un efecto protector importante para la prueba de ensayo cometa

con 80 ± 12.5 y 90.09 ± 5.6 respectivamente, siendo estadísticamente significativa ($P < 0.05$) la comparación para ambos grupos contra el grupo de control positivo de daño (Figura 18).

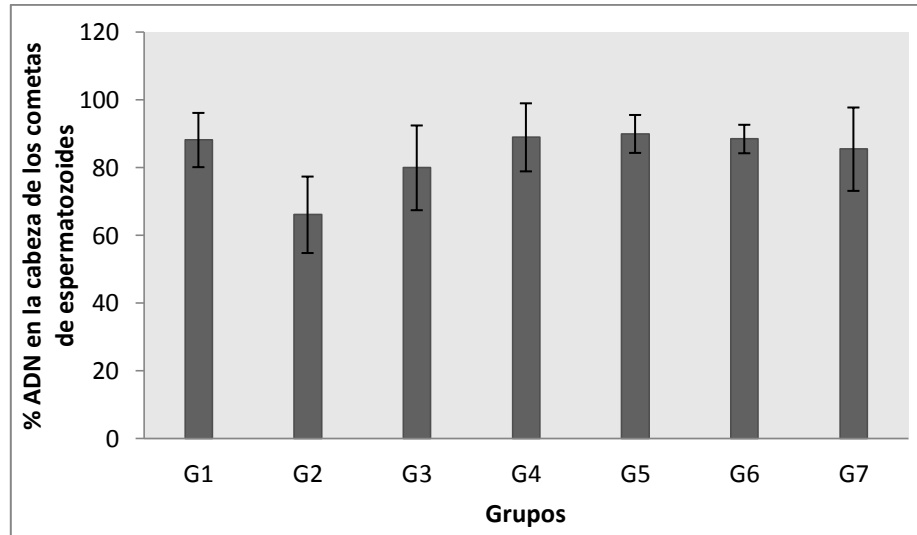


Figura 17.- Porcentaje de ADN en la cabeza de los cometas de los grupos tratados, evaluada por ensayo cometa

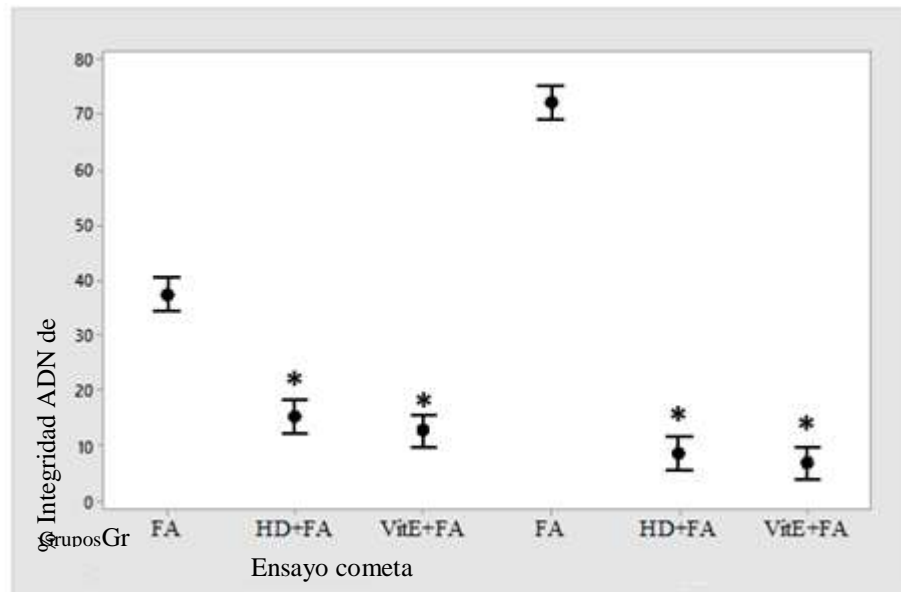


Figura 18.- Fragmentación en espermatozoides por la técnica de ensayo cometa y SCD

7.6.3 Evaluación por la técnica de descondensación de cromatina (SCD).

Evaluamos la fragmentación del ADN de los espermatozoides por una segunda técnica, descondensación de cromatina; esta técnica representa el contrario de la técnica de ensayo cometa donde el 0% representa que la cromatina se encuentra intacta. En la figura 20 podemos observar ejemplos de células con ADN fragmentado y sin fragmentar.

Los resultados los podemos observar en la figura 19, donde se aprecia que en el grupo 2 (G2) tratado con FA, el porcentaje de fragmentación fue de 72.25 ± 3.84 , lo cual se considera elevado, según Fernández et al. (2003) mientras que en los grupos 3 (G3) y grupo 5 (G5) los valores fueron $8.6 \pm .38$ y 6.8 ± 2.02 respectivamente, dando un efecto protector importante en el grupo tratado con *H.drummondii* de manera similar al tratamiento con Vitamina E.

Los resultados fueron estadísticamente significativos al hacer la comparación del G3 y G5 contra el control con la $P < 0.05$.

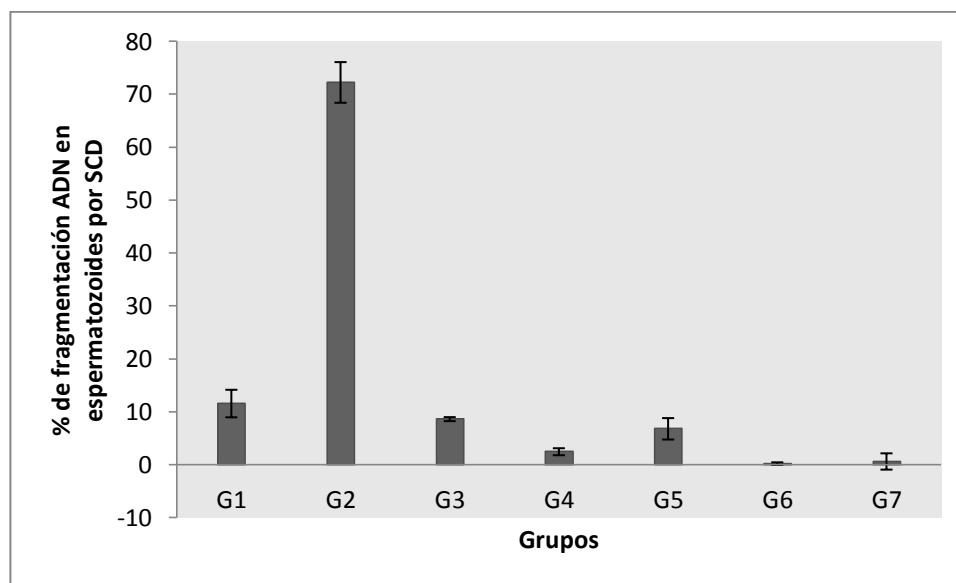


Figura 19.- Porcentaje de Fragmentación de ADN en espermatozoides, evaluada por la Técnica de Descondensación de cromatina

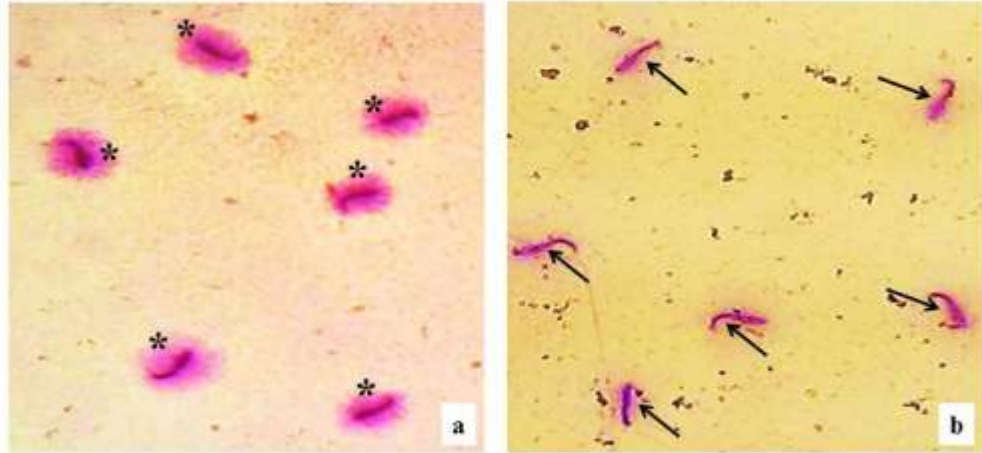


Figura 20.- Fragmentación del ADN inducida por formaldehído en espermatozoides de rata Wistar. a) Espermatozoides con ADN fragmentado (asteriscos) muestran descondensación de la cromatina alrededor del núcleo.; b) Espermatozoides con ADN No fragmentado muestran descondensación de la cromatina alrededor del núcleo (flechas).

8 DISCUSIÓN

Los resultados de la primera parte de nuestra investigación muestran el efecto genotóxico del formaldehído (FA) sobre el ADN de linfocitos de sangre periférica y espermatozoides en el modelo utilizado. Las dosis y tiempo de exposición utilizados en este trabajo indican que el FA induce en poco tiempo rompimiento en el ADN de las células, mostrando el grado de genotoxicidad, así como disminución en la calidad espermática (concentración y motilidad) y degeneración en el epitelio germinal testicular. Suponemos que el daño al ADN de estos dos tipos de células puede estar asociado a la formación de aductos de ADN y a estrés oxidativo, como ha sido descrito (Saito et al.2005). En estudios previos se ha reportado que factores importantes tales como la calidad espermática y daño en el tejido testicular influyen en la integridad y la estabilidad de la célula espermática. Estos parámetros son alterados por la exposición al formaldehído; por ejemplo Shah et al en 1987 reportaron que en ratas de experimentación tratadas con dosis 8, 16 mg/Kg/día, por vía intraperitoneal encontraron afectos adversos a nivel testicular, mientras que Majumder y Kumar 1995 encontraron que a dosis de 10 mg/Kg de FA por 30 días en ratas macho albino Wistar, hubo una importante disminución en la viabilidad y motilidad espermática en comparación con el grupo control además bajo contenido de ADN en tejido testicular y próstata.

Por otro lado, se ha reportado que el FA a dosis de 0.20 a 20.00 mg/kg inducen daño en células germinales de ratas macho Wistar, mostrando toxicidad y el daño al material genético; los principales cambios patológicos reportados fueron degeneración en el tejido testicular, disminución en la concentración espermática y morfología espermática alterada (Tang et al., 2003), estos resultados son similares a los reportados previamente por nosotros (Betancourt-Martínez et al. 2015). En otra investigación realizada con 150 ratas que fueron intoxicadas por vía intraperitoneal con FA en concentraciones de 2.5, 5, 7.5 y 10 mg/kg en un periodo de 40 días, se reportaron efectos en el peso corporal, en el índice gónado-somático, reducción en la fertilidad, disminución de la motilidad y viabilidad espermática, sugiriendo que el FA puede afectar algunas las funciones testiculares (Zahra et al. 2007).

Por su parte, Golalipour et al. 2007, reportaron que la inhalación de FA produce una deficiencia en el sistema antioxidante testicular e incremento en la peroxidación lipídica en los testículos productos del malondialdehído (MDA) en los testículos de ratas expuestas a FA. El MDA es uno de los más importantes productos de la peroxidación lipídica y en la interferencia con proteínas en la biosíntesis formando aductos con el ADN, ARN y proteínas, esto sugiere que el estrés oxidativo es un importante mecanismo de daño celular: también nuestros resultados indican que el FA es genotóxico de acuerdo a los análisis de ensayo cometa, con el cual visualizamos y medimos el rompimiento del ADN mediante una carga eléctrica que hace que el ADN dañado migre hacia el polo positivo.

Estudios más recientes muestran los efectos a la exposición a vapores de FA, los cuales afectan a los niveles séricos de testosterona y el comportamiento sexual en ratas macho adultas en el que los niveles de esta hormona fueron significativamente reducidos en el grupo expuesto a FA en comparación con el grupo control, concluyendo que la toxicidad reproductiva del FA es dependiente del tiempo y dosis (Zhang et al. 2010). Al analizar nuestros resultados observamos la misma tendencia que el autor arriba mencionado. Es decir, a mayor dosis mayor daño, aun y cuando el periodo de intoxicación fue corto (5 días); Zhou et al. 2011, coinciden con estos hallazgos también. Ellos evaluaron la toxicidad reproductiva del FA en una exposición prolongada y con dosis bajas en 30 ratas macho Sprague-Dawley, expuestas a 0.5 y 2.46 mg/m³ mediante inhalación por 60 días consecutivos, los resultados indican que la toxicidad fue dosis dependiente; los resultados histopatológicos mostraron túbulos seminíferos atrofiados, disminución en células espermatogénicas y oligozoospermia en testículos, concluyendo que el FA en dosis pequeñas y en exposición prolongada afecta la reproducción probablemente por la inducción de estrés oxidativo al observarse una disminución en los niveles de superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa. Nuestros resultados a nivel histopatológico son similares, aun y cuando la vía de intoxicación no fue la misma.

Uno de los mecanismos de toxicidad del FA es ocasionar daño oxidativo, lo cual incluye daño al ADN, en la segunda parte de nuestra investigación elegimos la dosis

10mg/Kg de FA, porque ocasionó un daño sin afectar la calidad de vida de los animales de experimentación.

En cuanto al objetivo principal del presente trabajo, se observó el efecto protector de *H. drummondii* en el ADN de linfocitos y espermatozoides de ratas macho Wistar, así como protección del epitelio germinal. Este efecto fue mejor al observado en el grupo tratado con vitamina E, la cual protege tanto del epitelio germinal como en las células espermáticas (Zhou et al 2006; Kutlubay et al 2007; Viguera-Villaseñor et al 2011).

Numerosos estudios han demostrado que el principal daño causado por el formaldehído es por la vía del estrés oxidativo y que el uso de antioxidantes reduce el daño ocasionado por este genotóxico, tal es el caso de la investigación realizada por Bakar et al. 2014, quienes evaluaron el efecto protector de las proantocianidinas (PA) y la vitamina E sobre el daño inducido por FA en riñones de ratas, sus hallazgos fueron, disminución de los niveles totales de ácido siálico, malondialdehido y en las actividades de superóxido dismutasa y mieloperoxidasa mientras que observaron un efecto protector en el grupo tratado con PA en los niveles de los parámetros mencionados cuando se compararon frente al grupo control. En otro estudio en el cual se evaluó el efecto terapéutico de la curcumina sobre el daño oxidativo causado por la exposición a FA en ratas macho Albino-Wistar se encontró que los niveles de MDA en suero se incrementaron en el grupo expuesto a FA y que en el grupo tratado con FA y después con curcumina disminuyó el MDA (Ciftci et al. 2015). Estos resultados son similares a los encontrados en el presente trabajo, donde se observa un efecto protector de *H. drummondii* debido posiblemente a la presencia de los ácidos cafeico, rosmarínico y ursólico, los cuales poseen efecto antioxidante.

La identificación de problemas de salud humana asociada a la exposición ocupacional o ambiental han sido apoyados fuertemente en animales de experimentación lo que ha permitido plantear novedosas estrategias para diferentes tratamientos como lo planteó Aydin et al., en 2015 que experimentó con ratas Sprague-Dawley a diferentes dosis inhaladas con FA comprobando el efecto de la carnosina sobre los niveles oxidantes y antioxidantes en suero y en tejidos de riñón y pulmón dando como resultado

que la administración de suplementos de carnosina reduce el estrés oxidativo y restaura los daños histopatológicos y bioquímicos. Uno de los hallazgos importantes en nuestro estudio fue el efecto protector en el grupo tratado con *H. drummondii* + FA en tejido testicular fue mejor que el observado con el grupo expuesto con vitamina E + FA.

Por otra parte, numerosos estudios describen alternativas para el tratamiento sobre el daño en tejido testicular y en células espermáticas a causa de la exposición a FA una de ellas es la vitamina E, en un estudio realizado en ratas expuestas a vapores de FA observaron su efecto antioxidante sobre testículos y calidad espermática dando como resultado que el parámetro de calidad espermática que el grupo tratado solo con FA tuvo un significativo decremento en comparación con el grupo control, mientras que el grupo tratado con FA + Vit E mostró un aumento significativo, en comparación con el grupo tratado con FA. En el análisis histológico del grupo tratado con FA se encontró atrofia de los túbulos seminíferos, degeneración en las células germinales y azoospermia, mientras que en el grupo tratado con FA y Vit E los túbulos seminíferos se habían recuperado parcialmente, pero el número de espermatozoides en el lumen era todavía menor que en el control (Zhou et al. 2006). Estos resultados son similares a los obtenidos en nuestro estudio, donde los parámetros de calidad espermática (concentración y movilidad) mostraron mejor resultado en el grupo administrado con Vit E + FA en comparación al grupo tratado solo con FA, mientras que en los hallazgos histológicos observamos un mayor efecto protector en el grupo tratado con *H. drummondii* + FA.

En nuestro trabajo seleccionamos la Vit E como control de referencia debido a que otros autores han demostrado su efecto protector frente al daño inducido por distintos xenobióticos a nivel reproductivo (Kutlubay et al. 2007; Viguera-Villaseñor et al. 2011; Khosravian et al 2015).

En un abordaje similar al nuestro, otros autores han estudiado los efectos de diferentes antioxidantes, como la vitamina E y distintos productos naturales sobre el daño en tejidos del aparato reproductor masculino. Por ejemplo, en el trabajo realizado por Jahan et al. 2014, se determinó el efecto de Vit E, sulforafano y el extracto de *Ficus*

religiosa en ratas intoxicadas con cadmio, donde encontraron que la exposición al cadmio causó una disminución significativa en la concentración de las enzimas antioxidantes CAT, POD, SOD, GSR, distrofia en el epitelio germinal, mientras que los tratamientos con antioxidantes resultaron ser eficaces en la reversión de la toxicidad inducida por Cd y representan posibles opciones terapéuticas para proteger tejidos reproductivos contra este xenobiótico. En otro estudio se evaluaron los posibles efectos protectores del aceite de rosa contra el daño ocasionado por vapores de formaldehído en testículos de ratas y reportaron que en el grupo que inhala FA + aceite de rosa, los niveles de testosterona en suero aumentaron significativamente en comparación con los niveles de las ratas expuestas a FA solamente, en el conteo y motilidad espermática se encontró un aumento significativo en el grupo que fue expuesto a aceite de rosa y FA en comparación al grupo que solo se expuso a FA. Los resultados histológicos mostraron que en el grupo tratado con FA aumentó el recuento de células de Leydig con núcleo dañado en comparación con el grupo tratado con aceite de rosa y FA. En este trabajo los autores concluyen que el aceite de rosa tiene efectos protectores a causa de los daños ocasionados por FA (Köse et al., 2012). Estos resultados fueron similares a los encontrados en el presente estudio, pero utilizando el extracto de *H.drummondii*.

9. CONCLUSIONES.

- A tiempos cortos de exposición, el formaldehído causa daño al ADN, afecta la calidad espermática de ratas Wistar y causa degeneración en el epitelio germinal. Estos efectos son dependientes de la dosis.
- *Hedeoma drummondii* posee efecto protector contra el daño genotóxico en las ratas Wistar tratadas con formaldehído, este efecto protector fue similar al de la vitamina E, un antioxidante conocido.
- En los animales tratados con formaldehído, *Hedeoma drummondii* mostró un importante protector sobre el epitelio germinal a nivel morfológico, este efecto fue mejor que el mostrado en el grupo tratado con Vitamina E.

10. PERSPECTIVAS.

- Investigar los efectos de diferentes extractos de *H. drummondii* a nivel de protección de daño al ADN.
- Aislar e identificar los compuestos de *H. drummondii* con mayor capacidad antioxidante y ensayarlos *in vitro* o *ex vivo*.
- Investigar si *H. drummondii* tiene capacidad de revertir daño en enfermedades causadas por estrés oxidativo (cáncer y/o diabetes) en modelos *ex vivo*.
- Estudiar los posibles mecanismos de acción de los compuestos aislados de *H. drummondii* implicados en la protección contra daño genotóxico.

11. BIBLIOGRAFÍA

ACGIH. 1992. Threshold limits values for chemical substances and physical agents, 1992-1993. Cincinnati, OH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists, 31.

Agarwal S and Allamaneni SR. 2005. Alteraciones de la cromatina espermática en la etiopatogenia de la infertilidad masculina. *Rev Int Androl*;3(1):0-0.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 1999. Formaldehyde #50-00-0.

American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACIH). 1992. Notice do intended change formaldehyde. *Appl. Occup. Environ.*

Aydin S, Ogeturk M, Kuloglu T, Kavakli A, Aydin S. 2015. Effect of carnosine supplementation on apoptosis and irisin, total oxidant and antioxidants levels in the serum, liver and lung tissues in rats exposed to formaldehyde inhalation. *Peptides* 64:14-23

Bakar E, Ulucam E, Cerkezkayabekir A. 2014. Protective effects of proanthocyanidin and vitamin E against toxic effects of formaldehyde in kidney tissue. *BiotechHistochem* 16:1–10.

Balasubramanian B, Pogozelski WR, Tullius TD. 1988. DNA strand breaking by the hydroxyl radical is governed by the accessible surface areas of the hydrogen atoms of the DNA backbone. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9738-43.

Balasuriya A, Speyer B, Serhal P, Doshi A, Harper HC. 2011. Sperm chromatin dispersion test in the assessment of DNA fragmentation and aneuploidy in human spermatozoa. *Reproductive BioMedicine Online*. 22, 428– 436.

Balhorn R. 1982. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol*. 1982 May;93(2):298-305.

Bardana JED. 1992. Occupational asthma. Hanley Ind. Belfast. Inc. Philadelphia PEA pp 151-171.

Betancourt-Martínez ND, Jiménez-Villarreal J, Carranza-Rosales P, Guzmán-Delgado NE, Leyva Orasma C, Viveros Valdez E, Morán-Martínez J. 2015. Sperm chromatin dispersion by formaldehyde in Wistar rats. *Genet Mol Res*. 2015 Sep 9;14(3):10816-26. doi: 10.4238/2015.September.9.20.

Cassidy SL and Dix KM. 1983. Evaluation of a Testicular Sperm Head Counting Technique Using Rats Exposed to Dimethoxyethyl Phthalate (DMEP), Glycerol a-Monochlorohydrin (GMCH), Epichlorohydrin (ECH), Formaldehyde (FA), or Methyl Methanesulphonate (MMS). *Arch Toxicol* 53:71-78.

Chang J, Gross EA, Stenberg JA, Barrow CS. 1983. Nasal cavity deposition, histopathology, and cell proliferation after single or repeated formaldehyde exposures in B6C3F1 mice and F-344 rats. *Toxicology* 68(2): 161-176.

Ciftci G, Aksoy A, Cenesiz S, Sogut MU, Yarim GF, Nisbet C, Guvenc D, Ertekin A. 2015 Therapeutic role of curcumin in oxidative DNA damage caused by formaldehyde. *Microsc Res Tech*.;78(5):391-5. doi: 10.1002/jemt.22485.

Cortés-Gutiérrez EI, Dávila-Rodríguez MI, López-Fernández C, Fernández JL, Gosálvez J. 2007. Evaluación del daño en el DNA espermático. *Actas Urol Esp.* 31(2):120-131

Di Stefano F, Siriruttanapuk. S, Mc.Coach I, Sherwood Burge P. 1999. Glutaraldehyde an occupational hazard in the hospital settings *Allergy.*

Duydu Y, Başaran N, Ustündağ A, Aydın S, Undeğer U, Ataman OY, Aydos K, Düker Y, Ickstadt K, Waltrup BS, Golka K, Bolt HM. 2011. Assessment of DNA integrity (COMET assay) in sperm cells of boron-exposed workers. *Arch Toxicol.* 86(1):27-35.

Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V. 2003. The Sperm Chromatin Dispersion Test: A Simple Method for the Determination of Sperm DNA Fragmentation. *Journal of Andrology.* Vol. 24, No. 1.

Foster S. and C. Hobbs. 2002. *The Peterson Field Guide, Western Medicinal Plants and Herbs.* Houghton Mifflin Co, New York, pp: 202.

García-Alonso M, De Palcual-Teresa S, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC. 2004. Evaluation of the antioxidant properties of fruit. *Food Chemistry.*, 84: 13 – 18.

Geffen D B and Man S. 2002. New drugs for the treatment of cancer, 1990-2001. *IMAJ*, 4 (2002) 1124

Gil Villa AM, Cardona-Maya WD, y Cadavid Jaramillo AP. 2007. Muerte embrionaria temprana: ¿tiene influencia el factor masculino? *Arch. Esp. Urol.*, 60, 9 (1.057-1.068).

Golalipour MJ, Azarhoush R, Ghafari S, Gharravi AM, Fazeli SA, Davarian A. 2007. Formaldehyde exposure induces histopathological and morphometric changes in the rat testis. *Folia Morphol.* 66(3):167-171.

Gulec M, Gurel A, Armutcu F. 2006. Vitamin E protects against oxidative damage caused by formaldehyde in the liver and plasma of rats. *Mol Cell Biochem.* 2006 Oct;290(1-2):61-7. Epub 2006 Aug 26.

Guohua C, Sofic E y Ronald LP.1997. Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids. Structure activity relationships. *Free I Radical Biology and Medicine*, 22 (5): 749-760

Gurel A, Coskun O, Armutcu F, Kanter M, Ozen OA. 2005. Vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in frontal cortex and hippocampus: biochemical and histological studies. *J Chem Neuroanat* 2005; 29: 173–8.

Heck HD, White EL, Casanova-Schmitz M (1982) Determination of formaldehyde in biological tissues by gas chromatography/mass spectrometry. *Biomed Mass Spectrom* 9:347-353.

Hovhannisyan GG. 2010. Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology *Mol Cytogenet.* 2010 Sep 15;3:17

Hughes CM, McKelvey-Martin VJ, Lewis SE. 1999. Human sperm DNA integrity assessed by the Comet and ELISA assays. *Mutagenesis.* 14(1):71-5.

IARC. 2006. Formaldehyde. In *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Formaldehyde, 2-Butoxyethanol and 1-tert-*

Butoxypropan-2-ol. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer 88. 39-325.

Irving RS. 1980. The systematics of Hedeoma (Labiatae). Sida 8 218-295.

Jahan S, Zahra A, Irum U, Iftikhar N, Ullah H. 2014. Protective effects of different antioxidants against cadmium induced oxidative damage in rat testis and prostate tissues. Syst Biol Reprod Med. 60(4):199-205

Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. Science. 10;275(5297):218-20

Kähkönen M, Hopia A. and Heinonen M. 2001. Berry fenolics and their Antioxidant activity. J. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49. 4076-4082.

Köse E, Sarsılmaz M, Taş U, Kavaklı A, Türk G, Özlem Dabak D, Sapmaz H, Ögetürk M. 2012. Rose oil inhalation protects against formaldehyde-induced testicular damage in rats. Andrologia. May;44 Suppl 1:342-8.

Kutlubay R, Oğuz EO, Can B, Güven MC, Sinik Z, Tuncay OL. 2007. Vitamin E protection from testicular damage caused by intraperitoneal aluminium. Int J Toxicol. 2007 Jul-Aug;26(4):297-306.

Lia WL, Zheng HC, Bukuru J, De Kimpe N. 2004. Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. Journal of Ethnopharmacology. 92(1) 1-21

Luo J, Hendryx M, Ducatman A. 2011. Association between six environmental chemicals and lung cancer incidence in the United States. *J Environ Public Health*. 2011:463701.

MacAllister SL, Choi J, Dedina L, O'Brien PJ. 2011. Metabolic mechanisms of methanol/formaldehyde in isolated rat hepatocytes: carbonyl-metabolizing enzymes versus oxidative stress. *Chem Biol Interact*. 191(1-3):308-14

Majumder PK, Kumar VL. 1995. Inhibitory effects of formaldehyde on the reproductive system of male rats. *Indian J Physiol Pharmacol*. 39(1):80-2

Manickam M, Ramanathan M., Farboodniay Jahromi MA, Chansouria JPN, Ray AB.. 1997 Antihyperglycemic Activity of Phenolics from *Pterocarpus marsupium*. *J. Nat. Prod*. 60, 609-610

McMartin KE, Martin-Amat G, Noker PE, Tephly TR. 1979. Lack of a role for formaldehyde in methanol poisoning in the monkey. *Biochem Pharmacol* 28(5): 645-649.

Monticello TM, Morgan KT, Everitt JI, Popp JA. 1989. Effects of formaldehyde gas on the respiratory tract of rhesus monkeys. Pathology and cell proliferation. *Am J Pathol* 134(3): 515-527.

Nossoni P. 2008. Single-Cell Gel Electrophoresis (Comet Assay): Methodology, Potential Applications, and Limitations in Cancer Research. *Mutagenesis*. 1999 Jan;14(1):71-5.

NTP. 2010. Report on Carcinogens Background Document for Formaldehyde. National Toxicology Program

Occupational Safety and Health Administration. Occupational exposure to formaldehyde. Fact sheet 95-97. Washington (DC): U.S. Department of Labor; 1995.

Proestos C, Chorianopoulos N, Nychas GJE, Komaitis M. 2005. RP- HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53,1190-1195.

Report on Carcinogens. 2011. U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service, National Toxicology Program. Formaldehyde 195-201

Robbins R. 2003. Phenolic Acids in Foods: An overw of Analytical Methodology, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51. 2866-2887.

Saito Y, Nishio K, Yoshida Y, Niki E. 2005. Cytotoxic effect of formaldehyde with free radicals via increment of cellular reactive oxygen species. *Toxicology*. 210: 235-45.

Sarsilmaz M, Kaplan S, Songur A, Colakoglu S, Aslan H, Tunc AT, Ozen OA, Turgut M, Bas O. 2007. Effects of postnatal formaldehyde exposure on pyramidal cell number, volume of cell layer in hippocampus and hemisphere in the rat: a stereological study. *Brain Res* 1145: 157-167.

Second Annual Report on Carcinogens. 1981. National Toxicology Program.

Shah BM, Vachhrajani KD, Chinoy MJ, Choudhuri AR. Formaldehyde induced structural and functional changes in the testes of the riat. *J. Reprod. Biol. Comp. Endocrinol*. 7: 42-52 (1987).

Siddhuraju P and. Becker K. 2003. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 51, 2144 – 2155.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider El. (1988) A Simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175:184-191.

Stayner L, Steenland K, Greife A, Hanung R, Hayes RS, Maawetz J, Ringenburg V, Elliot, Halperin W. 1993. Exposure-response analysis of Cancer Mortality in cohort of workers exposed to ethylene oxide. *American Journal of epidemiology.* 138 (10) 787-798.

Tang X, Bai Y, Duong A, Smith MT, Li L, Zhang L (2009) Formaldehyde in China: production, consumption, exposure levels, and health effects. *Environ Int.* 35:1210–1224.

US Consumer Product Safety Commission, Release #79-059.
<http://www.cpsc.gov/es/SeguridadConsumidor/>

Velioglu YS, Mazza G; Gao L, Oomah. BD. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 46. 4113-4117.

Vigueras-Villaseñor RM, Ojeda I, Gutierrez-Pérez O, Chavez-Saldaña M, Cuevas O, Maria DS, Rojas-Castañeda JC. 2011. Protective effect of α -tocopherol on damage to rat testes by experimental cryptorchidism. *Int J Exp Pathol.* 92(2):131-9.

Viveros-Valdez E, Rivas-Morales C, Carranza-Rosales P, Mendoza S, Schmeda-Hirschmann G. 2008. Free radical scavengers from the Mexican herbal tea "poleo" (*Hedeoma drummondii*). *Z Naturforsch C*. 63(5-6):341-6.

Viveros-Valdez E., Rivas-Morales C., Oranday-Cardenas A., Castro-Garza J. and Carranza-Rosales P. 2010. Antiproliferative effect from the Mexican Poleo (*Hedeoma drummondii*). *J. Med. Food*, 13: 740-742

Ward WS. 1993. Deoxyribonucleic Acid Loop Domain Tertiary Structure in Mammalian Spermatozoa, *Biology of Reproduction*, 48, 1193-1201.

Ward WS and Coffey DS. 1991. DNA Packaging and Organization in Mammalian Spermatozoa: Comparison with Somatic Cells, *Biology of Reproduction*, 44, 569-574.

World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction, 5th edn. Cambridge:Cambridge University Press, 2010.

Zahra T, Tajik P, Fazelipour S and Taghva M. 2007.. Effect of formaldehyde injection in mice on testis function. *Int. J. Pharmacol*. 3: 421-424

Zararsiz I, Meydan S, Sarsilmaz M, Songur A, Ozen OA, Sogut S. 2011. Protective effects of omega-3 essential fatty acids against formaldehyde-induced cerebellar damage in rats. *Toxicol Ind Health*;27:489–95

Zararsiz I, Sarsilmaz M, Tas U, Kus I, Meydan S, Ozan E. 2007. Protective effect of melatonin against formaldehyde-induced kidney damage in rats. *Toxicol Ind Health*. 23(10):573-9.

Zhang R, Lee IK, Kang KA, Piao MJ, Kim KC, Kim BJ, Lee NH, Choi JY, Choi J, Hyun JW. 2010. Cytoprotective effects of triphlorethol-A against formaldehyde-induced oxidative damage and apoptosis: role of mitochondria-mediated caspase-dependent pathway. *J Toxicol Environ Health A*. 73(21-22):1477-89.

Zhang Y, Li X, Zou D, Liu W, Yang J, Zhu N, Huo L, Wang M, Hong J, Wu P, Ren G, Ning G. 2008. Treatment of Diabetes Type 2 and Dyslipidemia with the Natural Plant Alkaloid Berberine. *J. Clin Endocrinol Metab*. 93(7):2559–2565

Zheng W and Wang SY. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem*. Vol. 49, 5165-5170.

Zhou DX, Qiu SD, Zhang J, Tian H, Wang HX. 2006. The protective effect of vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in the testes of adult rats. *Asian J Androl*. 2006 Sep;8(5):584-8.

Zhou DX, Zhang J, and Wang HX. 2011. Assessment of the potential reproductive toxicity of long-term exposure of adult male rats to low-dose formaldehyde. *Toxicol Ind Health*. 00(00) 1–8.

Zribi N, Chakroun NF, Elleuch H, Abdallah FB, Ben Hamida AS, Gargouri J, Fakhfakh F, Keskes LA. 2011. Sperm DNA fragmentation and oxidation are independent of malondialdehyde. *Reprod Biol Endocrinol*. 14;9:47.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Nadia Denys Betancourt Martínez

Candidato para el Grado de
Doctor en Ciencias con Acentuación en
Química de Productos Naturales

Tesis “EFECTO PROTECTOR DE *Hedeoma drummondii* SOBRE EL DAÑO GENOTOXICO INDUCIDO POR FORMALDEHÍDO

Campo de estudio: Ciencias Biológicas

Datos Personales: Nacida en Torreón, Coahuila, el 24 de Febrero de 1980. Hija de Ana María Martínez Ramírez e Isidro Betancourt Sonora

Educación: Egresada de la Universidad Juárez del Estado de Durango grado obtenido Químico Farmacéutico Biólogo, Egresada de la Universidad Autónoma de Coahuila grado obtenido Maestría en Investigación Multidisciplinaria de Salud.

Experiencia profesional: Asistente Académica y de Investigación en la Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Medicina Unidad Torreón desde el 2011 a la fecha

Chronic environmental exposure to lead affects semen quality in a Mexican men population

Javier Morán-Martínez^{1,2} Ph.D., Pilar Carranza-Rosales³ Ph.D., Mario Morales-Vallarta² Ph.D., José A. Heredia-Rojas² Ph.D., Susana Bassol-Mayagoitia⁴ Ph.D., Nadia Denys Betancourt-Martínez¹ M.Sc., Ricardo M. Cerda-Flores^{5,6} Ph.D.

1 Departamento de Biología Celular y Ultraestructura, Centro de Investigación Biomédica Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Coahuila, Coahuila, México.

2 Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

3 Departamento de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey, México.

4 Departamento de Biología de la Reproducción, Centro de Investigación Biomédica Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Coahuila, Coahuila, México.

5 Unidad de Biología Molecular, Genómica y Secuenciación. Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México.

6 Facultad de Enfermería, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México.

Corresponding Author:

Javier Morán-Martínez, Gregorio A. García No. 198 sur, Torreón, Coahuila, México. C.P. 27000.

Email: javmoran@yahoo.com

Tel/Fax: (+52) 8717171077

Received: 25 February 2012

Revised: 14 June 2012

Accepted: 9 October 2012

Abstract

Background: Male infertility is affected by several factors. Lead is one of the heavy metals more bioavailable than usually modifies the sperm quality in humans.

Objective: The aim of this study was to establish the role of lead in semen quality in environmentally exposed men.

Materials and Methods: Semen and blood samples were obtained from two groups: the exposed group (EG=20) and the non-exposed group (NEG=27). Two semen aliquots were used, one to evaluate spermatid quality and the other for lead determination. Blood (PbB) and semen lead (PbS) determination was performed by atomic absorption spectrophotometry.

Results: The PbB concentration was significantly greater in the EG, 10.10 ± 0.97 μgDL^{-1} than in the NEG, 6.42 ± 0.38 μgDL^{-1} ($p < 0.01$), as well as the PbS concentration, with 3.28 ± 0.35 and 1.76 ± 0.14 μgDL^{-1} in the EG and NEG respectively ($p = 0.043$). A significant correlation between PbS and PbB concentration in the EG was found ($r = 0.573$, $p = 0.038$). Overall, the spermatid quality was lower in the EG than in the NEG. Specifically, there were significant differences in the spermatid concentration [EG= 43.98 ± 6.26 and NEG= $68.78 \pm 8.51 \times 10^6$ cellmL^{-1} ($p < 0.01$)], motility [EG= 49 ± 7 and NEG= $67 \pm 4\%$ ($p = 0.029$)], viability [EG= 36.32 ± 3.59 and NEG= $72.12 \pm 1.91\%$ ($p < 0.01$)] and abnormal morphology [EG= 67 ± 18 and NEG= $32 \pm 12\%$ ($p < 0.01$)]. In the immature germ cells (IGC) concentration differences were found only for A cells (EG= $8.1 \pm 1.1 \times 100$ and NEG= $3.2 \pm 1.9 \times 100$ spermatozoa) ($p < 0.01$) and for Sab cells (EG= $3.4 \pm 2.2 \times 100$ and NEG= $1.1 \pm 1.0 \times 100$ spermatozoa) ($p = 0.041$).

Conclusion: These results suggest that chronic environmental exposure to low levels of lead adversely affect the spermatid quality.

Key words: Lead, Spermatid quality, Infertility, Environmental.

Introduction

The infertility problems associated with lead in men environmentally and occupationally exposed have been reported (1-5). The findings of these prior studies are interesting but their results show variability in the association between lead and semen characteristics.

Working in smelters is an important environmental exposure factor for lead. Some authors have found that low or moderate seminal lead levels in smelter workers were correlated with a decrease in the semen quality; also, oligospermia, asthenospermia and an increased frequency of teratospermia have been reported in workers exposed to lead (2, 3). Some smelter workers were found

to have hypogonadism and low serum testosterone concentration (1). On the other hand, men occupationally exposed to inorganic lead showed different endocrine and reproductive dysfunctions, particularly at the hypothalamic-pituitary-testicular axis (6-8). In this context, there are not published studies for Mexico that refer to the effects of lead on semen quality.

In order to establish the role of environmental lead exposure on semen quality (sperm quality is defined by the assessment of morphology, motility, viability and number of spermatozoa), we conducted this study in men living within a 500 meter radius of the third largest smelter and lead producer in the world, located in Torreón, State of Coahuila, México.

Materials and methods

This cross-sectional study was conducted in the Cellular Biology and Ultrastructure Department, Biomedical Research Center, School of Medicine of the Autonomous of Coahuila University. A total of 47 subjects were admitted for clinical and laboratory examinations. They were informed of the study objectives and given informed consent letters to sign (the protocol was approved by the Biomedical Research Center Committee, School of Medicine, University of Coahuila).

Inclusion criteria were age (18-30 years old), healthy, residents of the study area, similar social and economic status, 3 days of sexual abstinence. Exclusion criteria were subjects currently on any medication were not included. Also, patients with varicocele, leucospermia, smokers and alcoholic men were excluded from the study. The subjects of the study had lived in the same area for at least two years.

Twenty subjects who were residents within 500 meter radius from the metallurgic zone formed the exposed group (EG: n=20), and 27 subjects residing in two communities at a distance of 15 and 18 km, respectively from this zone formed the non-exposed group (NEG). In order to control for possible confounding sources of lead, all subjects were interviewed using a questionnaire, which included items on living conditions, socioeconomic status and occupational factors.

Sample collection and lead assay

The semen samples were collected by masturbation after at least 4 days of abstinence. The materials used for sample collection were plastic containers (125 ml), Falcon tubes (conical polystyrene, 15 ml) and polyethylen tubes (5 ml) (Becton Dickinson Labware, USA). These were cleaned with 10% nitric acid and rinsed with deionized water. The semen specimens were placed in an incubator at 37°C immediately after collection.

After liquefaction, ejaculates were divided into two aliquots. One aliquot was used to carry out routine laboratory analysis: seminal volume, sperm count, total amount of sperm per ejaculate, sperm motility and viability in accordance with the guidelines recommended

by the World Health Organization. Smears for IGC and spermatic morphology determinations were stained with the modified Bryan/Leishman stain (9). The second semen aliquot was used for lead determination. Lead analysis in blood and semen samples were measured by atomic absorption spectrophotometry with a heated graphite furnace according to Brown *et al* (10).

Statistical analysis

The seminal sperm concentration, progressive sperm motility, percentage of viable sperm and sperm morphology were analyzed by analysis of variance (ANOVA). Immature germ cells (IGC) are considered all round cells not identified as leukocytes, these cells are: spermatogonia, primary and secondary spermatocytes and Sab, Scd spermatids. The germinal cell classifications are based on those proposed by Macleod with modifications by WHO (9). The IGC concentration per field was calculated as follows (11):

$$\text{Concentration} = \frac{\text{Number of IGC (Sperm Count/mL)}}{100 \text{ Spermatozoa}}$$

Plasmatic and seminal lead concentrations were analyzed by ANOVA between groups and by simple correlation. Regression analysis was used to assess the association between lead semen concentration and spermatic quality in the EG. The results are presented as the mean with standard error of mean (SEM). The STATA version 6 program was used for all statistical analysis (12).

Results

The average age in the EG was 25±1.30 years (range 22-27) and the NEG was 25±1.24 years (range 20-26). Semen lead levels in all subjects were always less than this level in blood and were significantly higher in EG (3.28±0.35 nmol/L) in comparison to NEG (1.76±0.14 nmol/L), p<0.043 (Table I).

The mean blood lead concentration in the EG was 10.10±0.97 nmol/L and for NEG 6.42±0.38 nmol/L (p<0.01). A significant correlation between the levels of lead in semen and in blood of the EG were observed (r=0.573, p=0.038). No significant correlations (p=0.071) were found between lead semen concentration and seminal parameters (vs.

spermatic concentration ($\times 10^6$ cell/mL-1): $r=-0.006$; vs. spermatic viability: $r=0.244$ and vs. spermatic motility: $r=-0.05$). Semen quality parameters in men was affected in all parameters for both groups (Table II).

A significant higher percentage ($p=0.029$) of mobile spermatozoa were found in NEG ($67\pm 4\%$) as compared to EG ($49\pm 7\%$). The mean sperm concentration was also significantly higher ($p<0.01$) in NEG than EG, 68.78 ± 8.51 and $43.98\pm 6.26\times 10^6$ cell/mL, respectively. The volume was similar in the NEG (2.9 ± 0.26 mL), compared to EG (3.2 ± 0.32 mL). On the other hand, an increased percentage of morphologic

abnormalities were observed in EG ($67\pm 18\%$) compared to $32\pm 12\%$ in NEG ($p<0.01$) (Table III).

The predominant abnormalities were defects of the middle piece, including cytoplasmatic droplets (41%), and defects of the head (large oval head (15%), pyriform head (3%) and duplicate head (5%)) (Figure 1). Significant differences were found between the percentage of germinal cells secretion observed in the EG in comparison with NEG (global mean by germinal cell by group: $p<0.01$). The principal germinal cells secretion were spermatogonia type A, and germinal cells as Sab and Scd (Table IV, Figure 1).

Table I. Blood and semen lead concentration in the two study groups (Mean \pm SEM)

Sample	Lead concentration (nmol/L)			Range
	EG	NEG	NEG	
Blood	$10.10 \pm 0.97^{**}$	(4.4-22.7)	6.42 ± 0.38	(4.9-13.7)
Semen	$3.28 \pm 0.35^*$	(0.86-7.44)	1.76 ± 0.14	(0.66-2.60)

** $p<0.01$, * $p<0.05$

EG: exposed group, NEG: non-exposed group.

Table II. Seminal quality in the study groups (Mean \pm SEM)

Seminal parameters	NEG	EG
Concentration ($\times 10^6$ cells/mL)	$68.78 \pm 8.51^{**}$	43.98 ± 6.26
Motility (%) a	$67 \pm 4^*$	49 ± 7
Viability (%) b	$72.12 \pm 1.9^*$	36.32 ± 3.59
Morphology (%) c	33 ± 12	$68 \pm 18^{**}$
Volume (ml)	2.9 ± 0.26	3.2 ± 0.32

a) Show total motility percent by group.

b) Show the live motile and live immotile spermatozoa percent by group.

c) Show normal morphology percent by groups.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$

EG: exposed group, NEG: non-exposed group.

Table III. Spermatic morphology determination in the study groups (Mean \pm SEM)

Form	NEG (%)	EG (%)
Normal	68^{**}	33
Large oval head	11	18*
Small oval head	8^{**}	1
Amorphous middle piece	11	41^{**}
Duplicate head	1	5*
Duplicate tail	1	2

* $p<0.05$; ** $p<0.01$

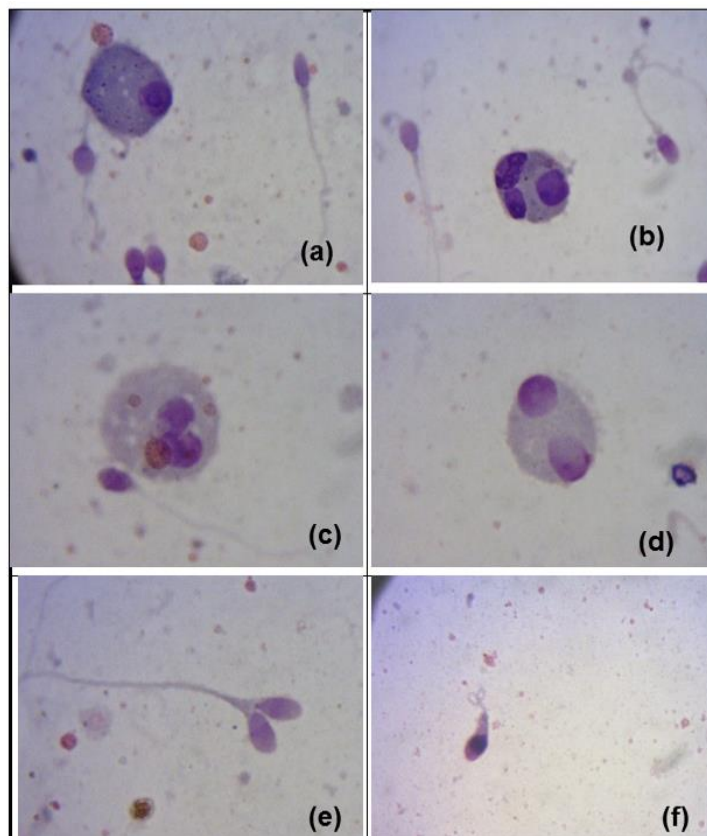
EG: exposed group, NEG: non-exposed group.

Table IV. Principal immature germ cells concentration in the study groups (Mean±SEM)

Cell Type	NEG (X100 spermatozoa)	EG (X100 spermatozoa)
Spermatogonia A	3.2 ± 2	8.1 ± 1 **
Spermatid Sab	1.1 ± 1	3.4 ± 2 *
Spermatid Scd	2.1 ± 1	2.8 ± 2

*p<0.05, ** p <0.01

EG: exposed group, NEG: non-exposed group.

**Figure 1.** Immature germ cells and sperm morphology in the exposed group.

a) Spermatogonium.

b, c, d) Spermatids Sab.

e) Doublé head

f) Amorphous head and coiled tail.

Discussion

The results of our study show that exposure to lead is related to decreased of the quality characteristics in semen in environmental exposed men. In this study, the EG lead blood concentration was higher than NEG. Blood studies made in the same smelter exposed area, show the results in the adult exposed group and control group were 19.2 ± 4.5 and 8.9 ± 1.3 nmol/L ($p < 0.001$) respectively, using the same method for lead determination used in this study. On the other hand, in children (7-12 years old) exposed environmentally to lead in the same area a

significant difference was found when compared with a control group (17.3 ± 56 and 6.4 ± 3.1 nmol/L respectively) ($p < 0.01$) (13, 14). Garcia-Vargas *et al* showed results in children living nearest school refinery with 27.6 nmol/L mean of lead blood (15).

These studies show similar results in lead blood and suggest a potential risk of exposition of people, mainly of young and mature men, and its repercussion in health, showing the latent environmental chronic exposure in this population (13-15). On the other hand, our results show a decrease in the seminal parameters in the exposed men for spermatic concentration, asthenospermia and

teratospermia. The semen lead concentration in the EG and NEG was 3.28 ± 0.35 nmol/L and 1.76 ± 0.14 nmol/L respectively, these data are similar to those described by Saaranen *et al* which measured semen lead from infertile (3.2 nmol/L) and fertile men (1.7 nmol/L) (16).

Earlier, Jockenhövel *et al* reported significant results in semen lead concentration in infertile men of 11.18 nmol/L vs. 5.6 nmol/L in fertile men (6). Other results in environmental exposure show 3.8 and 11.10 nmol/L of lead concentration in normal men (17, 18). These similar levels refer that low levels of lead in semen affect seminal characteristics. Butrimovitz *et al* suggested that lead in semen is a more accurate index of the degree of reproductive exposure than lead in blood (17). Our results, are similar to those published by Wyrobeck *et al*, Robins *et al*, Lerda, and Chia *et al*, which found that teratospermia and asthenospermia are principally affected, suggesting that the sperm morphology is the most sensitive parameter to use when studying changes caused by toxic substances during spermatogenesis (3, 19-21).

The teratospermic index is a good indicator for the status of the testicular germinal epithelium (22). This could be explained because lead interacts with the germinal cell in the seminiferous epithelium, where structural aspects in the spermatozoa development could be altered. Subcellular damage by lead can possibly be caused by the competition that Pb (2^+) has by replacing Zn (2^+) in Human Protamine 2 (HP2) *in vivo* and *in vitro*, causing alterations in sperm chromatin condensation and reducing fertility (23, 24).

Other studies support these results by showing that the take-up of Pb (2^+) by spermatozoans during testicular development and epididymal transport can alter chromatin condensation (25). Benoff *et al* confirm that metal ions, like Pb (2^+), compete with Zn (2^+) inducing alterations in human sperm mannose receptor expression (26). Comparison of sperm count, percentage of abnormal forms, viability and motility demonstrated statistically significant differences based on fertility status. In fact, there are some reports showing interesting and controversial results about morphology damage and semen lead

concentration, for example, Jockenhövel *et al*, did not find significant correlation between lead concentration and morphology, however, an increase of lead concentration and amorphous cells were determined (<50% and >50% with 10.87 ± 12.12 and 11.58 ± 1.71 nmol/L; morphology and lead concentration respectively) by Butrimovitz *et al* another study found 42.14 \pm 4.1 percent of the abnormal morphology in infertile environmentally exposed men (6, 17, 18).

In our work, 67% of total cells were abnormal, similar results (57.9%) have been reported by Saaranen *et al* (16). In a literature review, there were no previous reports about the relationship between semen lead concentration and deficient spermatid morphology. The principal germinal cells secretion is shown in the table 4, in our study, significant differences were found between groups, the secretion of type A germinal cells was higher in the EG than in the NEG (8.1 ± 1.12 and 3.2 ± 1.9 respectively) ($p < 0.01$). Similarity, from Sab type cell, the average values were 3.4 ± 2.2 in the EG and 1.1 ± 1.0 in the NEG ($p = 0.041$). In literature, there are no reports showing lead and germinal immature cells association.

A study in normal, oligozoospermic and azoospermic men in this geographical area reports 10.74 ± 11.9 ; 8.05 ± 16.8 and 19.90 ± 25.4 immature germinal cell concentration respectively (27). These results show a relationship between oligospermic men and the germinal cell concentration, similar data to the ones found in our study, although, the spermatid concentration found in our EG was actually over an oligospermic value ($43.98 \pm 6.26 \times 10^6$ cell/mL-1).

Lead is a broad-spectrum agent which may exert pronounced effects on different subcellular systems. It is known that Pb influences biological enzyme systems and it can be assumed that numerous mechanisms of interaction are yet to be elucidated. Furthermore, the regulatory mechanisms of the male reproductive system are very complex and also not completely understood. It is likely that Pb interacts with one or more of those mechanisms: it could be on reproductive organs at different levels, or on endocrine control (possible suppression of FSH and LH) of reproduction, or both (28).

Some actions of lead on the male reproductive system of different species includes infertility, germinal epithelial damage, oligospermia and testicular degeneration, decreased sperm motility, prostate hyperplasia, abnormal sperms, teratospermia, hypospermia and asthenospermia (29). As other heavy metals, lead seems to exert its toxicity upon different subpopulations of testicular cells. Mechanisms of heavy metal toxicity vary and not only include different cell sensitivities, but also direct vs. indirect actions.

Furthermore, it appears that primary damage to one cell type may secondarily affect other cell types in the testes. For example, in the case of lead, there are direct evidences for testicular toxicity in germinal cells and Leydig cells, but, for Sertoli cells toxicity is possible a secondary effect. The cellular motility in the present study was different for the NEG and the EG (67±4 and 49±7% respectively) ($p=0.029$), similar results were found in infertile men for this parameter by El-Zohairay *et al* (33.00±5.8%) and Saaranen *et al* (43.9±18.9%) (15, 18).

However, in our work, a positive correlation was not found between lead in semen concentration and seminal parameters. Similar results were found by Saaranen *et al*, Jockenhövel *et al* and Noack-Füller *et al* (6, 16, 30). The smelter has been contaminating this area for more than a hundred years (starting in 1887), it is the first silver producer in the world (year 2003: 78, 575, 158 Oz), and the first zinc (year 2003: 209, 403 tons), lead (year 2003: 125, 735 tons), and gold (year 2003: 1, 056, 385 Oz) producer in Latin America.

In the studied area, the bioavailability (air) and accumulative availability (dust and soil) of lead concentrations are critical. For example, the lead concentration in total air suspended particles (TSP) and suspended particles of size <10µm (PM-10) were 6.1 and 3.8 µg/m³ in a schools near the smelter zone in the same area of our study (15). These values are higher than the parameters suggested by the U.S. National Ambient Air Quality Standard, air values used in Mexico are 1.5 µg Pb/m³ (31). In soil and dust, the main problem was in the superficial layers (same on schools), the results show in soil a concentration of 2772.8

µg Pb/g (layer 0-10 cm), 2374.7µg Pb/g (layer 10-20 cm) and dust 3471.3µg Pb/g, these values surpassed the U.S. Environmental Protection Agency parameters (200-500 µg/g soil) (16, 32).

The environmental exposure in this smelter complex shows a potential and different contamination manner in this population. Allowed concentrations of toxic contaminants are still a debatable issue in developing countries, where there is wide variation in human susceptibility and tolerance, depending on general human health and other environmental factors. Therefore, this chronic exposure on this population in this risk area is critical and there should be other control and prevention strategies.

Conclusion

In conclusion, this study shows that the environmental exposure to low levels of lead affect the spermatic quality in an impairing way. Other studies about occupational and environmental lead exposure effects and spermatic quality in this risk area would be very interesting.

Acknowledgments

To the Universidad Autónoma de Coahuila, Centro Internacional de Biología Molecular y Celular de Monterrey Nuevo León A.C. and University of California at Los Angeles-Fogarty Program (UCLA, USA) for their invaluable support for this study. We thank the Departamento de Toxicología y Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León for carrying out the blood and semen lead analysis.

Dr. Victor Calderón Salinas (Departamento de Bioquímica CINVESTAV, México) by comment and suggests to the manuscript. Dr Kanan Patel Coleman of the UCLA-Fogarty coordinator for correcting English manuscript. JMM and NDBM were supported by a CONACyT scholarship 69678 and 18046 respectively.

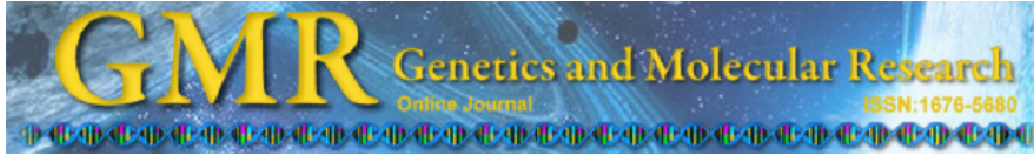
Conflict of interest

The authors indicate no potential conflicts of interest.

References

1. Assenato G, Paci C, Baser ME, Molinini R, Candela RG, Altamura BM, et al. Sperm count suppression without endocrine dysfunction in lead-exposed men. *Arch Environ Health* 1987; 2: 124-127.
2. Lancrajan I, Popescu HI, Gavanescu O, Klepsch I, Serbanescu M. Reproductive ability of workmen occupationally exposed to lead. *Arch Environ Health* 1975; 30: 396-401.
3. Lerda D. Study of sperm characteristics in persons occupationally exposed to lead. *Am J Ind Med* 1992; 22: 396-401.
4. Morán-Martínez J. Effects of environmental lead on sperm motility in men. International Conference on Reproductive Health. Bombay, India 1998; 332.
5. Vígéh M, Smith DR, Hsu PC. How does lead induce male infertility? *Iran J Reprod Med* 2011; 9: 1-8.
6. Jockenhövel F, Bals-Pratsch M, Bertram HP, Nieschlag E. Seminal lead and copper in fertile men *Andrologia* 1990; 22: 503-511.
7. Molinini R, Assenato G, Galiardi T, Paci C. Lead effects on male fertility in battery workers. Communication to the international Occupational J health Congress, Cairo 1981; 48.
8. McGregor AJ, Mason MJ. Chronic occupational lead exposure and testicular endocrine function *Hum Exp Toxicol* 1990; 9: 371-376.
9. World Health Organization. Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and semen-Cervical Mucus Interaction. Cambridge University Press; 1999: 45.
10. Brown AA, Halls DJ, Taylor A. Atomic spectrophotometry update-clinical and biological materials; Food and beverages. *J Anal At Spectrom* 1988; 3: 45.
11. World Health Organization. Collection and examination of human semen. In: Beslev MA, Eliasson R, Gallegos AJ, Moghissi KS, Paulsen CA, Prass MRN, editors. Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. Singapore: Press Concern 1980; 9-32.
12. STATA version 6. Stata Corporation, College Station, TX, USA.
13. Calderón-Salinas JV, Hernández-Luna C, Valdez-Anaya B, Maldonado-Vega M, Lopez-Miranda. A Evolution of lead toxicity in population of children. *Hum Exp Toxicol* 1996; 15: 376-382.
14. Calderón-Salinas JV, Valdéz-Anaya B, Zúñiga-Charles Ma, Albores-Medina A. Lead exposure in a population of Mexican children. *Human Exp Toxicol* 1996; 15: 305-311.
15. García-Vargas GG, Rubio-Andrere M, Del Razo LM, Borja-Aburto V, Vera-Aguilar E, Cebrian ME. Lead exposure in children in smelter community in Region Lagunera, Mexico. *J Toxicol Environ Health* 2001; 62: 417-429.
16. Saaranen M, Suistomaa U, Kantola M, Saarikoski S, Vanha-Perttula T. Lead, magnesium, selenium and zinc in human seminal fluid: Comparison with semen parameters and fertility. *Hum Reprod* 1989; 2: 475-479.
17. Butrimovitz GP, Sharlip I, Lo R. Extremely low seminal lead concentrations and male fertility. *Clinica Chemica Acta* 1983; 135: 229-231.
18. El-Zohairy EA, Youssef AF, Abul-Nasr SM, Fahmy IM, Salem D, Kahil AK, et al. Reproductive hazards of lead exposure among urban egyptian men. *Reprod Toxicol* 1996; 10: 145-151.
19. Wyrobeck AJ, Gordon LA, Burkhart JG, Francis MW, Kepp RW Jr, Letz G, et al. An evaluation of human sperm as indicators of chemically-induced alterations of spermatogenic function. *Mutat Res* 1983; 115: 73-148.
20. Robins GT, Bormman MS, Ehrlich IR, Cantrell CA, Pienaar E, Vallabh J, et al. Semen Quality of men employed in South Africa lead acid battery plant. *Am J Ind Med* 1997; 32: 369-376.
21. Chia SE, Ong CN, Lee ST, Tsakok FHM. Blood concentration of lead, cadmium, mercury, zinc and copper and human semen parameters. *Arch Androl* 1992; 29: 177-183.
22. Jeyendran Rs, Van der Ven HH, Perez Perez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 1984; 70: 219-227.
23. Quintanilla-Vega B, Hoover DJ, Bal W, Silbergeld EK, Waalkes MP, Anderson LD. Lead interaction with human protamine (HP2) as a mechanism of male reproductive toxicity. *Chem Res Toxicol* 2000; 7: 594-600.
24. Quintanilla-Vega B, Hoover DJ, Bal W, Silbergeld EK, Waalkes MP, Anderson LD. Lead effects on protamine-DNA binding. *Am J Ind Med* 2000; 3: 324-329.
25. Hernández-Ochoa I, Sánchez-Gutiérrez M, Solís-Heredia MJ, Quintanilla-Vega B. Spermatozoa Nucleous takes up lead during the Epididymal maturation altering Chromatin Condensation. *Reprod Toxicol* 2006; 2: 171-178.
26. Benoff S, Cooper GW, Centola GM, Jacob A, Herschlag A, Hurley IR. Metal Ions and Human Sperm Mannose Receptors. *Andrologia* 2000; 32: 317-329.
27. Bassol S, Recio R, De la Cruz DL. Frequency of immature germinal cells in normal and abnormal semen analysis. *Arch Androl* 1990; 25: 115-119.
28. Thomas JA. Toxic responses of the reproductive system In: Casarett and Doull's. Toxicology. The Basic Science of poisons. Curtis D. Klaassen, Mary O. Amdur, John Doull (eds). 5th Ed. McGraw-Hill. USA 1996; 547-581.
29. Bell JU, Thomas JA. Effects of lead on the reproductive system. In Singhal RL, Thomas JA

- (eds): Basic and clinical toxicity of lead. Baltimore Urban and Schawarzenberg Medical Publishers 1980; 169-189.
30. Noack-Füller G, De Beer C, Seibert H. Cadmium, lead, selenium, and zinc in semen of occupationally exposed men. *Andrologia* 1993; 25: 7-12.
31. Diario Oficial de la Federación Diario oficial de la Federación de México CDXCV (23 de Diciembre) 1994; 4.
32. U.S. Environmental Protection Agency. Engineering Bulletin: Technology Alternatives for the Remediation of Soils Contaminated with As, Cd, Cr, Hg and Pb. EPA/540/S-97/500. Washington, DC: U.S. EPA, Office of Emergency and Remedial Response. 1997.



Genotoxicity in oral epithelial cells in children caused by nickel in metal crowns

J. Morán-Martínez¹, K.D. Monreal-de Luna¹, N.D. Betancourt-Martínez¹, P. Carranza-Rosales², J.G. Contreras-Martínez¹, M.C. López-Meza³ and O. Rodríguez-Villarreal³

¹Departamento de Biología Celular y Ultraestructura, Centro de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina de Torreón, Universidad Autónoma de Coahuila, Torreón, Coahuila, México

²Departamento de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey, Nuevo León, México

³Clínica de Odontología Pediátrica, Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Coahuila, Torreón, Coahuila, México

Corresponding author: J. Morán-Martínez
E-mail: javmoran@yahoo.com

Genet. Mol. Res. 12 (3): 3178-3185 (2013)

Received August 9, 2012

Accepted November 22, 2012

Published August 29, 2013

DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2013.August.29.1>

ABSTRACT. The micronucleus (MN) assay evaluates the effects of low doses of genotoxic carcinogens and can detect structural lesions that survive mitotic cycles. The objective of this study was to determine both the genotoxicity of nickel (Ni) in buccal epithelial cells and the urinary excretion of Ni in children with metal crowns. This was a prospective longitudinal study based on 37 patients selected at the Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Coahuila. MN assays were performed using buccal cells from the 37 patients, and Ni levels were determined from urine samples using inductively coupled plasma mass spectrometry at 1 (basal value), 15, and 45 days following the placement of crowns in each patient. Ni urinary excretion levels increased from 2.12 ± 1.23 to 3.86 ± 2.96 $\mu\text{g Ni/g creatinine}$ ($P < 0.05$) and the frequency of exposed micronuclei increased from 4.67 ± 0.15 to $6.78 \pm 0.167/1000$ cells ($P < 0.05$) between 1 and 45 days post-crown placement. These

results suggest that odontological exposure to metal crowns results in genotoxic damage at the cellular level of the oral mucosa and an increase in the urinary excretion of Ni within 45 days of exposure.

Key words: Micronucleus; Nickel; Genotoxicity; Oral epithelial cells

INTRODUCTION

In odontology, nickel (Ni) is used for fashion brackets, fillings, space maintainers, and crowns (Bass et al., 1993; Westphalen et al., 2008). The oral cavity is particularly suited for the biodegradation of metals due to its ionic, thermal, microbiological, and enzymatic properties (Vijaya Bhaskar and Subba-Reddy, 1997; Faccioni et al., 2003; Shin and Hwang, 2003; Liu et al., 2007; Amini et al., 2008). Ni can be found in dental alloys in varying amounts and, depending on its function, is differentiated into 3 types: a) Ni-chromium (Cr) alloys for fixed prosthodontics (metal-ceramic composites) in which Ni is present in high proportions; b) stainless steels for conventional fixed or removable orthodontic apparatuses, which contain very low proportions of Ni; and c) new Ni-titanium alloys for orthodontics, with shape-memory and superelasticity in which Ni is present in intermediate ratios (Staerkjear and Menné, 1990; Bass et al., 1993; Das et al., 2008). The most frequent mechanisms of adverse reactions induced by metals are: a) corrosion, which is dependent on the presence of oxygen, chlorides, and non-noble metal alloys in the oral cavity, and b) the gradual and continuous release of ionic components from dental materials. Such ionic components are absorbed in the human body, either through the digestive system, oral mucosa, skin, or airways (Eliades and Athanasiou, 2002; Costa et al., 2007). The most common adverse reactions are caused by metal toxicity, sub-toxic reactions, hypersensitivity, and allergic contact dermatitis (Pedemonte et al., 2006). The carcinogenic effects of Ni have been demonstrated through exposure pathways such as ingestion, inhalation, and parenteral injection of Ni compounds (Kasprzak et al., 2003; Pedemonte et al., 2006). Therefore, because of its wide use in dentistry, it is important to investigate the genotoxic effects of topical odontological exposure to metal alloys that include Ni. The micronucleus (MN) test of exfoliated cells in epithelial tissue has been used to evaluate the genotoxic effects produced by low doses of carcinogenic substances, or mixtures, which are carcinogenic, to exposed human populations. The frequency of MN in human exfoliated cells can be used as an “endogenous dosimeter” in tissues that are specific targets of genotoxic carcinogens, where carcinomas can then develop (Martino-Roth et al., 2003). The MN assay is widely used today because it is practical, fast, economical, and measures irreversible damage at the nuclear chromatin level, offering many advantages over other assays used previously to measure DNA damage such as the comet test. Compared to the comet test, trials have shown that MN is more sensitive for detecting genotoxicity. Given this, the application of the MN test is thus considered useful for measuring genotoxic damage caused by odontological metal alloys. Through the analysis of buccal epithelial cells and urine samples, the objective of the current study was to determine the extent of Ni-induced DNA damage in 37 pediatric subjects with metal dental crowns.

MATERIAL AND METHODS

Inclusion criteria

We recruited 42 pediatric patients. The parents of each patient signed a letter of con-

sent for participation in the study. All protocols used in the current study were approved by the Bioethics Committee at the Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Coahuila, Unidad Torreón. Participants were considered to meet inclusion criteria if they were eligible for treatment with dental preformed metal crowns. Patients included those with severely decayed teeth involving 2 or more tooth surfaces, interproximal contact loss, changes in mesiodistal and buccolingual dimensions, and mesial tipping of the first permanent molar; primary teeth that had been treated with pulpotomy or pulpectomy, structural defects such as enamel hypoplasia, hypocalcification, imperfect amelogenesis, or imperfect dentinogenesis that could not be restored properly with conventional techniques; retainers for the fabrication of space maintainers, and removable and fixed appliances used in preventive and interceptive orthodontics; and subjects with pretreatment of metal crowns, with no metal seals or fixed oral appliances and without previously diagnosed systemic diseases. Subjects were excluded if they presented piercings in the mouth, or reported carrying metal stents. In addition, patients were also excluded if sampling of oral epithelial cells and/or urine was taken ± 1 day from the scheduled time points (1, 15, and 45 days post-crown placement), or if they removed their metal crown for any reason during the 1 to 45 days of exposure.

Determination of the alloy of the metal crown

To determine the concentration of metal alloys, crown samples were evaluated using Atomic Absorption Spectroscopy on a Perkin-Elmer 5100 spectrophotometer (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA).

Collection and sample preparation

Three samples were collected from oral mucosa cells according to a standard protocol previously described by Titenko-Holland et al. (1994). Initial samples were collected on the day that the metal crowns were inserted, which was considered the first day of Ni exposure (basal value). The second and third samples were obtained 15 and 45 days post-exposure. Urine samples were collected in a plastic container on days 1 (basal value), 15, and 45 following the placement of the dental crown; samples were collected midstream from the first urination of each collection day, and were refrigerated at 4°C until processing. Urine samples were prewashed with 10% nitric acid, rinsed with distilled water, and dried at room temperature.

Measurement of urine Ni concentrations by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)

We used ICP-MS (Elan 6000 DRC II, Los Angeles, CA, USA) to measure the urine Ni concentration according to previously described methods (Fernández-Ruiz, 2003); concentrations are reported as $\mu\text{g Ni/g creatinine}$.

MN assay

After collecting and analyzing cheek cells, slides of buccal cells were prepared by dropping the washed cell suspension onto prewarmed slides (37°C). Slides were then air-dried and fixed in 80% (v/v) methanol at 0°C for 20 min, and again allowed to dry at room tem-

perature before being stained with Giemsa solution (Jalmek G0700-02, USA). Subsequently, 1 mL Giemsa solution was placed on each slide and was left to rest for 20 min. Slides were then rinsed with deionized water, followed by tri-distilled water, and allowed to dry at room temperature. For preservation, slides were covered with a layer of resin [synthetic resin solution in 60% xylene (Jalmek SR175-12, USA)] and dried for 8 days. Each slide was observed at an amplification of 100X with a light microscope (Micromaster 640 EE7055); the number of normal, micronucleated, binucleated, and necrotic cells were determined. Cells exhibiting degenerative processes such as karyorrhexis, karyolysis, and pyknosis were considered as one group of necrotic cells. Binucleated and micronucleated cells were identified according to the characteristics described by Zalacain et al. (2005), and apoptotic cells were identified according to those set by Holland et al. (2008). Duplicate slides were made for each patient and 500 cells were read per slide, totaling 1000 cells per patient sample.

Statistical analysis

The SAS 9.0 software package was used to calculate measures of central tendency and dispersion, and to conduct an analysis of variance (ANOVA, Kruskal-Wallis) in independent populations over time. Data analysis was performed by using the Statistical Analysis System software SAS, Version 9.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

RESULTS

Statistical analysis was performed on 37 of the 42 patients originally selected for the study. Subjects included were between 4 and 11 years of age (mean = 6.26 ± 1.79 years). Of these, 62.16% were males and 37.84% were females; 87% of the males and 86% of the females were 8 years of age or younger. The sampled crowns were found to contain 70.85% iron (Fe), 19.28% Ni, and 9.62% Cr. Analysis of urine samples from the 3 time periods revealed that longer Ni exposure leads to significant increasing in Ni concentrations of 57% between 1 and 15 days ($P < 0.05$) and 71% between 1 and 45 days of exposure ($P < 0.05$). However, Ni concentrations observed at 15 and 45 days were not significantly different ($P > 0.05$). Figure 1 shows mean urinary Ni concentrations for the 3 exposure times. The Ni concentration at day 1 was 2.12 ± 1.23 $\mu\text{g Ni/g creatinine}$. After 15 and 45 days of exposure, the Ni concentration had increased to 3.25 ± 2.03 and 3.86 ± 2.96 $\mu\text{g Ni/g creatinine}$.

Results of the MN assays showed a statistically significant increase in the frequency of micronucleated cells in samples collected after 45 days of exposure compared to those collected at day 1 ($P < 0.05$). However, the frequencies of micronucleated cells were not significantly different between samples collected at 1 and 15 days, nor between 15 and 45 days of exposure ($P > 0.05$; Table 1). An increase in the number of necrotic cells, including those exhibiting karyorrhexis, karyolysis, and pyknosis, was also observed with increasing exposure. The numbers of necrotic cells observed in samples from each time point are shown in Figure 2. The frequencies of abnormalities per 1000 cells are shown in Table 2. The number of necrotic cells in males and females was not found to be significantly different at any of the 3 time points ($P > 0.05$). However, a slight increase was observed at 15 days of exposure compared to day 1 (5.73 ± 2.70 and 6.78 ± 4.11 , respectively). The frequency of binucleated cells in males was significantly different between samples at day 1 (2.17 ± 2.69) and day 45 (3.08 ± 2.48 ; $P < 0.05$). In girls, significant differences were observed between 15 and 45 days post-exposure (P

< 0.001). After partitioning by gender, a difference in the frequency of micronucleated cells was observed only in male samples collected at days 1 and 45 ($P < 0.05$; Table 2).

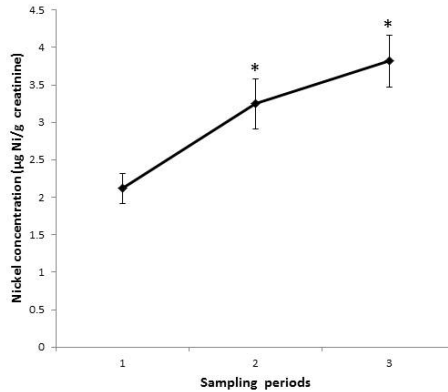


Figure 1. Concentration of urinary excretion of nickel (Ni) in the three sampling periods of exposure [1 (basal value), 15, and 45 days; means ± SE]. Unit of measure: µg Ni/g creatinine (* $P < 0.05$).

Table 1. Frequency of micronucleated, binucleated, and necrotic cells in the 3 sampling periods.

Sample	Frequency for every 1000 cells (means ± SE)		
	Micronucleated cells	Binucleated cells	Necrotic cells
Basal (1 day)	4.67 ± 0.15 ^b	2.81 ± 0.087 ^a	5.24 ± 0.096 ^b
15 days	5.48 ± 0.126 ^a	3.02 ± 0.073 ^a	6.43 ± 0.129 ^a
45 days	6.78 ± 0.167 ^a	2.56 ± 0.072 ^a	5.56 ± 0.108 ^b

Similar letters in the column are statistically similar ($P \geq \chi^2$, $\alpha = 0.05$).

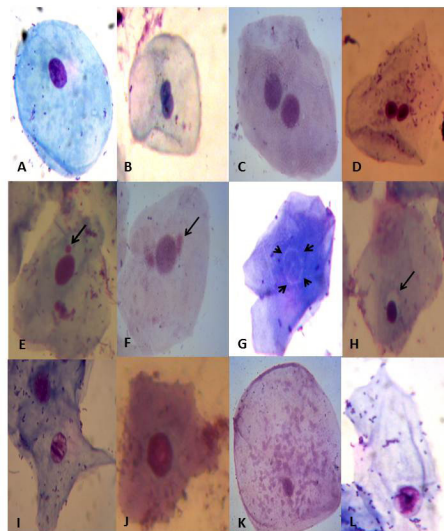


Figure 2. Epithelial cells of oral mucosa in degeneration processes: **A.** Normal cell. **B. C. D.** Binucleated cell. **E. F.** Cell with micronucleus. **G.** Cell in karyolysis. **H.** Cell in pyknosis. **I. J. K. L.** Cell in karyorrhexis. Giemsa stain, 100X.

Table 2. Frequency per gender of micronucleated, binucleated, and necrotic cells in the 3 sampling periods.

Sample	Frequency for every 1000 cells (means \pm SE)					
	Micronucleated cells		Binucleated cells		Necrotic cells	
	Female	Male	Female	Male	Female	Male
Basal (1 day)	5.42 \pm 4.92 ^a	4.21 \pm 4.76 ^a	3.85 \pm 2.68 ^a	2.17 \pm 2.69 ^a	4.42 \pm 3.47 ^a	5.73 \pm 2.70 ^a
15 days	5.42 \pm 3.36 ^a	5.52 \pm 4.39 ^{ab}	3.71 \pm 2.46 ^{ab}	2.60 \pm 2.21 ^a	5.85 \pm 4.16 ^a	6.78 \pm 4.11 ^a
45 days	6.85 \pm 4.73 ^a	6.73 \pm 5.46 ^b	1.71 \pm 1.77 ^c	3.08 \pm 2.48 ^a	6.57 \pm 3.43 ^a	4.95 \pm 3.37 ^a

Similar letters in the column are statically similar ($P \geq \chi^2$, $\alpha = 0.05$).

DISCUSSION

We observed that in the 37 participants the frequency of micronucleated cells increased linearly with the concentration of Ni excreted in the urine. The significant increase of Ni in the urine coincides with that reported by Grandjean et al. (1988), who observed higher concentrations after 28 days of occupational exposure to this metal. In other studies, similar results are reported in orthodontic apparatus users (Barret et al., 1993; Menezes et al., 2007; Petoumenou et al., 2009; Sahoo et al., 2011). Our data suggest that the MN assay is a suitable dosimeter for the assessment of topical exposure to metals such as Ni *in vivo* as we observed that both the number of cells with micronuclei as well as the urinary concentration of Ni were significantly increased at 45 days following the placement of Ni-based metal crowns. In 1997, Vijaya Bhaskar and Subba-Reddy (1997) reported a significant increase in the concentration of Ni and Cr ions in the saliva of metal crown users at 7 days after the placement of a single crown; however, the concentrations decreased to negligible levels after 28 days of crown placement. Due to this, it was expected that the count of micronucleated cells would peak at 15 days and damage would decrease after 45 days. However, in our study, we found evidence that Ni concentrations in urine increased with time. The increase of the frequency of micronucleated cells is partly due to the interaction of the metals in question. It is well known that the 3 metals are associated with the onset of cancer and genotoxic damage. Fe alloyed with Ni produces a protective effect to genotoxic damage according to Kasprzak et al. (2003). Thus, the fact that we observed an increased number of micronucleated cells at day 45 compared to day 15 is likely explained by a loss of ions.

Here, we present evidence that the count of cells with micronuclei is a sensitive method for determining genotoxic damage. Indeed, the alloy metal found in the crowns used in our study showed that, after Fe, Ni was the second most abundant. Other studies have shown that metallic ions such as Ni and cobalt released from orthodontic appliances could induce DNA damage in oral mucosa cells and in mouse fibroblasts *in vitro* (Schmalz et al., 1998; al-Hiyasat et al., 2002; Faccioni et al., 2003). Therefore, we can say that there is evidence that exposure to metal crowns produces genotoxic damage 45 days after exposure. The proposed model allows us to conclude that there is DNA damage induced by metal ions; however, it cannot be said that this damage is exclusively due to the Ni, as it is alloyed with steel (Fe) and Cr, both metals with known genotoxic effects. Ni was used as a biomarker of indirect control of the concentrations of metal ions absorbed and metabolized via the levels excreted in urine, since this metal is eliminated in the same form as when it is absorbed, Ni (II), without interacting with the metabolism (Danadevi et al., 2004; Lewinska et al., 2007). Population studies assessing the number of micronucleated cells in subjects with orthodontic devices have shown increases

within 30 days after the placement of these devices. In this sense, it is important to note that no tests have been described that demonstrate the genotoxicity induced by orthodontic appliances. However, in future studies, it will be important to consider each metal individually, and compare which of the three releases more ions, for how long, and if its genotoxic effects vary in relation to purity or interactions with other metals. Longer patient follow-up periods, as well as the use of additional serum and urinary biomarkers could provide further insight as to whether genotoxic damage induced by metal crowns in buccal cells is permanent and can progress to cancer, and whether lowering the secretion levels of these metals will make the use of metal crowns safer. In conclusion, this study provides evidence of genotoxic damage caused by exposure to Ni in children with metal crowns.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Laboratorio de Metales of the MET-MEX Peñoles for carrying out the urine Ni analysis, and the 42 children and their parents who voluntarily consented to participate in the study. K.D. Moreal-de Luna and N.D. Betancourt-Martínez were supported by CONACyT scholarships #298027 and #18046, respectively.

REFERENCES

- al-Hiyasat AS, Bashabsheh OM and Darmani H (2002). Elements released from dental casting alloys and their cytotoxic effects. *Int. J. Prosthodont.* 15: 473-478.
- Amini F, Borzabadi FA, Jafari A and Rabbani M (2008). *In vivo* study of metal content of oral mucosa cells in patients with and without fixed orthodontic appliances. *Orthod. Craniofac. Res.* 11: 51-56.
- Barrett RD, Bishara SE and Quinn JK (1993). Biodegradation of orthodontic appliances. Part I. Biodegradation of nickel and chromium *in vitro*. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* 103: 8-14.
- Bass JK, Fine H and Cisneros GJ (1993). Nickel hypersensitivity in the orthodontic patient. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* 103: 280-285.
- Costa MT, Lenza MA, Gosch CS, Costa I, et al. (2007). *In vitro* evaluation of corrosion and cytotoxicity of orthodontic brackets. *J. Dent. Res.* 86: 441-445.
- Danadevi K, Rozati R, Banu BS and Grover P (2004). Genotoxic evaluation of welders occupationally exposed to chromium and nickel using the Comet and micronucleus assays. *Mutagenesis* 19: 35-41.
- Das K, Bose S, Bandyopadhyay A, Karandikar B, et al. (2008). Surface coatings for improvement of bone cell materials and antimicrobial activities of Ti implants. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 87: 455-460.
- Eliades T and Athanasiou AE (2002). *In vivo* aging of orthodontic alloys: implications for corrosion potential, nickel release, and biocompatibility. *Angle Orthod.* 72: 222-237.
- Faccioni F, Franceschetti P, Cerpelloni M and Fracasso ME (2003). *In vivo* study on metal release from fixed orthodontic appliances and DNA damage in oral mucosa cells. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* 124: 687-693.
- Fernández-Ruiz R (2003). La Técnica De Plasma-Masas (ICP-MS). Recuperado el 11 de Mayo de 2011. Available at [http://www.uam.es/personal_pas/txrf/icpms.html]. Accessed December 19, 2011.
- Grandjean P, Andersen O and Nielsen GG (1988). Indicadores Biológicos para la Valoración de la Exposición Humana a Compuestos Químicos Industriales: Níquel. 1st edn. Diario Del Puerto De Valencia, S.L., Brussels, Luxembourg, 29-39.
- Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, et al. (2008). The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat. Res.* 659: 93-108.

- Kasprzak KS, Sunderman FW Jr and Salnikow K (2003). Nickel carcinogenesis. *Mutat. Res.* 533: 67-97.
- Lewinska D, Palus J, Stepnik M, Dziubaltowska E, et al. (2007). Micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes and buccal mucosa cells of copper smelter workers, with special regard to arsenic exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 80: 371-380.
- Liu IH, Lee TM, Chang CY and Liu CK (2007). Effect of load deflection on corrosion behavior of NiTi wire. *J. Dent. Res.* 86: 539-543.
- Martino-Roth MG, Viégas J and Roth DM (2003). Occupational genotoxicity risk evaluation through the comet assay and the micronucleus test. *Genet. Mol. Res.* 2: 410-417.
- Menezes LM, Quintão CA and Bolognese AM (2007). Urinary excretion levels of nickel in orthodontic patients. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* 131: 635-638.
- Pedemonte S, Chimenos E and López J (2006). El níquel en odontología. *DENTUM Rev. Mat. Dentales* 6: 26-34.
- Petoumenou E, Arndt M, Keilig L, Reimann S, et al. (2009). Nickel concentration in the saliva of patients with nickel-titanium orthodontic appliances. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* 135: 59-65.
- Sahoo N, Kailasam V, Padmanabhan S and Chitharanjan AB (2011). *In-vivo* evaluation of salivary nickel and chromium levels in conventional and self-ligating brackets. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* 140: 340-345.
- Schmalz G, Langer H and Schweikl H (1998). Cytotoxicity of dental alloy extracts and corresponding metal salt solutions. *J. Dent. Res.* 77: 1772-1778.
- Shin JS, Oh KT and Hwang CJ (2003). *In vitro* surface corrosion of stainless steel and NiTi orthodontic appliances. *Aust. Orthod. J.* 19: 13-18.
- Staerkjaer L and Menné T (1990). Nickel allergy and orthodontic treatment. *Eur. J. Orthod.* 12: 284-289.
- Titenko-Holland N, Moore LE and Smith MT (1994). Measurement and characterization of micronuclei in exfoliated human cells by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutat. Res.* 312: 39-50.
- Vijaya Bhaskar B and Subba-Reddy V (1997). Biodegradation of nickel and chromium from stainless steel crowns and space maintainers - an *in vitro* study. *Ann. Dent. Univ. Malaya* 4: 17-21.
- Westphalen GH, Menezes LM, Prá D, Garcia GG, et al. (2008). *In vivo* determination of genotoxicity induced by metals from orthodontic appliances using micronucleus and comet assays. *Genet. Mol. Res.* 7: 1259-1266.
- Zalacaín M, Sierrasesúmaga L and Patiño A (2005). El ensayo micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *An. Sist. Sanit. Navar.* 28: 227-236.



Revista Mexicana de Ciencias
Farmacéuticas

ISSN: 1870-0195

rmcf@afmac.org.mx

Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C.
México

Téllez-López, Miguel A.; Treviño-Neávez, Jaime Fco.; Verde-Star, Ma. Julia; Moran-Martínez, Javier; Betancourt, Nadia Deniss; Serrano-Gallardo, Luis Benjamín; Morales-Rubio, Ma. Eufemia
Evaluación del efecto de las particiones del extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica* sobre la función testicular y calidad espermática en ratas macho Wistar
Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, vol. 45, núm. 3, 2014, pp. 65-73
Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C.
Distrito Federal, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57935447007>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Trabajo científico

Evaluación del efecto de las particiones del extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica* sobre la función testicular y calidad espermática en ratas macho *Wistar*

Evaluation of the effect of *Opuntia ficus-indica* methanol extract partitions on sperm quality and testicular function in male Wistar rats

Miguel A. Téllez-López,^{1,3} Jaime Fco. Treviño-Neávez,³ Ma. Julia Verde-Star,³
Javier Moran-Martínez,² Nadia Deniss Betancourt,² Luis Benjamín Serrano-Gallardo,²
Ma. Eufemia Morales-Rubio³

¹Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango

²Departamento de Biología Celular y Ultra-estructura, Centro de Investigación Biomédica de la Universidad Autónoma de Coahuila

³Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León

Resumen

Se evaluó la calidad espermática y testicular en ratas *Wistar*, tratadas con extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica* y sus particiones clorofórmica, hexánica e insoluble en cloroformo. Las ratas se dividieron en 6 grupos: control negativo, positivo y 4 tratamientos. Los niveles de testosterona del grupo tratado con la partición clorofórmica mostró disminución significativa con respecto al control negativo. Las variables espermáticas de los grupos tratados disminuyeron significativamente comparado con los controles. La morfología testicular mostró alteraciones en los grupos tratados, acentuándose alteraciones de la morfología testicular en el soluble en cloroformo. El ensayo cometa mostró, rupturas de simple cadena del ADN en los grupos tratados, presentando mayor migración los extractos solubles en cloroformo y hexano. La partición soluble en cloroformo disminuye la calidad espermática de la rata afectando su estructura testicular.

Abstract

Testicular and sperm quality in Wistar rats treated with *Opuntia ficus-indica* methanol extract and its chloroformic, hexanic and chloroformic insoluble partition were evaluated. The rats were divided into 6 groups: negative, positive and treated control. Testosterone levels in the treated group with soluble in chloroform partition showed significant decrease compared to the negative control group. Sperm variables of the treated groups were significantly decreased compared to controls. The testicular morphology showed alterations in the treated groups, accentuating morphology alterations in soluble in chloroform. The comet assay showed single strand breaks in DNA in the treated groups, showing increased migration in soluble in chloroform and hexane extracts. Soluble in chloroform partition decreases sperm and testicular quality in rat affecting its structure.

Palabras clave: actividad anticonceptiva, *Opuntia ficus-indica*, genotoxicidad, toxicidad.

Key words: contraceptive activity, *Tagetes lucida*, genotoxicity, toxicity.

Correspondencia:

Dr. Miguel Ángel Téllez López
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Autónoma de Nuevo León
Av. Corregidora #340 Ote. Col. Centro, C.P. 27000
Torreón Coahuila
Tel. (81) 83-29-41-10, Ext 6468
e-mail: mtellez@ujed.mx

Fecha de recepción: 05 de agosto de 2014

Fecha de recepción de modificaciones:

16 de enero de 2015

Fecha de aceptación: 23 de enero de 2015

Introducción

Las plantas medicinales se han utilizado desde tiempos antiguos para el tratamiento de diversas enfermedades. A pesar del gran avance observado en la medicina moderna en las últimas décadas, las plantas todavía son una fuente importante en la contribución a la salud.¹ En la actualidad muchos de los medicamentos empleados para el tratamiento de diversas enfermedades incluyendo el cáncer, son obtenidos de prototipos aislados de especies vegetales.²

Históricamente desde el siglo XIX las plantas han contribuido en el desarrollo de los anticonceptivos orales femeninos, pero la búsqueda de nuevos anticonceptivos masculinos se encuentra en una etapa incipiente.³

La regulación de la fecundidad con plantas o preparados de plantas han sido referidas en los manuscritos de la medicina tradicional de los pueblos indígenas. Un gran número de especies de plantas con efectos anticonceptivos han sido analizados en China y la India hace unos 50 años y se reforzaron posteriormente por organismos nacionales e internacionales.⁴

En México son pocas las fuentes que reportan métodos anticonceptivos tradicionales, en razón de que existen grandes prejuicios, tanto religiosos como morales, así como temor a enfermedades de transmisión sexual y trastornos que pudieran sobrevenir por su uso. Sin embargo, determinantes de tipo económico son generalmente los que propician la necesidad de prevenir un nuevo embarazo,⁵ los anticonceptivos ofrecen una forma eficaz de regular la fertilidad y proteger la salud, aunque el acceso de las parejas y los adolescentes a éstos puede verse limitado por factores como la falta de información y sus condiciones económicas.⁶ Dentro del campo de la salud reproductiva, la infertilidad implica una deficiencia que no compromete la integridad física del individuo ni amenaza su vida.⁷ Se han realizado investigaciones sobre el desarrollo de un anticonceptivo hormonal para hombres, análogos a los estrógenos y las píldoras de progesterona utilizadas con tanto éxito por las mujeres debido a que los preservativos y la vasectomía tienen cada uno deficiencias.⁸

En reproducción humana, se presenta la oportunidad de buscar en la medicina tradicional y especialmente en plantas medicinales, nuevas alternativas de regulación de la fertilidad.⁹ *Opuntia ficus-indica* es una de las muchas especies conocida como nopal. Es una planta arbustiva de la familia de las cactáceas, como la mayoría de los miembros de este género carece de hojas, los segmentos o cladodios en que se divide, son tallos capaces de ramificarse, emitiendo flores y frutos.

Dentro de sus actividades biológicas, *Opuntia ficus-indica* se ha utilizado para el tratamiento de la obesidad, ya que las fibras insolubles que contiene, crean una sensación de saciedad, haciendo que disminuya el hambre de las personas y ayudan a una buena digestión, así mismo, las proteínas vegetales promue-

ven la movilización de líquidos en el torrente sanguíneo, disminuye la celulitis y la retención de líquido.¹⁰ Otra aplicación reportada es contra la diabetes e hiperglucemia incrementando los niveles y la sensibilidad a la insulina logrando con esto estabilizar y regular el nivel de glucosa en la sangre.¹¹ En personas con colesterol elevado se ha demostrado que el consumo de nopal, ayuda a eliminarlo evitando que se absorba gran parte de éste y así no se acumula en venas y arterias. Contiene antibióticos naturales, esta propiedad está relacionada con el metabolismo del ácido crasuláceo de las plantas, el cual, en las cactáceas inhibe el crecimiento de varias especies bacterianas. De ahí que tanto el consumo del nopal como la aplicación de cataplasmas de pencas de nopal tengan efectos benéficos en heridas e infecciones de la piel. También se ha reportado el uso de esta planta contra el cáncer,¹⁰ desórdenes gastrointestinales y digestión y como abortivo.¹²

Sin embargo estudios sobre la fertilidad masculina en esta especie no se han reportado a la fecha o no han trascendido en la literatura científica.

En estudios realizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) se encontró que entre el 45 y el 71 por ciento de los hombres aceptarían usar un anticonceptivo masculino seguro, reversible, conveniente y sin cirugía, que se podría utilizar por separado de las relaciones sexuales,¹ por tal motivo y con el interés de profundizar en el conocimiento del empleo de plantas con propiedades biológicas, se evaluó la actividad de *Opuntia ficus-indica* sobre la función testicular y calidad espermática en ratas macho Wistar.

Material y método

Material biológico

Vegetal

Las partes aéreas de *Opuntia ficus-indica* se recolectaron dentro de las instalaciones de la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas en Bermejillo, Durango ubicada en la Latitud 25.894259°, Longitud 103.602911° (API Google Maps). Un ejemplar fue montado en prensa botánica y se depositó en el Herbario de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro para su autenticación, quedó registrado con el Boucher # 009/2012.

Animales de experimentación

Las ratas macho Wistar fueron adquiridas en la empresa Harlam, Laboratories, SA de CV (México, DF) y mantenidas en el Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Coahuila. La edad de los animales fue seleccionada de acuerdo a los eventos de maduración en el ciclo reproductivo de la rata.¹³ Para cumplir con los lineamientos internacionales sobre el uso adecuado de los animales de experimentación y cumplir con la NOM-062-ZOO-1999¹⁴ el

protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Coahuila.

Obtención de extractos

El material vegetal se colocó en un desecador con aireación por un periodo de 5 días a 45 °C, una vez seco se molió en un molino mecánico (Wiley®) obteniendo un polvo fino.¹⁵

Para la obtención del extracto metanólico se pesaron en una balanza analítica (Ohaus®) 30 g de material vegetal seco triturado y se adicionaron 300 mL de metanol (CTR Scientific®) grado reactivo en un matraz Erlenmeyer, se tapó con papel parafilm y se agitó a baja velocidad en un agitador (Dual Action Shaker Lab- Line®) y temperatura ambiente por 24 h, el macerado se filtró en papel filtro (Whatman International LTD®, England) de poro grueso en matraz Kitazato con bomba de vacío (Auto Science®), repitiendo el proceso tres veces utilizando la misma cantidad de solvente nuevo en cada ocasión. El filtrado del macerado se destiló en un Rotaevaporador (LEV211-V®), para separar el solvente el extracto crudo se llevó a sequedad completa en una estufa de aire caliente (Riossa®) a temperatura menor a 50 °C. Los extractos secos se almacenaron en refrigeración a 4 °C en frasco ámbar hasta su utilización.^{15,16}

Diseño experimental

Las ratas Wistar se mantuvieron bajo condiciones controladas de ciclos de 12/12 h luz/obscuridad, temperatura de 22 ± 2 °C, humedad relativa de 35-60 %, alimento para ratas Harlam® con 18 % de proteína y con acceso de agua ad libitum hasta su maduración en el ciclo reproductivo y durante el experimento. Se formaron seis grupos al azar de seis animales cada uno. Los extractos se diluyeron en agua destilada y fueron administrados diariamente vida oral, por 45 d en los grupos 1, 2, 3 y 4, al grupo cinco se le administró undecanoato de testosterona (dosis única) y al seis agua estéril vía oral por 45 d. Al grupo 1 (extracto metanólico crudo de *Opuntia ficus-indica*), se les suministró 50 mg/kg.

Al grupo 2 (partición insoluble en cloroformo del extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica*), se les administró 48.4 mg/kg. Al grupo 3 (partición soluble en hexano del extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica*), se les administró 1.345 mg/kg. Al grupo 4 (partición soluble en cloroformo del extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica*), se les administró 0.2515 mg/kg. Al grupo 5 (grupo control positivo), se les administró 50 mg/kg de Undecanoato de testosterona diluido con aceite de oliva extra virgen estéril por vía intramuscular en dosis única. Al grupo 6 (grupo control negativo), se les administró 1 mL de agua destilada estéril (vehículo) diariamente por vía oral durante 45 d.

Obtención de las particiones a partir del extracto metanólico crudo

El extracto metanólico crudo de *Opuntia ficus-indica* se sometió a calentamiento en un vaso de precipitado con 50 mL de hexano, agitándolo constantemente hasta el punto de ebullición durante 5 min, posterior al calentamiento se filtró la porción soluble en hexano y a la parte insoluble en hexano se le volvió a adicionar solvente volviendo a repetir el paso anterior hasta obtener un líquido claro, el filtrado se llevó a concentración con el rota-evaporador.

Una vez que se obtuvo el mayor contenido de compuestos solubles en hexano, a la parte que no se solubilizó con hexano se le adicionarán 50 mL de cloroformo repitiendo el mismo procedimiento que con el hexano, obteniendo de esta manera las particiones soluble en hexano, soluble en cloroformo e insoluble en cloroformo

Toxicidad del extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica* sobre *A. salina*

Se valoró la actividad tóxica del extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica* con nauplios de *Artemia salina* por el método descrito por Meyer y colaboradores (1982),¹⁷ modificado por Molina-Salinas y Said-Fernández (2006).¹⁸

Se utilizaron cinco concentraciones (50-1000 µg/mL) de extracto con cinco repeticiones. Como control positivo se utilizó dicromato de potasio a concentración de 400 ppm¹⁹ y agua de mar como control negativo. Después de 24 h y con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Labomed®), se contaron los nauplios vivos y muertos por concentración, y se calculó la dosis letal media (DL₅₀) del extracto utilizando el método estadístico Probit de Finney.²⁰

Evaluación de los niveles séricos de testosterona en ratas macho Wistar

Transcurridos los 45 días de administración oral del extracto y controles, se sacrificaron los animales por dislocación cervical. Se extrajo 1 mL de sangre por punción cardiaca, se obtuvo el suero sanguíneo dejando coagular la muestra durante 2 h a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó por 20 min a 1000 rpm. Se removió el suero y se almacenó a -20 °C para su posterior análisis.

La determinación de testosterona se llevó a cabo con la técnica de ELISA con kits comerciales (NovaTein Biosciences®) según el protocolo y se obtuvo la lectura de las absorbancias con un lector de placas de ELISA modelo WH100.²¹

Evaluación de los parámetros de la calidad espermática

Posterior a una incisión abdominal de las ratas se obtuvo semen de los vasos deferentes y de la parte terminal de los epidídimos con la retracción del escroto, cortando el epidídimo. La región más caudal de los epidídimos y los conductos deferentes se colocaron en una placa de Petri con 2 mL de solución de NaCl

al 0.9 % a 4 °C, con una aguja calibre 30 G se realizaron perforaciones para facilitar la dispersión del esperma. Se determinó la concentración espermática en cámara de Neubauer siguiendo el procedimiento utilizado para el conteo de glóbulos rojos, la cantidad de espermatozoides por macho se expresó en millones/mL de suspensión. La morfología se evaluó en alícuotas de suspensión fijadas en formol y extendida en un portaobjetos, se tiñeron con eosina y se examinaron bajo microscopio óptico a 1000 aumentos. Por cada macho se analizaron 100 espermatozoides identificando normales y no normales.^{22,23}

Las células consideradas morfológicamente anormales fueron aquellas que presentaron cabeza triangular, colapsada o en martillo, presencia de curvatura a nivel de la pieza intermedia, cola rectilínea o con curvatura en distintos grados tanto en la porción media como distal.²⁴

Los parámetros de motilidad de los espermatozoides se valoraron a partir del semen obtenido de las ratas conteniendo 1mL de medio Holding Plus (Bioniche, Pullman®, WA, USA). Las placas Petri se mantuvieron a 37 °C en baño María por 10 min. Se cargó una alícuota de cada muestra en una cámara de Makler de 20 mL y se observaron 6 campos.

Electroforesis en gel de células individuales (Ensayo cometa)

El ensayo cometa es una técnica en microgeles que involucra la electroforesis alcalina (pH 13) para detectar el daño al DNA en células individuales; se refiere a la migración del DNA en una matriz de agarosa bajo condiciones de electroforesis, que al ser observada la célula al microscopio, por fluorescencia o tinción con plata, presenta la apariencia de un cometa, con una cabeza, región nuclear, y cola, formada por fragmentos nucleares que han migrado en dirección del ánodo, por lo que es conocido como Ensayo Cometa, debido al patrón de migración del DNA que se produce. En las ratas macho en estudio se evaluaron 5×10^5 espermatozoides/mL ajustados y suspendidos en agarosa (CONDA®) de bajo punto de fusión al 0.5 % en láminas portaobjetos pre-tratadas con 100 µL de agarosa de punto de fusión normal (CONDA®) al 0.5 %, se incubaron 10 min a temperatura ambiente, los portaobjetos se colocaron en solución de lisis número 1 (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 10 % DMSO y 1 % de Triton X 100) a un pH 10.0 a 4 °C durante 4 h. Posteriormente los portaobjetos se depositaron en solución de lisis número 2 (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂ EDTA, 10 mM Tris, 200 µg/mL de proteinasa K y 300 mM de DTT) con pH 7.4, a 37.5 °C durante 18 h. Terminada la lisis número 2, se incubaron en tampón de electroforesis (NaOH 0.3 M, EDTA 200 mM) a pH 13.0 a 4 °C durante 10 min en cuarto oscuro. Luego se realizó una corrida electroforética a 25 V y 100 mA/10 min. Se lavaron los portaobjetos con tampón neutralizante (0.4 M Tris-HCl; pH 7.5) y se deshidrataron con metanol puro.

Una vez secas se sometieron a tinción con bromuro de etidio (SIGMA®) 35µL a 4X, se observó en microscopio de fluorescencia (Labomed® LX-400) a 40X.

Se midió la longitud de la migración de 100 células por cada rata por medio del Software Comet Assay IV®.

Evaluación histológica de testículo de rata

Después del periodo de tratamiento de las ratas macho se tomaron muestras de testículo y se procesaron por la técnica convencional histológica hasta su inclusión en bloques de parafina. Se obtuvieron en microtomo cortes histológicos de 5 µm de grosor que se tiñeron con Hematoxilina- Eosina (H y E) para su evaluación histológica general. Las muestras se analizaron con microscopio de luz.²⁶

Resultados y discusión

La especie vegetal seleccionada para este estudio fue elegida en base a estudios previos sobre la actividad biológica, aplicación etnofarmacológica y por su distribución en la Región de la Comarca Lagunera de Durango, al Norte de México. Se sabe que determinados rangos de temperatura e intensidad lumínica intervienen de manera directa en el comportamiento de estas plantas, tanto en su crecimiento y desarrollo, como en la biosíntesis de los principios activos.²⁷

Un ejemplar vegetal debidamente prensada fue entregada para su identificación al Herbario de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro el cual extendió el Boucher # 009/2012. Los rendimientos del extracto metanólico crudo de *Opuntia ficus-indica* y sus particiones se muestran en la tabla 1, Barbosa y colaboradores en 2009,²⁸ realizaron particiones de un extracto crudo hidroalcohólico de *Ruta chalepensis*, el cual fue administrado en relación al porcentaje de rendimiento obtenido en cada partición con respecto al extracto crudo, al igual que en esta investigación, la partición que obtuvo menor rendimiento, fue la partición con menor polaridad y el solvente con mayor polaridad fue el que mostró mayor rendimiento, esto debido a que los extractos crudos fueron probados con solventes de alta polaridad.

Tabla 1. Rendimiento del extracto metanólico crudo y sus particiones de *Opuntia ficus-indica*

Partición	% Rendimiento
Extracto metanólico	6.12
Insoluble en cloroformo	96.8
Soluble en hexano	2.69
Soluble en cloroformo	0.503

%= porcentaje

Con respecto al ensayo de letalidad sobre *A. salina*, los valores obtenidos de la DL₅₀ para todos los extractos fueron superiores a 1,000 µg/mL, la técnica empleada ha sido ampliamente utilizada para seleccionar extractos crudos con posible actividad biológica ya que el crustáceo es sensible a un amplio rango de compuestos.^{17,31,32,33,34,35,36} Se ha determinado que este ensayo tiene una posible correlación con la pruebas específicas de toxicidad,³⁷ lo cual indica que el extracto no es tóxico según el criterio de Lagarto-Parra y colaboradores, (2001)³⁸ y según la escala de Déciga-Campos (2010).³⁹ Considerando estos criterios se puede establecer un futuro prometedor de *Opuntia ficus-indica*, ya que demostró actividad biológica contra la calidad espermática y menor toxicidad contra los nauplios de *A. salina* y ha sido empleado como alimento desde tiempos ancestrales hasta la actualidad sin presentar reportes de toxicidad.

Durante el estudio se midió el comportamiento del peso corporal de las ratas tratadas y controles (tabla 2) en intervalos de tiempo de 1 semana cada medición, observándose que en los grupos administrados con el extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica* y la partición insoluble en cloroformo con respecto al control negativo, mostraron una disminución en la tendencia del incremento de peso corporal. Grube y colaboradores en 2013, reportan el efecto sobre la disminución de peso corporal en pacientes administrados con una fibra aislada de *Opuntia ficus-indica* sin reportar efectos secundarios en los pacientes,⁴⁰ de la misma forma pero en un experimento en ratas Ennouri y colaboradores en 2006, observaron la disminución de colesterol, proteínas de baja densidad y disminución de peso corporal, sin reportar alteraciones en el estado de salud de los animales de experimentación,⁴¹ ambas investigaciones mantienen una relación estrecha con estos grupos ya que aparentemente no se ve comprometida la salud de las unidades experimentales con la administración de *Opuntia ficus-indica*.

En la tabla 3 se muestran los pesos y la longitud de los testículos tomados de las ratas al término del experimento; en la cual observamos diferencia entre los promedios de la longitud y peso de los testículos, en el grupo 4 se observa un aumento en el crecimiento de los testículos con respecto a los grupos control, en el grupo 1,2 y 3 existe una disminución en la longitud y peso de los testículos con respecto al grupo control, es de destacar que en el grupo 1 se observa una relación estrecha entre la disminución de los niveles de testosterona y el tamaño y peso de los testículos, estos resultados son similares a los que se encontró con el extracto de semilla de *Madhuca latifolia*, donde se reportó la disminución del tamaño de los testículos en ratas, en concordancia con la disminución en los niveles plasmáticos de testosterona.³ Otro estudio mostró que la administración del extracto de semilla de *Abrus precatorius* en ratones machos ocasionó una disminución significativa del peso del testículo y del epidídimo en ratones con respecto al control, lo cual pudo

ser atribuido a la pérdida de espermatozoides en los testículos,¹ observándose en ésta investigación que la estructura testicular se ve afectada, al igual que los parámetros de peso y longitud del testículo.

Tabla 2. Peso corporal promedio de los animales en estudio en diversos intervalos de tiempo

Grupo	Periodo de tiempo						
	1	2	3	4	5	6	7
I. Extracto metanólico	239	245	252	260	266	277	285
II. Insoluble en cloroformo	171	173	229	241.7	252	264	275
III.Soluble en hexano	174.4	199	208	229	239	246	260
IV.Soluble cloroformo	181.1	232.6	264.6	280.2	298.5	309.2	336.4
V. Control negativo	142.8	225.7	261.6	283.5	305.0	321.4	349.2
VI.Control positivo	170.0	246.4	280.6	295.2	318.34	331.4	360.8

Los valores están representados en las medias de los gramos por seis animales (n=6) por grupo.

Cada periodo equivale a siete días con un total de 45 días de exposición a controles y tratamiento.

Se encontró diferencia entre los tratamientos p<0.05 con respecto al control negativo, excepto en el grupo soluble en cloroformo

Tabla 3. Niveles séricos de Testosterona, longitud y peso de testículos de ratas tratadas y controles

Grupo	Peso Testículo I	Peso Testículo II	Longitud Testículo I	Longitud Testículo II	Testosterona
	g	g	cm	cm	ng/mL
I. Extracto metanólico	1.147	1.127	1.79	1.80	1.133
II. Insoluble en cloroformo	1.08	1.06	1.79	1.80	4.29
III.Soluble en hexano	1.17	1.17	1.77	1.76	3.72
IV.Soluble cloroformo	1.55	1.56	2.12	2.10	1.94
V. Control negativo	1.53	1.55	1.99	1.97	3.012
VI.Control positivo	1.51	1.55	1.91	1.93	3.79

Los valores están representados en medias por seis animales (n=6) por grupo.

Se encontró diferencia entre los tratamientos p<0.05

g= gramos; cm= centímetros; ng/mL= nanogramos por mililitro

En los grupos 2 y 3 se observa un aumento en los niveles de testosterona con respecto al grupo control negativo y la longitud y peso de los testículos se ve disminuido, existe evidencia de

que altos niveles de testosterona en el cuerpo pueden ocasionar encogimiento de los testículos.

En la tabla 4, se muestran los resultados de la evaluación de la calidad espermática: concentración, motilidad, viabilidad espermática, así como el ensayo cometa donde se evaluó el daño en las cadenas de ADN del núcleo de los espermatozoides; parámetros andrológicos que son evaluados para determinar la fertilidad de un sujeto masculino,⁴⁰ observándose en el grupo administrado con el extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica* una disminución marcada en la concentración, motilidad y viabilidad espermática así como un aumento en los niveles de migración de las cadenas de ADN de los espermatozoides, existiendo una diferencia significativa con respecto al control negativo. Este grupo presentó una concentración espermática de 10.8 millones de espermatozoides por mL y el grupo control negativo 28.20 millones de espermatozoides por mL, solo el 31.8 % de estas células se encontraban vivas, en cuanto al control negativo el 75 % de las células presentaron vida, la motilidad o movimiento progresivo que presentó el grupo 1 fue de 28.6 % y el control negativo presento un movimiento progresivo de 78.20 %, al evaluar por medio del ensayo cometa las células individuales del grupo administrado con el extracto metanólico de *Opuntia*, observamos que el promedio de la longitud de migración de este grupo fue de 13521 μm , en la figura 1 se muestran las imágenes de las células individuales espermáticas de los grupos control y tratados, imágenes de las cuales se obtuvo la distancia de migración que se presenta en la tabla 4.

Tabla 4. Evaluación de parámetros de calidad espermática: concentración, motilidad, viabilidad espermática y nivel de daño en las cadenas de ADN del núcleo de los espermatozoides

Grupo	Motilidad espermática %	Densidad espermática millones/mL	Viabilidad espermática %	Migración de ADN μm
I. Extracto metanólico	28.6	10.8	31.8	13521
II. Insoluble en cloroformo	52.83	11.13	53.16	1373
III. Soluble en hexano	56.6	19.06	58.83	7688
IV. Soluble cloroformo	37.33	27.28	39.83	13221
V. Control negativo	78.20	28.20	75.60	1202
VI. Control positivo	60.80	29.00	48	7711

%= por ciento; millones/mL= millones por mililitro; μm = micrómetros

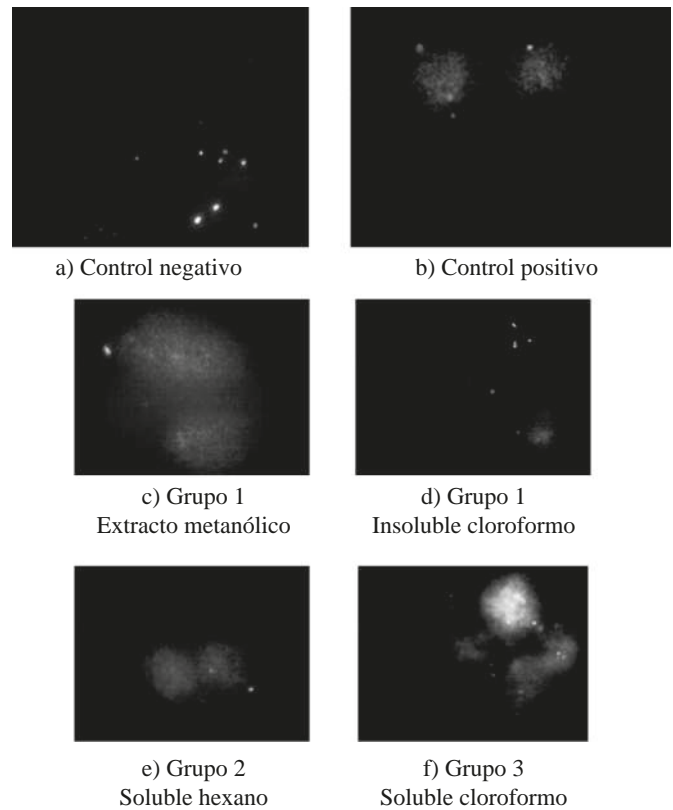


Figura 1. Ensayo cometa, fragmentación de ADN, en células espermáticas de rata macho *Wistar* con administración oral del extracto metanólico crudo de *Opuntia ficus-indica* y sus particiones. a) Control negativo; núcleo de células espermáticas sin daño, se aprecia la integridad del material genético. b) Control positivo; células con fragmentación de ADN. c) Grupo administrado con el extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica*; se observa el ADN fragmentado, con frecuencia importante de rupturas de cadena sencilla en el ADN, se aprecia la dispersión del material genético de la célula. d) Grupo administrado con la partición insoluble en cloroformo; núcleo de células espermáticas con baja frecuencia de daño, se aprecia la integridad del material genético. e) grupo administrado con la partición soluble en hexano; células con fragmentación de ADN y f) grupo administrado con la partición soluble en cloroformo; se observa el ADN fragmentado, con alta frecuencia de rupturas de cadena sencilla en el ADN, se aprecia la dispersión del material genético de la célula.

La partición clorofórmica disminuyó significativamente la concentración espermática, la motilidad y la viabilidad espermática, así mismo los niveles de testosterona en suero presentan una disminución significativa con respecto a los controles (tabla 4). El nivel de daño observado en las cadenas de ADN de las células espermáticas del grupo tratado con la partición clorofórmica, presenta altas rupturas, con un promedio de migración de 13221 μm , lo que se traduce como niveles altos de migración de ADN. En un trabajo con ratas donde

se administró extracto etanólico de *Lagenaria breviflora*,⁴⁰ los espermatozoides presentaron anomalías en la morfología pero la viabilidad de las células estaban dentro del rango de las ratas control, lo que demuestra que el extracto no afectó la viabilidad de espermatozoides pero causó la deformación de las células afectando su movilidad; caso contrario a este estudio donde los parámetros de la concentración espermática, motilidad y viabilidad fueron afectados significativamente en comparación con el grupo control. Otro reporte pero con extracto etanólico al 50 % de la raíz de *Martynia annua* dio como resultado un nulo conteo de los espermatozoides testiculares y epididimales causando lesiones en los túbulos seminíferos relacionados con la dosis administrada.⁴ En una investigación realizada en ratas *Sprague Dawley* donde se comparó la respuesta de ciclofosfamida (CF) y bleomicina (BL) se observó un efecto mutagénico de ambos compuestos, obteniéndose cabezas de espermatozoides anómalas con la CF en comparación con la BL, a la misma dosis, diseño y vía utilizada, observándose a la vez una disminución en la concentración espermática,⁴¹ lo cual refleja resultados similares a esta investigación. Ratas macho administradas con nanopartículas de plata de diferente tamaño y bajo diferentes tiempos de exposición reveló que estas causaron disminución en el conteo de espermatozoides, en paralelo aumentó los niveles de daños en células espermáticas evaluadas por electroforesis en gel de células individuales, la morfología espermática se vio comprometida⁴² observándose gran similitud en los resultados encontrados en nuestra investigación, a razón que de una menor viabilidad y motilidad se aumenta el nivel de daño en las dobles cadenas de ADN espermático.

En la figura 2, se muestran las micrografías de cortes histológicos de testículos de ratas Wistar, en el grupo control negativo se observa una morfología normal con una elevada densidad de células espermáticas, no se observó vacuolización y se observaron límites celulares bien definidos y estructura de la apariencia histológica normal; en el grupo control positivo y el grupo 1, se observa una inhibición de la espermatogénesis, daño generalizado en el tejido testicular, presencia de abundantes vacuolas, signos de necrosis y alteración de la arquitectura testicular normal caracterizada por la desorganización y amplias zonas carentes de células; en el grupo 2 se observa una disminución en la densidad de células espermáticas en el haz de luz de los túbulos seminíferos, presencia de abundantes vacuolas, desorganización y amplias zonas carentes de células. En el grupo 3 y 4 la densidad espermática con respecto a los grupos 1 y 2 se encuentra aumentada, así mismo se observa en estos grupos una vacuolización de la estructura testicular. En un estudio similar pero con el extracto metanólico de *Tagetes lucida*⁴³ se reportó que la estructura testicular al igual que en esta investigación se veía comprometida, observando una relación estrecha entre la

concentración espermática y la densidad espermática observada en el haz de luz de los túbulos seminíferos.

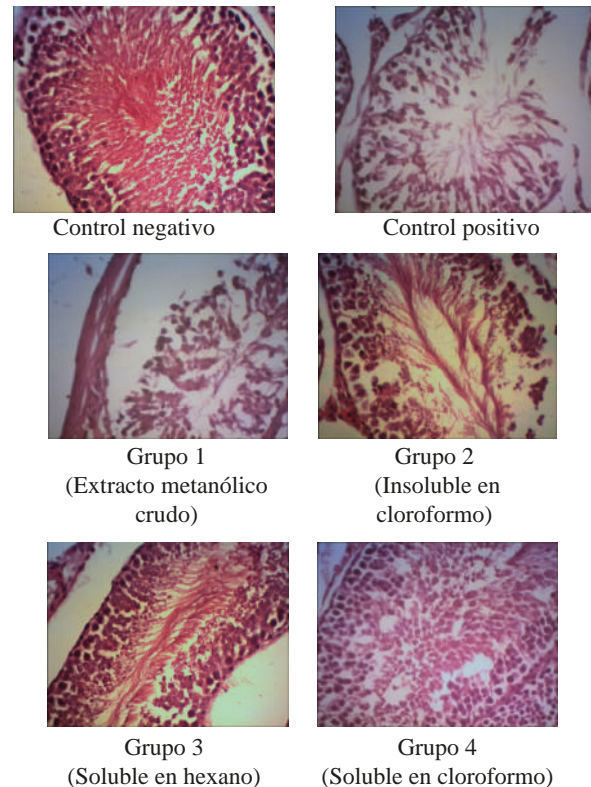


Figura 2. Cortes histológicos de testículo de las ratas tratadas con el extracto metanólico y sus particiones de *Opuntia ficus-indica* y controles.

Grupo control negativo: se observa una morfología normal con una elevada densidad de células espermáticas, no se observó vacuolización y se observaron límites celulares bien definidos y estructura de la apariencia histológica normal; **Grupo control positivo y grupo 1:** se observa una inhibición de la espermatogénesis, daño generalizado en el tejido testicular, presencia de abundantes vacuolas, signos de necrosis y alteración de la arquitectura testicular normal caracterizada por la desorganización y amplias zonas carentes de células; **Grupo 2:** se observa una disminución en la densidad de células espermáticas en el haz de luz de los túbulos seminíferos, presencia de abundantes vacuolas, desorganización y amplias zonas carentes de células; **Grupo 3 y 4:** la densidad espermática con respecto a los grupos 1 y 2 se encuentra aumentada, así mismo se observa en estos grupos una vacuolización de la estructura testicular.

Conclusiones

La administración oral del extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica* a ratas macho Wistar produjeron efectos en la calidad espermática y estructura testicular, específicamente en los túbulos seminíferos. Así mismo la partición soluble en clo-

roformo y soluble en hexano, realizadas al extracto metanólico alteraron los parámetros de la calidad espermática y la estructura testicular. Probablemente los compuestos presentes en el extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica* tengan influencia inhibitoria sobre la liberación de las hormonas gonadotrópicas las cuales a su vez son las responsables de la producción de testosterona por lo que al verse afectadas dichas hormonas, se produce una disminución de la producción de testosterona, lo que conduce a cambios en la espermatogénesis contrastada con la afectación de la concentración espermática, viabilidad y motilidad así mismo el daño en la estructura testicular, aunado a su efecto genotóxico. Se proponen estudios complementarios para evaluar completamente la fertilidad y reversibilidad con este extracto y otras fracciones de esta planta.

Agradecimientos

CONACYT por la beca otorgada 305943

Referencias

- Bhatt N, Chaela SL, Rao MV. Contraceptive evaluation of seed extract of *Abrus precatorius* (L.) in male mice (*Mus musculus*). J Herb Med Toxicol. 2007; 1(1): 47-50.
- Téllez-López MA, Ávalos-Soto J, Morán-Martínez J, Hernández-González S, Treviño-Neávez JF, Verde-Star MJ, Serrano-Gallardo LB, Morales-Rubio ME. Evaluación de la Toxicidad del extracto etanólico de *Lippia graveolens* H.B.K. por ensayo de *Artemia salina* en microplaca. Rev Med de Torreón (México). 2011; 3(2):28-29.
- Gopalkrishnan B, Shimpi SN. Antifertility effect of *Madhuca latifolia* (ROXB.) macbride seed extract. IJABPT. 2011; 2(4):50-53.
- Mali PC, Ansari AS, Chaturvedi M. Antifertility effect of chronically administered *Martynia annua* root extract on male rats. J Ethnopharmacol. 2002; 82(2-3): 61-67.
- Universidad Nacional Autónoma de México. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. 2009. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/termino.php?l=&t=anticonceptivo&id=1611>. Acceso 21 Mar 2013.
- Álvarez-Gómez AM, Cardona-Maya WD, Castro-Álvarez JF, Jiménez S, Cadavid A. Nuevas opciones en anticoncepción: posible uso espermicida de plantas colombianas. Actas Urol Esp. 2007; 31(4):372-381.
- Brugo-Olmedo S, Chillik C, Kopelman S. Definición y causa de la infertilidad. Rev Colomb Obstet Ginecol. 2003; 54(4):227-248.
- Amory JK, Page ST, Bremner WJ. Drug insight: recent advances in male hormonal contraception. Nat Clin Pract Endocrinol Metab. 2006; 2(1):32-41.
- Talwar GP, Raghuvanshi P, Misra R, Mukherjee S, Poonam R, Shah S. Plant immunomodulators for termination of unwanted pregnancy and for contraception and reproductive health. Immunology and Cell Biology. 1997; 75: 190-192.
- Fernández-López JA, Almela L, Obón JM, Castellar R. Determination of antioxidant constituents in cactus pear fruits. Plant Foods Hum Nutr. 2010; 65(3):253-9.
- Butterweck V, Semlin L, Feistel B, Pischel I, Bauer K, Verspohl EJ. Comparative evaluation of two different *Opuntia ficus-indica* extracts for blood sugar lowering effects in rats. Phytother Res. 2010.
- Márquez A C, F Lara O, B Esquivel R, R Mata E. Plantas medicinales de México II. Composición, usos y actividad biológica. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 1999.
- Sharp PE, La Regina MC. The laboratory rat. CRS press LLC. 1998.
- SAGARPA. 1999. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Navarro GV, Rojas G, Zepeda GL, Avilés M, Fuentes M, Herrera AJE. Antifungal and antibacterial activity of four selected mexican medicinal plants. Pharm Biol. 2006; 44(4):297-300.
- Nostro A, Germano MP, D'Angelo V, Marino A, Cannatelli. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. Lett Appl Microbiol. 2000; 30(5):379-384.
- Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plants constituents. Plant Med. 1982; 45(19):31-34.
- Molina-Salinas G, Fernández-Said S. A modified microplate cytotoxicity assay with brine shrimp larvae (*Artemia salina*). Pharmacologyonline. 2006; 3: 633-638.
- Vega-Menchaca MC, Verde-Star J, Oranday-Cárdenas A, Morales-Rubio ME, Núñez-González A, Rivera-Guillen MA, Serrano-Gallardo LB, Rivas-Morales C. Actividad antibacteriana y citotóxica de *Leucophyllum frutescens* (Berl) I.M. Johnst del Norte de México contra *Staphylococcus aureus* de aislados clínicos. Rev Mex Cienc Farm. 2013; 44(2):24-30.
- Anderson JE, Goetz CM, McLaughlin JL, Suffness M. A blind comparison of simple bench-top bioassay and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. Phytochem Analysis. 1991; 2:107-111.
- NovaTein Biosciences. Rat Testosterone ELISA Kit. Catálogo NB-E30597.
- De la Cruz RWF, Luján MKM, Miranda SUE. Efectos del malathion sobre la espermatogénesis de ratones machos jóvenes de la cepa BALBC53. ECIPERU. 2004; 1(1):17-19.

23. Sobarzo C, Bustos-Obregon E. Acute effect of Parathion on the seminiferous epithelium of immature mice. *Rev Chil Anat.* 2000; 18(1):61-68.
24. Kawai Y, Hata T, Suzuki O, Matsuda J. The relationship between sperm morphology and *in vitro* fertilization ability in mice. *J Reprod Dev.* 2006; 52(4):561-568.
25. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol.* 2004; 26(3):249-261.
26. Meena R, Misro MM, Ghosh D, Nandan D. Extended intervention time and evaluation of sperm suppression by dienogest plus testosterone undecanoate in male rat. *Contraception.* 2012; 85(1):113-121.
27. Acosta de la LL, Hechevarría S I, Rodríguez FC, Milanés FM. Momento óptimo de plantación y de cosecha en *Tagetes lucida* Cav. *Rev Cubana Plant Med.* 2011; 16(2):201-208.
28. Barboza J, Hilje L, Durón J, Cartín V, Calvo M. Fagodisuasión de un extracto de ruda (*Ruta chalepensis*, Rutaceae) y sus particiones sobre larvas de *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Rev Biol Trop.* 2010; 58(1): 1-14.
29. Bastos MLA, Lima MRF, Conserva LM, Andrade VS, Rocha EMM, Lemos RPL. Studies on the antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bur. (Bignoniaceae) extracts and their main constituents. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.* 2009; 8(16): 1-6.
30. Almeida-Alves TM, Fonseca-Silva A, Brandão M, Mesquita-Grandi TS, Smânia EF, Júnior AS, Zani CL. Biological screening of brazilian medicinal plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2000; 95:367-373.
31. Masseur AY and Nshimo CM. Brine shrimp bioassay for biological activity of medicinal plants used in traditional medicines in Tanzania. *East African Medical Journal.* 1995; 72:661-663.
32. Solís PN, Wright CW, Anderson MM, Gupta MP, Phillipson JD. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina*. *Plant Med.* 1993; 59:250-252.
33. Nieto I, Salama A, Cataño J, Chegwin C. Determinación de la toxicidad de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Paxillus involutus* sobre *Artemia salina*. *Rev Iberoamericana Micología.* 2008; 25:186-187.
34. Vanhaecke P, Persoone G, Claus C, Sorgeloos P. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. *Ecotoxicol Env Safety.* 1998; 5:382-387.
35. McLaughlin JL, Chang Ch, Smith DL. Simple bioassay for the detection and isolation of bioactive natural products. Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, School of Pharmacy and Pharmacal Sciences, Purdue University, West Lafayette, IN 47907, USA. 1988.
36. Lagarto-Parra A, Silva-Yhebra R, Guerra Sardiñas I, Iglesias Buela L. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀) in mice in order to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine.* 2001; 8(5): 395-400.
37. Déciga-Campos M., Rivero-Cruz I., Arriaga-Alba M., Castañeda-Corral G., Angeles-López G.E., Naverrete A., Mata R. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.* 2007; 110: 334-342.
38. Grube B, Chong PW, Lau KZ, Orzechowski HD. A natural fiber complex reduces body weight in the overweight and obese: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. 2013; 21(1):58-64.
39. Ennouri M, Fetoui H, Bourret E, Zeghal N, Attia H. Evaluation of some biological parameters of *Opuntia ficus indica*. Influence of a seed oil supplemented diet on rats. 2006; 97(12):1382-6.
40. Saba AB, Oridupa OA, Oyeyemi MO, Osanyigbe OD. Spermatozoa morphology and characteristics of male wistar rats administered with ethanolic extract of *Lagenaria breviflora* Roberts. *Afr J Biotechnol.* 2009; 8(7):1170.
41. Arencibia AD, Rosario FL. Respuesta de ratones Balb/c frente a ciclofosfamida y bleomicina en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide. *REDVET.* 2011; 12(2):1-11.
42. Gromadzka-Ostrowska J, Dziendzikowska K, Lankoff A, Dobrzyńska M, Instanes C, Brunborg G, Gajownik A, Radzikowska J, Wojewódzka M, Kruszewski M. Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats. *Toxicol Lett.* 2012; 15; 214(3):251-258.
43. Téllez-López MA, Treviño-Neávez JF, Verde-Star J, Rivas-Morales C, Oranday-Cárdenas A, Morán-Martínez J, Serrano-Gallardo LB, Morales-Rubio ME. Evaluación del efecto del extracto metanólico de *Tagetes lucida* sobre la función testicular y calidad espermática en ratas macho Wistar. *Rev Mex Cienc Farm.* 2013; 44(4): 43-52.

Full Length Research Paper

Testicular damage in Wistar rats caused by methanolic extracts of plants from the North of Mexico

Rubén García Garza¹, Adolfo Soto Domínguez², Miguel Angel Tellez López³, Nadia Denys Betancourt Martínez¹, Ruben Daniel Arellano Perez-Vertti¹, Carlos Leyva Orasma⁴, Benjamín Serrano Gallardo⁵ and Javier Morán Martínez^{1*}

¹Departamento de Biología Celular y Ultraestructura, Centro de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Coahuila, Unidad Torreón. Av. Gregorio A. García 198 Sur, Torreón, Coahuila. México. C.P. 27000, Mexico.

²Departamento de Histología. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Madero y E. Aguirre-Pequeño, Monterrey, Nuevo León, México. A. P.1563, Mexico.

³Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango. Av. Art. 123 s/n, Fraccionamiento Filadelfia, Gómez Palacio Durango, México.

⁴Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad laguna, Periférico Raúl López Sánchez y Carretera a Santa Fé, C.P 27054, Torreón, Coahuila, México.

⁵Departamento de Bioquímica y Farmacología, Centro de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Coahuila, Unidad Torreón. Av. Gregorio A. García 198 Sur, Torreón, Coahuila, C.P. 27000, México.

Received 24 May, 2015; Accepted 25 June, 2015

The aim of this study was to evaluate the effect of methanolic extract of plants from the north of Mexico, on testicular morphology and spermatid quality in Wistar rats. Methanolic extracts were orally administered to 4 experimental groups (n=6) of rat for 30 days; a control group not treated with plant extract was included. All animals were sacrificed 24 h after the last dose. Samples of testicles were collected, fixed, processed by histological technique and embedded in paraffin blocks. Histological sections were stained with H&E, Masson's trichrome and histochemical PAS reaction with diastase. Results of the groups treated with methanolic extract of *Tagetes lucida*, *Cynodon dactylon*, *Lippia graveolens* HBK, and *Opuntia ficus-indica* testicle samples demonstrated epithelial detachment and cell fragmentation, an apparent decrease in the diameter of seminiferous tubules, with large empty spaces between them and areas with fragmentation of basal membrane. Sperm quality analysis (concentration, motility and viability) showed a significant decrease of these spermatid parameters in all treated groups. In conclusion, this paper demonstrated for the first time that methanolic extracts from plants of the north of Mexico, have toxic effect on testicle and affects spermatid parameters of Wistar rats.

Key words: Plants, testicle, spermatid quality, methanolic extract, Wistar rat, toxicity.

INTRODUCTION

In traditional medicine, plants have been used for hundreds of years to treat a wide variety of health-related

*Corresponding author. E-mail: javmoran@yahoo.com.

Author(s) agree that this article remain permanently open access under the terms of the [Creative Commons Attribution License 4.0 International License](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

disorders. The scientific research of plants used in traditional medicine with a multidisciplinary approach has increased worldwide, with more than 13,000 superior plants having been studied in the past five years, leading to sufficient scientific evidence on the pharmacological properties of these plants (Dahanukar et al., 2000). With this knowledge, the pharmaceutical industry has synthesized from active compounds isolated from plants. About 25% of the most successful drugs in the market are aspirin and tamoxifen (Tripathi, 2005). Numerous plants used frequently in traditional medicine have shown effects like antioxidant and antimutagenic activities (Lee et al., 2002; Martínez-Rocha et al., 2008), antidiabetic activity (Frati et al., 1990; Singh et al., 2007, 2008; Jarald et al., 2008), neuroprotective and antidepressant effect (Dok-Go et al., 2003; Guadarrama-Cruz et al., 2008), antiulcer activity (Galati et al., 2001), antimicrobial (Salgueiro et al., 2003; Hernández et al., 2006), antifungal and antibacterial (Céspedes et al., 2006) as well as acaricidal effects (Martínez-Velázquez et al., 2011). Also, it has been described that medicinal plants have reproductive regulatory effects like infertility stress-induced (Chidrawar et al., 2011) and sperm DNA fragmentation induction (Meamar et al., 2012); for this reason, it calls for the opportunity to search new alternatives for fertility regulation in human reproduction (Talwar et al., 1997).

These alternatives can associate scientific literature and popular knowledge of plants with spermicidal effect, to suggest a regulator method of fertility from plant origin which retains spermicides advantages without cytotoxicity against epithelial cells (Upadhyay et al., 1993; Kumar et al., 2012). Currently, research has focused on evaluating and developing a regulator of male fertility which is both safe and effective, with reversible production of azoospermia, and suppresses sperm production by hormonal and non-hormonal methods (Lopez et al., 2006). Recently, plant products with low toxicity have been used to regulate fertility (Singh and Singh, 2008). According to Álvarez-Gómez et al. (2007), some plants demonstrating pharmacological fertility control are *Abrus precatorius* (black color pill), *Albizia lebeck* (shadow chickadee or sleepy), *Aloe vera* (sábila), *Ananas comosus* (pineapple), *Anethum graveolens* (dill), *Apium graveolens* (celery), *Azardactha indica* (neem tree) (Upadhyay et al., 1993), *Bursera fagaroides* (cuijote), *Calendula officinalis* (gold button, crown of king, flamenquilla, dead flower, rose of dead or cempasúchitl), *Carica papaya* (papaya), *Citrus limon* (lemon), *Curcuma longa* (Indian saffron), *Cyclamen persicum* and *Primula vulgaris* (violets from the Andes and springs), *Eupatorium brevipes*, *Gypsophila paniculata* (paniculata or wedding veil), *Momordica charantia* (bitter melon or sibicogén), *Passiflora edulis* (maracuyá or passion fruit), *Pithecellobium saman* (samanor rain tree), etc.

Studies in cattle reported that incorporation of *Cynodon dactylon* (Bermuda grass) in the diet decreased the re-

production rate (Banta et al., 2008). Furthermore, ethnobotanical studies in Mexico and Mediterranean area of Europe, reported the traditional use of *Ceterach officinarum* (Doradilla) as a method of contraception, but this has not been fully tested (Márquez et al., 1999; Guarrera et al., 2008). Same information was reported in studies with an extract of *Lippia graveolens* (oregano), which is known to be toxic in high doses and is traditionally believed to affect reproduction when ingested as a tea (Longe, 2002). There is empirical evidence that communities in the State of Durango in Mexico use *Tagetes lucida* (yerbanis) and *Opuntia ficus-indica* (prickly pear) as reproductive control methods; but to date, there is no scientific evidence of anti-reproductive properties of these plants (González et al., 2004). Little studies have been done on the flora from the North of Mexico, and the literature provides few references on the study of their pharmacological activities and possible contribution to the ethnopharmacology. The objective of this study was to evaluate by morphological methods, the effect of methanolic extracts of *T. lucida*, *O. ficus-indica*, *C. dactylon*, and *L. graveolens* HBK, from the North of Mexico on testicle of male Wistar rats.

MATERIALS AND METHODS

Collection of plants

About 5 kg of leaves or stalks of *T. lucida*, *C. dactylon*, *L. graveolens* HBK and *O. ficus-indica* were collected in the rural area of Torreón Coahuila in the north of Mexico, on an altitude of 1,140 m above the sea. To collect plants tested, Guidelines for Good Practice Plant Collection proposed by the World Health Organization (WHO, 2003). Identification of the specimens were performed by a botanic specialist from the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Campus Torreón.

Preparation of methanolic extracts

Plant material was dried in a solar drier with aeration for 5 days. When dried, leaves and stalk were ground and passed through a sieve with 20 mesh (inch 0030, MM 08600) to obtain a fine powder as proposed by Navarro et al. (2006). Then, 30 g of dry ground plant material was weighed and added to 300 ml of methanol (analytical grade) (JT Baker, USA) in an Erlenmeyer flask (Payrex, USA). Flask was capped with parafilm, stirred at low speed and maintained at 37°C for 24 h. Mash was filtered on Kitazato flask with vacuum pump, process was repeated three times with same amount of fresh solvent each time. The filtrate obtained was distilled in a rotavapor (Rotavapor Buchii-215®, USA) to evaporate the solvent; crude extract was completely dried in a hot air oven at temperature lower than 50°C for 7 days (Benchmark Scientific Mini Incubator, USA). Dried extracts were stored at 4°C, in amber vials until use (Nostro et al., 2000; Navarro et al., 2006).

Animals and study groups

In this study, 30 Wistar male rats were used with 280 to 300 g weight, and were 60 days old. Age of animals was selected

according to events of maturation in reproductive cycle of the rat. Rats per group were placed in plastic boxes. The animals were kept in a controlled environment with room temperature between 25 and 28°C (temperature control: 2H/JT-03, Lennox^{MR}, Mexico), relative humidity between 30 and 70% (Minisplit, Lennox^{MR}, Mexico), light/darkness cycles of 12 h (Photoperiod was regulated by an electric timer and light intensity was at least 300 lx, positioned laterally to the eyes of the animals; Electric R/F, China), with free access to food (NUTRI-CUBES, Agribands Purina[®], Mexico) and water *ad libitum*. Rats were subjected to a period of acclimatization for 7 days before the first administration of extracts. Extracts were suspended in distilled water and were orally administered daily with gastric probe for 36 days; a pilot assay was conducted to determine the effective dose that resulted in 50 mg/kg for all extracts; this dose was administered to the following groups.

Animals were organized in 5 groups as follows: Control group (n:6), group without treatment; Group 1 (n:6), treated with 50 mg/kg extract of *T. lucida*; Group 2 (n:6), treated with 50 mg/kg extract of *C. dactylon*; Group 3 (n:6), treated with 50 mg/kg extract of *L. graveolens HBK*; Group 4 (n:6), treated with 50 mg/kg extract of *O. ficus-indica*.

Experiments were carried out in accordance with the International Guidelines on the Appropriate Use of Experimental Animals, and according to Mexican Norm NOM-062-ZOO-1999 on the Technical Specifications for Production, Care and Use of Laboratory Animals (SAGARPA, 2010) and cared for by expert veterinarian (professional license: 4807528). The protocol was approved by the Bioethical Committee of the Faculty of Medicine of the Autonomous University of Coahuila, Torreon Campus, Coahuila in Mexico (Number of approval by the Secretaría de Salud and Comisión Nacional de Bioética in Mexico: CONBIOETICA07CEI00320131015).

Tissue samples collection

24 h after the last dose had been administered, all animals were sacrificed by cervical dislocation. Testicle samples were placed in 10% formalin with phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2 to 7.4, processed by conventional histological technique and embedded in paraffin blocks.

Morphological evaluation

5-micron histological sections were obtained, mounted, and stained with hematoxylin and eosin (H&E) and Masson's trichrome; pretreatment with diastase and periodic acid Schiff (PAS) was used for histochemical analysis. Samples were analyzed by light microscopy to evaluate the morphology of different stages of development of spermatogonia, Sertoli cells and Leydig cells (Gilbert et al., 1986).

Collection of sperm from the epididymis

Sperm cells were collected from the epididymis in test tubes and immediately washed with 3 ml of physiologic solution (NaCl 0.9%), then washed again with HamF-10 culture medium (Sigma-Aldrich, San Luis MO, USA) and incubated at 37°C for 30 min. Concentration of cells was carried using bright field microscopy according to Zhou et al. (2006). To determine the percentage of sperm motility, a drop of sperm cell suspension was placed in a Neubauer chamber; sperm were counted in 10 different fields and the number of sperm with lineal mobility was determined with total mobility. A total of 200 sperm per sample were evaluated as described by Zhou et al. (2006).

Data analysis

Analysis of variance, and means comparison Pearson test with $P \leq 0.05$ were performed. The statistical software SPSS version 20.0 for Windows was used to analyze the variables.

RESULTS

Morphological alterations

In testicle samples of control group stained with H&E, a normal histology was observed: seminiferous tubules with epithelium without peeling or artifacts (Figure 1A). In group treated with the methanolic extract of *T. lucida*, destruction of some seminiferous tubules, characterized by epithelial detachment with cell fragmentation was observed (Figure 1B). In group 2 that received extract of *C. dactylon*, same alterations described earlier were observed alternating with areas without damage in the same seminiferous tubule (Figure 1C and D). In groups 3 and 4 treated with *L. graveolens HBK* and *O. ficus-indica*, respectively, same alterations described were observed, with an apparent decrease in the diameter of the seminiferous tubules, accompanied with large empty spaces between them (Figure 1E). With Masson trichrome method, no differences were observed among the control group (Figure 1F) and treated groups (Figure 1G and J). In samples analyzed with histochemical reaction of PAS with diastase from the control group, basal membrane was observed as a continuous line in magenta color (Figure 1K). In treated groups, areas with fragmentation of the basal membrane related to the areas of epithelial disruption were observed (Figure 1L and O).

Sperm quality analysis

Results of sperm quality analysis showed a significant decrease in sperm concentration in the group treated with *O. ficus-indica* (Figure 2A). Significant decrease in sperm motility was observed in groups treated with *T. lucida*, *L. graveolens HBK* and *O. ficus-indica* (Figure 2B). Groups treated with *C. dactylon*, *L. graveolens HBK* and *O. ficus-indica* showed a marked decrease in sperm viability, this was more evident in group treated with *O. ficus-indica* (Figure 2C).

DISCUSSION

This study, reports for the first time that methanolic extracts of *T. lucida*, *C. dactylon*, *L. graveolens HBK* and *O. ficus-indica* from the north of Mexico, have toxic effects on testicle and affect spermatoc parameters of Wistar rats. These results correlate with other studies that demonstrated these same injuries after administration of extracts of *Lagenaria breviflora* (Saba et al., 2009), *Carica papaya* (Lohiya et al., 2002), *A. precatorius* (Sinha and Mathu, 1990), *Martynia annua* (Mali et al., 2002),

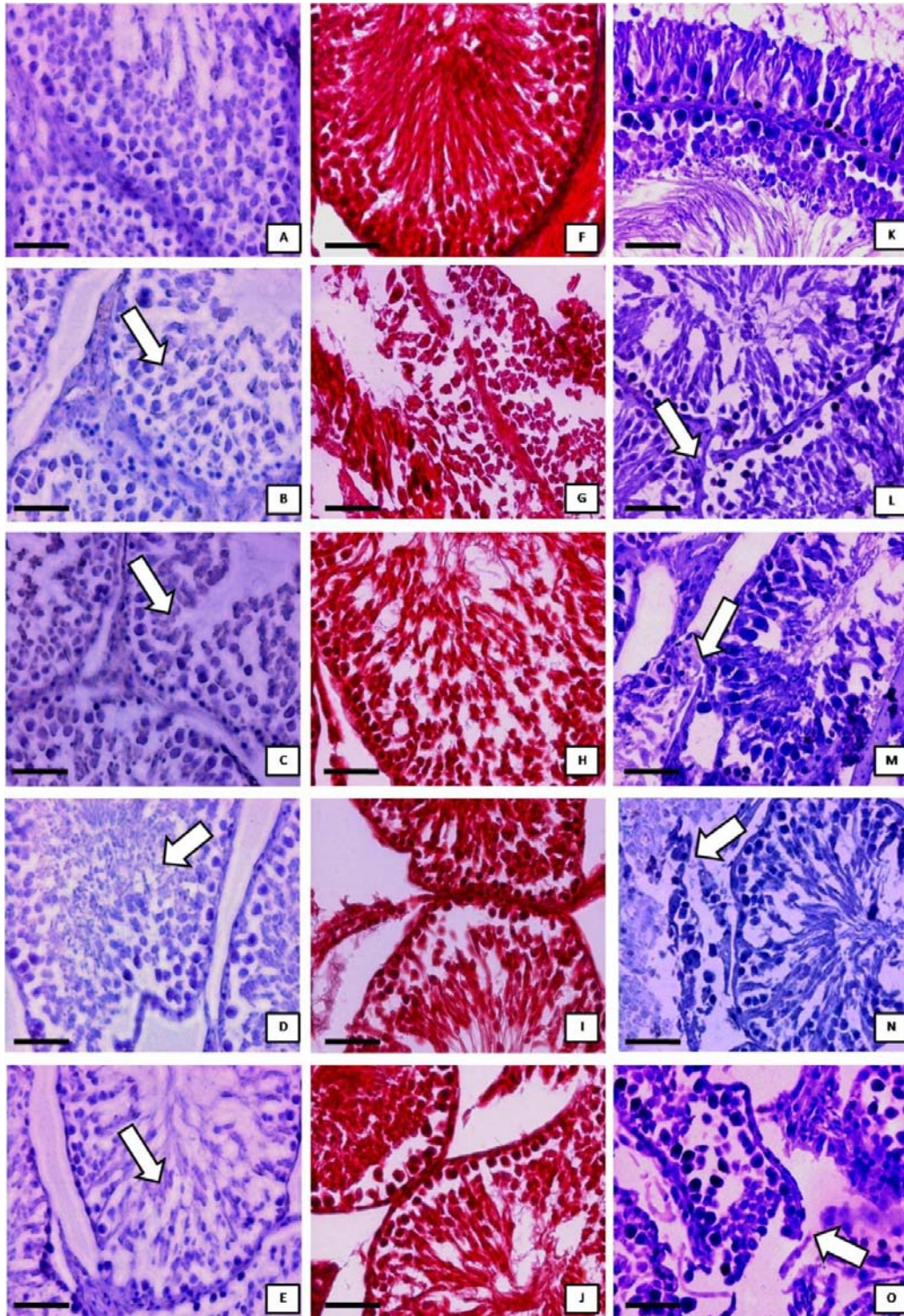


Figure 1. Methanolic extracts induced histopathological alterations in testicle: (A) Control group shows a normal histology. Groups treated with methanolic extracts: (B) *Tagetes lucida*, (C) *Cynodon dactylon*, (D) *Lippia graveolens HBK*, and (E) *Opuntia ficus-indica*. Varying degrees of detachment and epithelial cells destruction are observed (white arrows). H&E. Methanolic extract did not cause fibrosis: (F) Control group shows few fibers of collagen, no differences were observed between control and treated groups (G-J). Masson's trichrome. Fragmentation of basal membrane: (K) Intact basement membrane in control group is observed. In treated groups (L-O), areas of fragmentation of basal membrane (white arrows) are observed in relation to areas of epithelial damage. PAS with diastase. Paraffin embedded, light microscopy. Bar: 50 μ m.

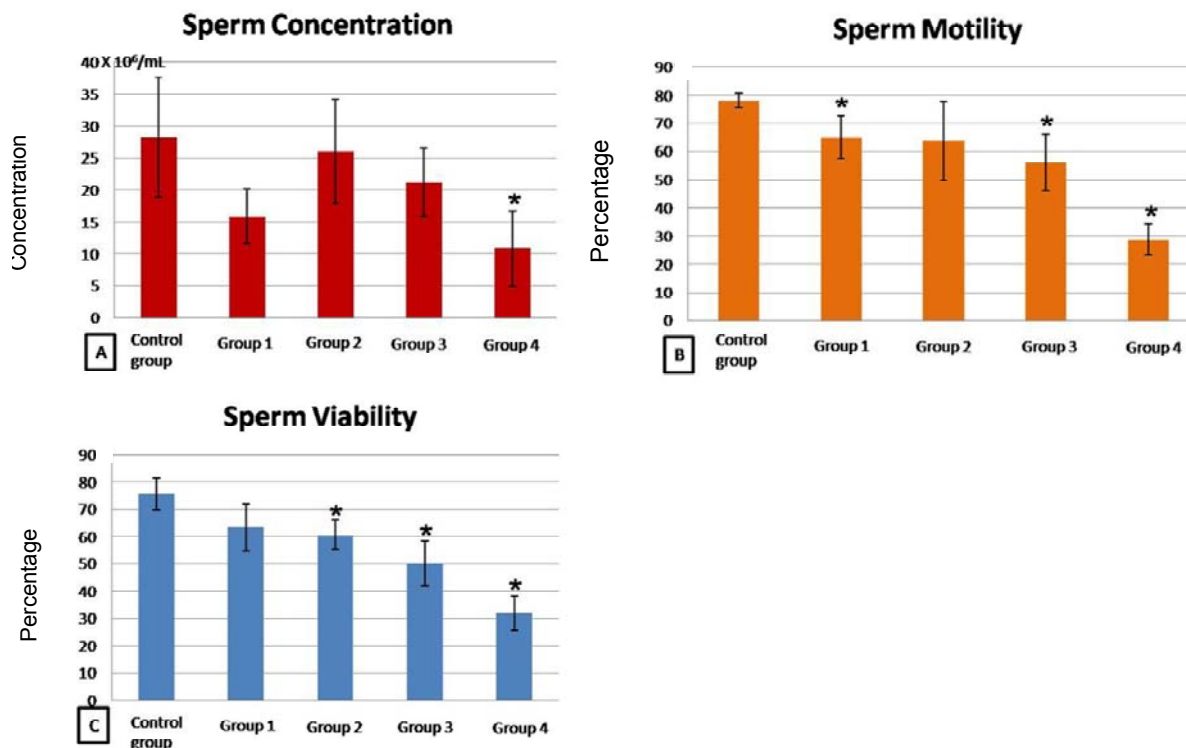


Figure 2. Graphs show (A) sperm concentration, (B) sperm motility, and (C) sperm viability. Control group and groups treated with *Tagetes lucida* (Group 1), *Cynodon dactylon* (Group 2), *Lippia graveolens* HBK (Group 3), and *Opuntia ficus-indica* (Group 4), respectively. Statistically difference is observed in some groups (* $P < 0.05$).

among others (Kamal et al., 2003; D'Cruz et al., 2010). The mechanism of damage to the testicular epithelium has not been fully established, but several studies tested other plant extracts and described selective damage to spermatogonia (Sinha and Mathu, 1990), Sertolicells (Lohiya et al., 2002) and Leydig cells (Oluyemi et al., 2007), as well as a decrease in serum levels of testosterone (Ashok and Meenakshi, 2004; Takizawa et al., 2004; Yakubu et al., 2007; Shkukani et al., 2007) and spermatogenic toxicity (Tellez-López et al., 2014). In our study, the decrease in sperm quality was more pronounced in groups treated with *L. graveolens* HBK and *O. ficus-indica*, this correlates with the degree of damage to the testicular epithelium observed in histopathological sections.

The damage observed in testicular epithelium, as well as the decrease in sperm quality were not in the same intensity in the different study groups; they were more marked in groups treated with *L. graveolens* HBK and *O. ficus-indica*, and less evident in group treated with *C. dactylon*. The degree of damage to the testicular epithelium has been described as dose dependent (Gupta et al., 2004; Tellez-López et al., 2013); our findings suggest that an increased dose of *C. dactylon*, could cause similar damage to that observed with extracts of *L. graveolens* HBK and *O. ficus-indica*. Finally, the accentuated damage in testicular epithelium, and the

adverse effect on sperm quality parameters caused by extracts from *L. graveolens* HBK and *O. ficus-indica*, makes them good candidates for male fertility control; however, other physiological studies are required to support their use in humans. Several studies describe that extracts of *Azadirachta indica* (Shaikh et al., 1999), *Dendrophthoe falcate* (Gupta and Kachhawa, 2007) and *Taraxacum officinale* (Tahtamouni et al., 2011), affect the structure and sperm function that results in azoospermia (Purandare et al., 1999). To date, current studies are carried out to elucidate the mechanism of damage on testicular epithelium, and how the methanolic extract evaluated in this study decreased the sperm quality. Also we are investigating if morphological alterations in testicle of treated rats, are reversible or not after discontinuation of treatment.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENT

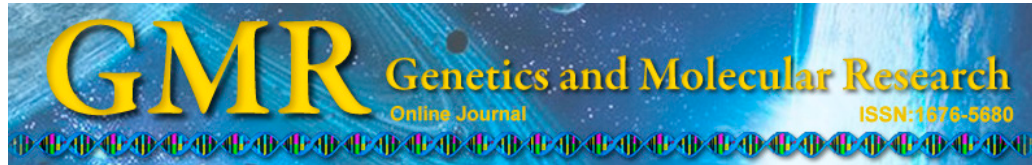
The authors acknowledged the work of Biol. René

Reynaga-Piña for technical assistance involved in processing and staining of the samples and Lic. Daniel García for english language review of the manuscript. Miguel Angel Téllez-López and Nadia Denys Betancourt-Martínez were supported by CONACyTscholarships #305943 and #216334, respectively. Javier Morán Martínez was supported by Fogarty International Center CareerTrac, School of Public Health, University of California at Los Angeles: Grant Number: D43TW623 Program Name: ITREOH.

REFERENCES

- Alvárez-Gómez AM, Cardona WD, Castro JF, Jiménez S, Cadavid A (2007). Nuevas opciones en anticoncepción: posible uso espermicida de plantas colombianas. *Actas Urol. Esp.* 31:372-381.
- Ashok P, Meenakshi B (2004). Contraceptive effect of *Curcuma longa*(L.) in male albino rat. *Asian J. Androl.* 6:71-74.
- Banta JP, Lalman DL, Krehbiel CR, Wettemann RP (2008). Whole soybean supplementation and cow age class: Effects on intake, digestion, performance, and reproduction of beef cows. *J. Anim. Sci.* 86:1868-78.
- Céspedes CL, Avila JG, Martínez A, Serrato B, Calderón-Mugica JC, Salgado-Garciglia R (2006). Antifungal and antibacterial activities of Mexican tarragon (*Tagetes lucida*). *J. Agric. Food Chem.* 54(10):3521-3527.
- Chidrawar VR, Chitme HR, Patel KN, Patel NJ, Racharla VR, Dhoraji NC, Vadalia KR (2011). Effects of *Cynodondactylon* on stress-induced infertility in male rats. *J. Young Pharm.* 3(1):26-35.
- Dahanukar SA, Kulkarni RA, Rege NN (2000). Pharmacology of Medicinal Plants and Natural Products. *Indian J. Pharmacol.* 32:81-118.
- D'Cruz SC, Vaithinathan S, Jubendradass R, Mathur PP (2010). Effects of plants and plant products on the testis. *Asian J. Androl.* 12:468-479.
- World Health Organization (2003). Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales. Ginebra.
- Dok-Go H, Lee KH, Kim HJ, Lee EH, Lee J, Song YS, Cho J (2003). Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Brain Res.* 965(1):130-136.
- Fraai AC, Jiménez E, Ariza CR (1990). Hypoglycemic effect of *Opuntia ficus-indica* in non insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Phytother. Res.* 4(5):195-197.
- Galati EM, Monforte MT, Tripodo MM, d'Aquino A, Mondello MR (2001). Antitumor activity of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae): ultrastructural study. *J. Ethnopharmacol.* 76(1):1-9.
- Gilbert P, Wetterauer U, Wokalek H (1986). Histological changes in rat testicles after short-term ischaemia. *Urol. Int.* 41:145-8.
- González EM, López EI, González EM, Tena FJ (2004). Plantas Medicinales del Estado de Durango y Zonas Aledañas, CIIDIR Durango. IPN. México, D.F. p 41.
- Guadarrama-Cruz G, Alarcon-Aguilar FJ, Lezama-Velasco R, Vazquez-Palacios G, Bonilla-Jaime H (2008). Antidepressant-like effects of *Tagetes lucida* Cav. in the forced swimming test. *J. Ethnopharmacol.* 120(2):277-281.
- Guarrera PM, Lucchese F, Medori S (2008). Ethnophytherapeutical research high Molise region central-southern Italy. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 4:1-11.
- Gupta RS, Kachhawa JBS, Chaudhary R (2004). Antifertility effects of methanolic pod extract of *Albizia lebeck* (L.) Benth in male rats. *Asian J. Androl.* 6:155-159.
- Gupta RS, Kachhawa JBS (2007). Evaluation of contraceptive activity of methanol extract of *Dendrophthoe falcata* stem in male albino rats. *J. Ethnopharmacol.* 112:215-218.
- Hernández T, Canales M, Flores C, García AM, Duran A, Avila JG (2006). Antimicrobial Activity of *Tagetes lucida*. *Pharm. Biol.* 44(1):19-22.
- Jarald EE, Joshi SB, Jain DC (2008). Antidiabetic activity of aqueous extract and non polysaccharide fraction of *Cynodondactylon* Pers. *Indian J. Exp. Biol.* 46(9):660.
- Kamal R, Gupta RS, Lohiya NK (2003). Plant for male fertility regulation. *Phytother. Res.* 17:579-590.
- Kumar D, Kumar A, Prakash O (2012). Potential antifertility agents from plants: A comprehensive review. *J. Ethnopharmacol.* 140:1-32.
- Lee JC, Kim HR, Kim J, Jang YS (2002). Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *J. Agric. Food Chem.* 50(22):6490-6496.
- Lohiya NK, Manivannan B, Mishra PK, Pathak N, Sriram S, Bhande SS, Panneerross S (2002). Chloroform extract of *Carica papaya* seeds induces long-term reversible azoospermia in langur monkey. *Asian J. Androl.* 4:17-26.
- Longe JL (2002). The Gale Encyclopedia of Alternative Medicine. Farmington Hills MI, Thompson-Gale. p 521.
- Lopez LM, Grimes DA, Schulz KF (2005). Nonhormonal Drugs for Contraception in Men: A systematic review. *Obstet. Gynecol. Surv.* 60:746-52.
- Mali PC, Ansari AS, Chaturvedi M (2002). Antifertility effect of chronically administered *Martynia annua* root extract on male rats. *J. Ethnopharmacol.* 82:61-67.
- Márquez AC, Lara FO, Esquivel RB, Mata RE (1999). Plantas medicinales de México II. Composición, usos y actividad biológica. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. pp. 125-130.
- Martínez-Rocha A, Puga R, Hernández-Sandoval L, Loarca-Piña G, Mendoza S (2008). Antioxidant and antimutagenic activities of Mexican oregano (*Lippia graveolens* Kunth). *Plant Foods Hum. Nutr.* 63(1):1-5.
- Martínez-Velazquez M, Rosario-Cruz R, Castillo-Herrera G, Flores-Fernandez JM, Alvarez AH, Lugo-Cervantes E (2011). Acaricidal effect of essential oils from *Lippia graveolens* (Lamiaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae), and *Allium sativum* (Liliaceae) against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 48(4):822-827.
- Meamar M, Zribi N, Cambi M, Tamburrino L, Marchiani S, Filimberti E, Muratori M (2012). Sperm DNA fragmentation induced by cryopreservation: new insights and effect of a natural extract from *Opuntia ficus indica*. *Fertil. Steril.* 98(2):326-333.
- Navarro VM, Rojas G, Zepeda LG, Avilés M, Fuentes M, Herrera A, Jiménez E (2006). Antifungal and antibacterial activity of four selected Mexican medicinal plants. *Pharm. Biol.* 44:297-300.
- Nostro A, Germanò MP, D'angelo V, Marino A, Cannatelli MA (2000). Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lett. Appl. Microbiol.* 30:379-384.
- Oluoyemi KA, Jimoh OR, Adesanya OA, Omotuyi IO, Josiah SJ, Oyesola TO (2007). Effects of crude ethanolic extract of *Garcinia cambogia* on the reproductive system of male Wistar rats. *Afr. J. Biotechnol.* 6:1236-1238.
- Purandare TV, Kholkute SD, Gurjar A, Joshi UM, Dattatreya Murty B, Sheth AR, Munshi SR (1997). Semen analysis & hormonal levels in bonnet macaques administered *Embelia ribes* berries, an indigenous plant having contraceptive activity. *Indian J. Exp. Biol.* 17:935-6.
- Saba AB, Oridupa OA, Oyeyemi MO, Osanyigbe O (2009). Spermatozoa morphology and characteristics of male wistar rats administered with ethanolic extract of *Lagenaria breviflora* Roberts. *Afr. J. Biotechnol.* 8:1170-1175.
- Sagarpa, Norma Oficial Mexicana (1999). NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Salgueiro LR, Cavaleiro C, Gonçalves MJ, Proença DCA (2003). Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. *Plant Med.* 69(1):80-83.
- Shaikh PD, Manivannan B, Pathan KM, Kasturi M, Nazeer, Ahamed R (1999). Antispermatic activity of *Azadirachta indica* leaves in albino rats. *Curr. Sci.* 64:688-689.
- Shkukani HG, Salhab AS, Disi AM, Shomaf MS, Quadan FA (2007). Antifertility effect of ethanolic extract of *Juniperus phoenicea* (L.) in male albino rats. *J. Herb. Pharmacother.* 7(3-4):179-189.
- Singh A, Singh SK (2008). Reversible antifertility effect of aqueous leaf

- extract of *Allamandacathartica* L. in male laboratory mice. J. Androl. 40:337-345.
- Singh SK, Kesari AN, Gupta RK, Jaiswal D, Watal G (2007). Assessment of antidiabetic potential of *Cynodondactylon* extract in streptozotocin diabetic rats. J. Ethnopharmacol. 114(2):174-179.
- Singh SK, Rai PK, Jaiswal D, Watal G (2008). Evidence-based critical evaluation of glycemic potential of *Cynodondactylon*. Evid Based Complement. Alternat. Med. 5(4):415-420.
- Sinha S, Mathu RS (1990). Effect of steroidal fraction of seeds of *Abrus precatorius* Linn on rat testis. Indian J. Exp. Biol. 28:752-756.
- Tahtamouni LH, Alqurna NM, Al-Hudhud MY, Al-Hajji HA (2011). Dandelion (*Taraxacum officinale*) decreases male rat fertility *in vivo*. J. Ethnopharmacol. 135:102-109.
- Takizawa T, Mitsumori K, Takagi H, Nasu M, Yasuhara K, Onodera Imai T, Hirose M (2004). Sequential analysis of testicular lesions and serum hormone levels in rats treated with a *Psoralea corylifolia* extract. Food Chem. Toxicol. 42:1-7.
- Talwar GP, Raghuvanshi P, Misra R, Mukherjee S, Shah S, (1997). Plant immunomodulators for termination of unwanted pregnancy and for contraception and reproductive health. Immunol. Cell Biol. 75:190-192.
- Tellez-López MA, Treviño-Neávez JF, Verde-Star MJ, Rivas-Morales C, Oranday-Cárdenas A, Moran-Martínez J, Serrano-Gallardo LB, Morales Rubio ME (2013). Evaluación del efecto del extracto metanólico de *Tagetes lucida* sobre la función testicular y calidad espermática en ratas macho Wistar. Rev. Mex. Cien. Farm. 44(4):43-52.
- Tellez-López MA, Treviño-Neávez JF, Verde-Star MJ, Moran-Martínez J, Betancourt ND, Serrano-Gallardo LB, Morales-Rubio ME (2014). Evaluación del efecto de las particiones del extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica* sobre la función testicular y calidad espermática en ratas macho Wistar. Rev. Mex. Cien. Farm. 45(3):65-73.
- Tripath KD (2005). Essentials of Medical Pharmacology, 5a. Jaypee, Brothers Medical Publishers, India.
- Upadhyay SN, Dhawan S, Talwar GP (1993). Antifertility Effects of Neem (*Azadirachta indica*) Oil in Male Rats by Single Intra-Vas Administration: An Alternate Approach to Vasectomy. J. Androl. 14(4):275-281.
- Yakubu MT, Akanji MA, Oladiji AT (2007). Evaluation of antiandrogenic potentials of aqueous extract of *Chromolaena odoratum* (L.) KR leaves in male rats. Andrologia 39:235-243.
- Zhou DX, Qiu SD, Zhang J, Tian H, Wang HX (2006). The protective effect of vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in the testes of adult rats. Asian J. Androl. 85:584-588.



Sperm chromatin dispersion by formaldehyde in Wistar rats

N.D. Betancourt-Martínez^{1,5}, J. Jiménez-Villarreal¹, P. Carranza-Rosales², N.E. Guzmán-Delgado³, C. Leyva Orasma⁴, E. Viveros Valdez⁵ and J. Morán-Martínez¹

¹Departamento de Biología Celular y Ultraestructura, Centro de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina de Torreón, Universidad Autónoma de Coahuila, Torreón, Coahuila, México

²Departamento de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey, Nuevo León, México

³División de Investigación, Unidad Médica de Alta Especialidad #34, Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey, Nuevo León, México

⁴Departamento de Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Torreón, Coahuila, México

⁵Departamento de Química, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, México

Corresponding author: J. Morán-Martínez
E-mail: javmoran@yahoo.com

Genet. Mol. Res. 14 (3): 10816-10826 (2015)

Received February 20, 2015

Accepted May 26, 2015

Published September 9, 2015

DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2015.September.9.20>

ABSTRACT. Formaldehyde (FA) is an environmental xenobiotic, which is genotoxic and carcinogenic to humans and animals; it induces DNA damage, mutations, and clastogenicity during critical cytogenetic events. FA-mediated oxidative stress is an important mechanism that has been associated with the induction of cytotoxic and genotoxic damage. Therefore, the objective of this study was to evaluate the dispersion of sperm chromatin and reproductive parameters induced by exposure to

different concentrations of FA in Wistar rats. Compared to the percentage of sperm with fragmented DNA in the control group ($18.10 \pm 8.62\%$), the percentage of sperm with fragmented DNA increased following exposure to 5, 10, and 30 mg FA/kg body weight (29.60 ± 8.44 , 85.20 ± 20.94 and 96.0 ± 7.87 , respectively; $P = 0.0001$). Histopathological alterations were evident, especially in the seminiferous tubules. In conclusion, this study provides experimental evidence concerning the genotoxicity of FA, with particular reference to the decreased sperm concentration and motility and increased dispersion of DNA chromatin in rats.

Key words: Formaldehyde; Sperm cells; Chromatin dispersion; Wistar rats; Histopathology

INTRODUCTION

Formaldehyde (FA) is a volatile low-molecular weight organic compound (Gurel et al., 2005). It is a flammable colorless gas at room temperature with a distinctive pungent odor. Other common names are methanal, methylene oxide, metaldehyde, and oxomethane, and it occurs naturally in the body in small quantities (ATSDR, 1999). FA is found in the environment because it is produced by various natural and anthropogenic sources (WHO, 1989; Liteplo et al., 2002). In occupational settings, exposure to FA mainly occurs by inhaling FA gas, but alternatively, can also occur by inhalation of paraformaldehyde particles or powder from resins and wood that contain FA (IARC, 1995). It has been estimated that the daily consumption and occupational exposure to FA is greater than 3 ppm (WHO, 2000), while the endogenous concentration in rats, monkeys, and humans is 0.1 mM (ATSDR, 1999; Lu et al., 2008; EPA, 2011). FA is a genotoxic agent that induces DNA damage; it is also carcinogenic and induces mutations and chromosomal aberrations in critical cytogenetic processes (Lu et al., 2008). The genotoxic damage caused by FA includes the formation of DNA monoadducts, DNA-DNA, and DNA-protein adducts, and the induction of clastogenicity, micronuclei, and sister chromatid exchange (Lu et al., 2010). Numerous investigations both *in vitro* and *in vivo*, for example, mutational studies in bacteria, DNA breaks, chromosome aberration, and acute or chronic exposure in laboratory animals, have demonstrated the genotoxicity of FA (Heck et al., 1982; Bolt, 1987). Moreover, it is known that the generation of reactive oxygen species (ROS) or inadequate protamine deposition during spermiogenesis can induce irreversible DNA damage in gametes (Manicardi et al., 1998), as well as apoptosis during sperm cell maturation (Cortés-Gutiérrez et al., 2007). Protamines are proteins that are folded into the DNA of sperm cells. They are of great importance for the compaction of DNA in the nucleus because of their arginine-containing residues (Ward and Coffey, 1991; Ward, 1993). The longitudinal binding of protamines along the grooves of DNA is mediated by these positively charged arginine residues, which neutralize the negative charge of phosphodiester bonds in the DNA strands (Ward, 1993). Balhorn (1982) described the importance of disulfide bonds in the chromatin compaction of spermatid cells, which was different from that of somatic cells as described by Ward and Coffey (1991). Both researchers demonstrated that DNA is 6-fold more compacted in sperm than that in mitotic chromosomes, and that it is arranged in smaller loops in spermatid cells than that in somatic cells and anchored to a nuclear matrix. These loops are compacted through intercropping with protamines, which rigidly stabilize their structure through disulfide

bonds. If these bonds are broken, the DNA loops relax and form DNA halos around the central residual nuclear structure (Fernández et al., 2003; Cortés-Gutiérrez et al., 2007). In contrast to sperm with intact DNA, sperm cells that have fragmented DNA do not release the DNA loops after acid treatment, and can be seen to have very small or no halos (Balhorn, 1982; Ward and Coffey, 1991; Ward, 1993; Fernández et al., 2003; Zribi et al., 2011). Exposure of spermatozoa to high concentrations of ROS can induce DNA fragmentation (Treulen et al., 2015). The major factors responsible for DNA damage in sperm cells are defects in chromatin compaction resulting from insufficient protamination, ROS production, and apoptosis induction (Agarwal and Allamaneni, 2005; Cortés-Gutiérrez et al., 2007; Gil-Villa et al., 2007). The induction of oxidative stress and the systemic formation of ROS have already been reported to be associated with the genotoxic mechanism of FA (Duong et al., 2011; Lino-dos-Santos-Franco et al., 2011; Tajaddini et al., 2014). The objective of this study was to evaluate the dispersion of sperm chromatin, spermatid parameters, genotoxic effect, and morphological alterations induced by different concentrations of FA in male Wistar rats.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Twenty male, homozygous, pathogen-free, 5-6-week-old Wistar rats weighing 226-258 g were used. The animals were provided by the bioterium of the School of Dentistry, Autonomous University of Coahuila, Torreon Unit, in Torreon, Mexico. All animals were maintained under controlled temperature conditions of 25°-26°C, with a relative humidity of 30-70%, and 12 h light and dark cycles. The animals were fed NUTRI CUBOS® (Agribrands Purina Mexico, S.A. de C.V., Mexico City, Mexico) and provided water *ad libitum*. This study was conducted in accordance with institutional and international guidelines for animal handling procedures (SAGARPA in Mexico, NOM-062-ZOO, 1999), and was approved by the Bioethics Committee of the School of Medicine of the Autonomous University of Coahuila, Campus Torreon, Coahuila, Mexico No. (approval by Secretaría de Salud and Comisión Nacional de Bioética in Mexico No. CONBIOETICA07CEI00320131015). Protocol approval reference No. AUT.02-08/13.

Experimental groups

Animals (N = 20) were randomly divided into 4 groups of 5 rats each (control group, and treatment groups 1, 2 and 3). The control group received an intraperitoneal (*ip*) injection of 0.9% saline solution. Groups 1, 2, and 3 received daily an *ip* injection of 5, 10, and 30 mg FA/kg body weight, respectively, for 5 days. After treatment, the animals were sacrificed by cervical dislocation and the organs and biological samples were collected for the relevant assays. All procedures were performed according to institutional and international guidelines on the care and handling of animals for experimentation.

Sperm collection from the epididymis

Sperm cells from the epididymis of the rats were collected in test tubes and washed once with 3 mL saline (0.9% NaCl), then washed again with Ham F-10 medium (Invitrogen,

Grand Island, NY, USA) and incubated at 37°C for 30 min. The analysis of sperm parameters was carried out using bright-field microscopy according to the procedures described by Zhou et al. (2006).

Epididymal sperm count and motility

In order to determine the number of spermatozoa and the percentage of motile sperm, a drop of the sperm cell suspension, prepared from the epididymis as described above, was placed in a Neubauer chamber and the number of spermatozoa was counted in 10 different microscopic fields. For the analysis of total motility, 200 sperm were evaluated per sample at 100X magnification and the percentage was calculated according to the method described by Zhou et al. (2006).

Sperm chromatin dispersion (SCD) test

SCD in sperm cells was determined according to the methodology described by Fernández et al. (2003); this method can distinguish differentiating sperm with fragmented DNA from those with intact DNA. Briefly, cellular suspensions, 5-10 x 10⁶ cells/mL, were prepared from each sample and mixed with 1% low-melting point agarose at 37°C, to obtain a final agarose concentration of 0.7% in distilled water. Subsequently, 50-μL aliquots of the mixture were placed on glass slides that had been pretreated with 0.65% regular agarose and dried at 80°C. A coverslip was then placed on the slide and the agarose was allowed to solidify at 4°C for 4 min. Then, the coverslip was carefully removed, and the slides were immersed in a denaturing solution (0.08 M HCl) for 7 min in the dark. The slides were then transferred to #1 lysis solution at pH 7.5 (0.4 M Tris, 0.4 M DTT, 1% SDS, 50 mM EDTA) for 10 min and then to a neutralizing solution (0.09 M Tris-borate, 0.02 M EDTA, pH 7.0), and afterwards, to #2 lysis solution (0.4 M Tris, 2 M NaCl, 1% SDS, pH 7.5) for 5 min. They were then washed in 0.09 M Tris-borate, 0.002 M EDTA buffer, pH 7.5, for 2 min, before being dehydrated in a sequential gradient of 70, 90, and 100% ethanol for 2 min each, and allowed to dry. The entire process from denaturation to dehydration and drying of the slides was performed at room temperature. Slides were stained with Wright:PBS solution (1:1). The surface of the slide was covered with an excess of dye and incubated for 10-15 min with occasional gentle mixing to achieve homogeneity. The slides were then washed gently with tap water and allowed to dry for analysis by bright-field light microscopy.

SCD = number of sperm with fragmented DNA / total number of sperm x 100.

Histopathological analysis

In order to study the effects of FA at the tissue level, the animals were sacrificed by cervical dislocation once treatment with FA was completed and then the organs were dissected out and fixed in 10% neutral formalin. Tissues were processed by conventional histological techniques and were embedded in paraffin blocks. Sections of 5 μm were prepared on a microtome and stained with hematoxylin and eosin. After staining, the sections were mounted with synthetic resin and coverslips and were analyzed by light microscopy.

Statistical analysis

The SPSS 20.0 statistical program for Windows was used for statistical analysis. Data were analyzed using descriptive statistics and are reported as average \pm standard deviation. Differences and distribution among the four groups were evaluated using the nonparametric one-sample Kolmogorov-Smirnov test. Because the data did not show a normal distribution, one-way ANOVA and the Tukey *post hoc* test were performed in order to compare the treatments. $P < 0.05$ was considered to be statistically significant for all tests applied. Additionally, Pearson's chi-squared bivariate correlation analysis was used to infer the strength of the relationship between independent variables and response variables.

RESULTS

Experimental groups

A marked effect was observed on the body weight of animals treated with different concentrations of FA. While the weight of animals in the control group and group 1 increased by an average of 11.6 and 7.8 g, respectively, the weight of the animals treated with 10 and 30 mg FA/kg decreased by an average of 11.4 and 23.4 g, respectively, by the end of the experimental period.

The average values for the initial and final weights are shown in Table 1. Significant differences were found in the body weight of the three groups treated with FA, compared to the control ($P = 0.042$); however, the Tukey *post hoc* test showed significant differences ($P < 0.035$) only between the body weights of groups 2 and 3 (Table 1).

Table 1. Comparison of biological parameters between formaldehyde-treated and control group.

Experimental groups	Basal body weight (g)	Final body weight (g)	Sperm cells (x 10 ⁶)	Motility (%)	DNA fragmentation (%)
Control (0 mg/FA)	204.20 \pm 1.924	215.8 \pm 2.86	39.40 \pm 16.13	45.60 \pm 9.99	18.10 \pm 8.62
Group 1 (5 mg/FA)	214.60 \pm 18.447	222.4 \pm 17.05	27.60 \pm 6.38	2.80 \pm 0.837	29.60 \pm 8.44
Group 2 (10 mg/FA)	220.00 \pm 13.191	208.6 \pm 11.14	26.40 \pm 12.09	1 \pm 0.57	85.20 \pm 20.94
Group 3 (30 mg/FA)	268.00 \pm 37.195	244.6 \pm 31.26	14.60 \pm 3.42	0.0 \pm 0.0	96.0 \pm 7.87
Control vs Group 1	0.874	0.943	0.466	0.0001**	0.500
Control vs Group 2	0.668	0.928	0.385	0.0001**	0.0001**
Control vs Group 3	0.001**	0.110	0.030*	0.0001**	0.0001**
Group 1 vs Group 2	0.979	0.656	0.999	0.942	0.0001**
Group 1 vs Group 3	0.007**	0.277	0.385	0.818	0.0001**
Group 2 vs Group 3	0.015*	0.035*	0.466	0.989	0.500

*Significant statistical differences ($P < 0.05$; Tukey *post hoc* test). **Significant statistical differences ($P < 0.01$; Tukey *post hoc* test).

Concentration of spermatic cells

The concentration of sperm cells obtained from the epididymides of the control group and treatment groups 1, 2, and 3 was 39.40 \pm 16.13, 27.60 \pm 6.38, 26.40 \pm 12.09, and 14.60 \pm 3.42 x 10⁶ cells/mL, respectively. FA reduced the sperm cell concentration in the treated groups, with the most notable effect observed in animals receiving 30 mg/kg FA. Significant differences were observed in the concentration of sperm cells between the treated groups and

the control ($P = 0.049$); however, the Tukey *post hoc* test showed a significant difference only between the control group and group 3 ($P = 0.030$). The differences in sperm cell count between the different treatments are shown in Table 1.

Motility

Compared to the sperm motility in the control group ($45.60 \pm 9.99\%$), FA markedly decreased sperm motility of all animals in the 3 treatment groups, $2.80 \pm 0.837\%$ for group 1, $1 \pm 0.57\%$ for group 2, and $0.0 \pm 0.0\%$ for group 3. It is clear that the decrease in sperm motility is directly proportional to the concentration of FA administered (Table 1). Statistically significant differences in the sperm motility were observed among the four groups ($P = 0.0001$) and the Tukey *post hoc* test confirmed these differences.

Percentage of DNA fragmentation (SCD)

The percentage of sperm cells with fragmented DNA in the control group and those in groups 1, 2 and 3 were $18.10 \pm 8.62\%$, $29.60 \pm 8.44\%$, $85.20 \pm 20.94\%$, and $96.0 \pm 7.87\%$, respectively (Table 1).

FA induced DNA fragmentation in increased number of sperm cells in all the 3 treatment groups. Statistically significant differences were observed in the percentage of sperm cells with fragmented DNA (SCD) between groups treated with FA vs the control group ($P = 0.0001$). The Tukey *post hoc* test confirmed this significance ($P = 0.0001$). The difference in the percentage of sperm cells with fragmented DNA between experimental groups is shown in Table 1, which shows that higher concentration of FA is correlated with increased DNA fragmentation in the sperm cells. After staining the slides with Wright solution, the structure of the halos of the sperm cells in the samples from the different experimental groups was analyzed. The effect of FA on sperm chromatin dispersion is directly proportional to the concentration of FA, as evidenced by the presence of small halos signifying degraded DNA at 10 and 30 mg FA (Figure 1).

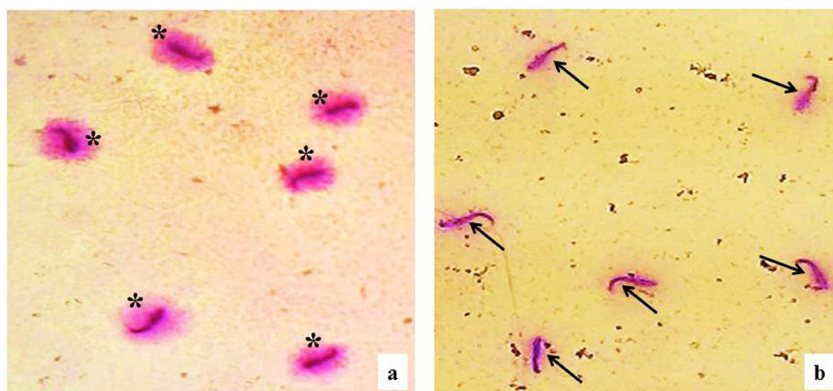


Figure 1. DNA fragmentation induced by formaldehyde in Wistar rat spermatozoa. **a.** Spermatozoa with fragmented DNA (asterisks) show chromatin dispersion around the core. **b.** Spermatozoa with unfragmented DNA do not show chromatin dispersion around the core (arrows).

Histopathological findings

Histopathological analysis of the liver, kidneys, brain and lungs of the different experimental groups showed only systemic vascular congestion relative to the control at all FA concentrations tested (data not shown). The most notable effect was on the testicular tissue; however, it is important to note that the morphological alterations observed in tissues from animals treated with 5 and 10 mg FA/kg body weight were graded only from mild to moderate. In contrast, in animals treated with 30 mg FA/kg body weight, there was a marked decrease in the number of sperm cells, and the morphology of majority of the seminiferous tubules was altered: the germinal epithelium was characterized by desquamation and necrotic cell death in the superficial layers, degeneration of germinative cells and Leydig cells, focal hemorrhage, and deposits of amorphous intraluminal proteinaceous materials (Figure 2).

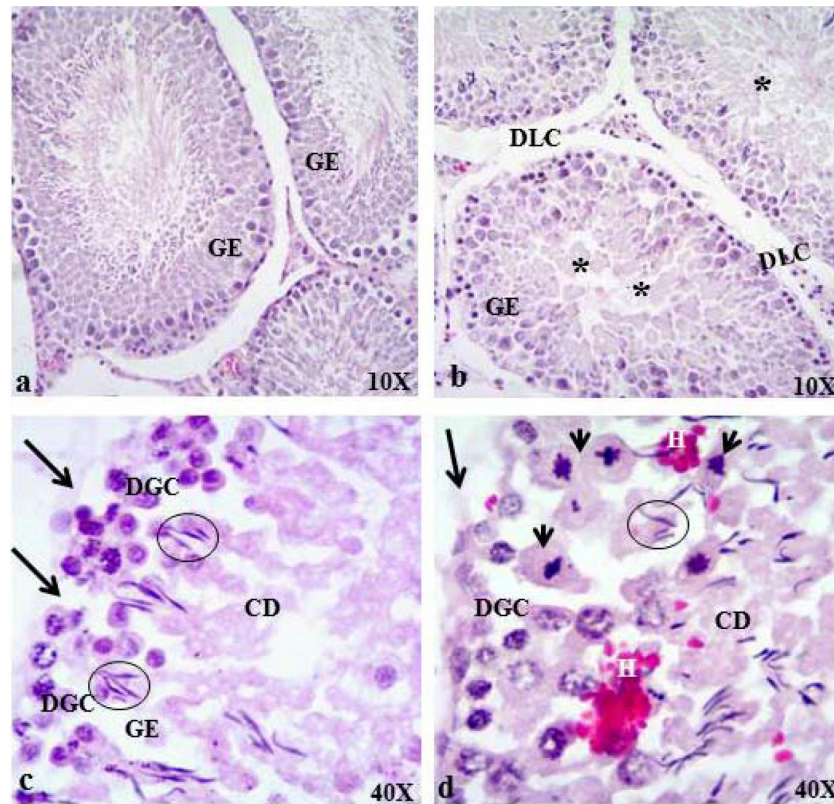


Figure 2. Effects of formaldehyde on testicular histopathology. Compared with the control group (a), significant histopathological changes were found in the groups treated with FA, with the most notable effect observed in group 3, treated with 30 mg FA/kg body weight (b). Morphological alterations in the germinal epithelium (GE) consisted of degeneration of both, germ cells (DGC) and Leydig cells (DLC), as well as deposits of amorphous-proteinaceous material in the lumen of the majority of the seminiferous tubules (*). At a higher magnification, (c) and (d) cellular death (CD), impaired spermatogenesis with atypical mitosis (small arrows), hemorrhage (H), decreased amount of sperm cells (circles), and disruption of the lining membrane of the seminiferous tubule (arrows) can be clearly seen after being stained with hematoxylin and eosin.

Correlations

Compared to the corresponding values in the control group, the different FA treatments decreased the sperm cell count and sperm motility by 59.4% ($P = 0.006$) and 78.5% ($P = 0.0001$), respectively, and increased the DNA fragmentation in sperm samples by 90.6% ($P = 0.0001$). The results were statistically significant (Table 2).

Table 2. Statistical correlation between the formaldehyde concentrations vs biological parameters studied.

	Final body weight (g)	Sperm cells (10×10^6)	Motility (%)	DNA fragmentation (%)
ANOVA	0.042*	0.049*	0.0001**	0.0001**
Correlation		$r = -0.594$	$r = -0.785$	$r = 0.906$
P value		0.006**	0.0001**	0.0001**

*Statistical significant correlation: $P < 0.05$ (two-tailed). **Highly statistical significant correlation: $P < 0.05$ (two-tailed).

DISCUSSION

Our results show that the FA concentrations used in this study cause genotoxic damage to rat sperm cells and corroborate previous findings about the mutagenic effects of acute exposure to FA in laboratory animals (Majumder and Kumar, 1995; Tang et al., 2003; Zahra et al., 2007). It is particularly important to bear this in mind considering the increase in air pollution in urban and industrial areas in recent decades. Although many air pollutants, including FA, are genotoxic, their relationship with alterations and mutations found in the human male germ line have not yet been clearly established (Somers and Cooper, 2009). A study by Zhang et al. (2011), reported that acute exposure to FA affected the sexual behavior of adult male rats, and testosterone levels decreased in a time- and concentration-dependent manner in the groups tested. An evaluation of animal studies reporting different routes of administration, doses, and dosing regimens, suggested a direct association between FA exposure and reproductive toxicity, especially in men. Potential mechanisms underlying formaldehyde-induced reproductive and developmental toxicities, including chromosome and DNA damage (genotoxicity), oxidative stress, altered level and/or function of enzymes, hormones and proteins, apoptosis, toxicogenomic and epigenomic effects (such as DNA methylation) have been identified (Duong et al., 2011). With regard to the adverse effects of FA on reproductive outcomes, Wang et al. (2012) reported a significant increased risk of prolonged time to pregnancy and significant elevated risk of spontaneous abortion in the partners of occupationally exposed individuals.

With respect to oxidative stress, induction of ROS is one of the most important factors causing irreversible DNA damage and fragmentation in sperm cells, and may affect the process of maturation of gametes (Cortés-Gutiérrez et al., 2007). FA-induced ROS may cause alterations in plasma membranes, lipids, proteins, and nucleic acids (Gurel et al., 2005), which might explain the damage to the cell membrane of the sperm cells evaluated in the present study (data not shown). Moreover, statistically significant differences were observed in the weight of rats treated with 10 and 30 mg/kg FA, compared to that of the control, while the animals treated with 5 mg/kg FA gained weight. Similar results were reported by Johannsen et al. (1986) and Til et al. (1989). In general, the sperm concentration in the FA-treated groups decreased (51%) compared to that in the control group. These findings are similar

to those described by Majumder and Kumar (1995), who reported a 50% decrease in sperm concentration in rats injected intraperitoneally with 10 mg FA/kg body weight and Cassidy et al. (1983) who found a significant decrease in sperm counts in Wistar rats administered 100 to 200 mg FA/kg orally. Similarly, Zhou et al. (2006) reported a reduction in sperm concentration and quality, as well as in testicular weight in rats exposed to FA vapors at a concentration of 10 mg/m³ for 2 weeks. In a study by Tang et al. (2003), toxicity and damage to the genetic material of germ cells was observed in male rats exposed to doses of 0.2, 2, and 20 mg FA/kg, administered intraperitoneally for a period of 5 days. The main pathological changes included degeneration of testicular tissue, decreased sperm count, and morphological changes in the sperm head in all the exposed groups. They also found a significant reduction in copper and zinc levels in the testicular tissue of the groups exposed to the highest concentration of FA. The decreased levels of zinc affect the formation of the cell membrane and the compaction of the quaternary structure of chromatin, while the reduction in Cu levels decreases cell energy thereby affecting sperm motility and the antioxidant function of seminal plasma. In our study, significant effects were observed on the external characteristics of the testes of rats; a flaccid consistency (plasmolysis) as well as dark blue color of the scrotum were observed in the group exposed to the highest concentration of FA (data not shown). This suggests a direct effect on testicular tissue. Although we did not determine the concentrations of Zn and Cu, these metals may influence sperm motility and viability by affecting the testicular tissue, as proposed by Tang et al. (2003). In a related report, Zahra et al. (2007) described effects of intraperitoneal administration of 0, 2.5, 5.0, 7.5, and 10 mg/kg FA for 40 days on body weight, gonadosomatic index, reduced sperm fertility, motility, and viability of Wistar rats. In our study, a direct relationship between the decrease in body weight and the dose of FA was observed, as well as an effect on other variables associated with the quality of sperm. We also found a direct relationship between the toxic effect of FA on sperm DNA and damage to the genomic integrity of cells. Our findings strengthen the hypothesis that exposure to FA results in damage to reproductive health. Gametogenetic defects associated with the initiation of spermatogenesis were demonstrated in a study by Duong et al. (2011), which evaluated the reproductive toxicity of FA in male rats by DNA methylation assays. Furthermore, the reproductive toxicity in 30 male Sprague-Dawley rats exposed to 0, 0.5, and 2.46 mg/m³ FA vapor for 60 consecutive days was found to be directly related to the dose (Zhou et al., 2011). The structure and function of the epididymides of the testes in rats exposed to 0.5 mg/m³ FA showed no obvious differences from those of the control group; however, the quality and quantity of sperm, testes, and the diameter of the seminiferous tubules, as well as the activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase significantly reduced in the group of rats exposed to 2.46 mg/m³ FA compared with those in the control group. FA cytotoxicity increases the degree of interaction of nucleic acids with other molecules. This favors DNA methylation, adduct formation, reduced motility, and oxidative stress, all of which are linked to DNA fragmentation in sperm cells. With respect to our histopathologic analysis, the fact that no alterations in organs such as the liver, kidney, brain, and lungs were observed may be attributed to the short time of exposure to FA. In another study (Golalipour et al., 2009), no kidney damage was observed in rats exposed to FA vapors in cadaver-dissecting rooms. Regarding testicular damage induced by FA, some studies (Zhou et al., 2006; Vosoughi et al., 2012) reported similar results to those found in our study, while another report (Golalipour et al., 2007) described testicular damage after chronic exposure to FA vapors. The morphologic

changes described in the present study can be correlated with the alterations in reproductive parameters and sperm chromatin dispersion. In conclusion, this study by evaluating chromatin dispersion and reproductive parameters in male Wistar rats demonstrates the genotoxicity of FA to be directly related to the decrease in sperm concentration and motility as well as with increased DNA fragmentation.

Conflicts of interests

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

J. Jimenez-Villarreal and N.D. Betancourt-Martínez were supported by CONACyT scholarships (#268684 and #216334, respectively). We thank the academic training of J. Jimenez-Villarreal, the COECYT, CONACYT and PIFI Federal program for a research travel grant at A Coruña (Biomedical Research Institute) and Madrid (Genetics Department, Autonomous of Madrid University, Cantoblanco) Spain. J. Morán Martínez was supported by Fogarty International Center CareerTrac, School of Public Health, University of California at Los Angeles (Grant #D43TW623; Program Name: ITREOH). We thank Coordinación General de Estudios de Posgrado e Investigación of the Universidad Autónoma de Coahuila for partial support of the study.

REFERENCES

- Agarwal A and Allamaneni SSR (2005). Alteraciones de la cromatina espermática en la etiopatogenia de la infertilidad masculina. *Rev. Int. Androl.* 3: 31-37.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (1999). Toxicological Profile of Formaldehyde. Available at [<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp111.pdf>]. Accessed January 21, 2015.
- Balhorn A (1982). Model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J. Cell Biol.* 93: 298-305.
- Bolt HM (1987). Experimental toxicology of formaldehyde. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 113: 305-309.
- Cassidy SL, Dix KM and Jenkins T (1983). Evaluation of a testicular sperm head counting technique using rats exposed to dimethoxyethyl phthalate (DMEP), glycerol monochlorohydrin (GMCH), epichlorohydrin (ECH), formaldehyde (FA), or methyl methanesulphonate (MMS). *Arch. Toxicol.* 53: 71-78.
- Cortés-Gutiérrez EI, Dávila-Rodríguez MI, López-Fernández C, Fernández JL, et al. (2007). Evaluación del daño en el DNA espermático assessing sperm DNA damage. *Actas Urol. Esp.* 31: 120-131.
- Duong A, Steinmaus C, McHale CM, Vaughan CP, et al. (2011). Reproductive and developmental toxicity of formaldehyde: A systematic review. *Mutat. Res.* 728: 118-138.
- EPA (2011). Review of the Environmental Protection Agency's Draft IRIS Assessment of Formaldehyde. Available at [<http://www.nap.edu/catalog/13142.html>]. Accessed January 6, 2013.
- Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, et al. (2003). The sperm chromatin dispersion test: A simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J. Androl.* 24: 59-66.
- Gil-Villa AM, Cardona-Maya WD and Cadavid-Jaramillo AP (2007). Early embryo death: Does the male factor play a role? *Arch. Esp. Urol.* 60: 1057-1068.
- Golalipour MJ, Azarhoush R, Ghafari S, Gharravi AM, et al. (2007). Formaldehyde exposure induces histopathological and morphometric changes in the rat testis. *Folia Morphol.* 66: 167-171.
- Golalipour MJ, Azarhoush R, Ghafari S, Davarian A, et al. (2009). Can formaldehyde exposure induce histopathologic and morphometric changes on rat kidney? *Int. J. Morphol.* 4: 1195-1200.
- Gurel A, Coskun O, Armutcu F, Kanter M, et al. (2005). Vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in frontal cortex and hippocampus: biochemical and histological studies. *J. Chem. Neuroanat.* 29: 173-178.
- Heck HD, White EL and Casanova-Schmitz M (1982). Determination of formaldehyde in biological tissues by gas chromatography/mass spectrometry. *Biomed. Mass Spectrom.* 9: 347-353.

- IARC (1995). Formaldehyde. In: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Wood, Dust and Formaldehyde. Vol. 62. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 217-362.
- Johannsen FR, Levinskas GJ and Tegeris AS (1986). Effects of formaldehyde in the rat and dog following oral exposure. *Toxicol. Lett.* 30: 1-6.
- Lino-dos-Santos-Franco A, Correa-Costa M, Durão AC, de Oliveira AP, et al. (2011). Formaldehyde induces lung inflammation by an oxidant and antioxidant enzymes mediated mechanism in the lung tissue. *Toxicol. Lett.* 207: 278-285.
- Liteplo RG, Beauchamp R, Meek ME and Chénier R (2002). Formaldehyde. In: Concise International Chemical Assessment Document 40 World Health Organization Geneva. Available at [<http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad40.pdf>]. Accessed December 15, 2014.
- Lu K, Boysen G, Gao L, Collins LB, et al. (2008). Formaldehyde-induced histone modifications *in vitro*. *Chem. Res. Toxicol.* 21: 1586-1593.
- Lu K, Collins LB, Ru H, Bermudez E, et al. (2010). Distribution of DNA adducts caused by inhaled formaldehyde is consistent with induction of nasal carcinoma but not leukemia. *Toxicol. Sci.* 116: 441-451.
- Majumder PK and Kumar VL (1995). Inhibitory effects of formaldehyde on the reproductive system of male rats. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 39: 80-82.
- Manicardi GC, Tombacco A, Bizzarro D, Bianchi U, et al. (1998). DNA strand breaks in ejaculated human spermatozoa: comparison of susceptibility to the nick translation and terminal transferase assays. *Histochem. J.* 30: 33-39.
- Somers MC and Cooper ND (2009). Air pollution and mutations in the germline: are humans at risk? *Hum. Genet.* 125: 119-130.
- Tajaddini S, Ebrahimi S, Behnam B, Bakhtiyari M, et al. (2014). Antioxidant effect of manganese on the testis structure and sperm parameters of formalin-treated mice. *Andrologia* 46: 246-253.
- Tang M, Xie Y, Yi Y and Wang W (2003). Effects of formaldehyde on germ cell of male mice. *Wei Sheng Yan Jiu* 32: 544-548.
- Til HP, Woutersen RA, Feron VJ, Hollanders VH, et al. (1989). Two-year drinking water study of formaldehyde in rats. *Food Chem. Toxicol.* 27: 77-87.
- Treulen F, Uribe P, Boguen R and Villegas JV (2015). Mitochondrial permeability transition increases reactive oxygen species production and induces DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 30: 767-776.
- Vosoughi S, Khavanin A, Salehnia M, Asilian Mahabadi H, et al. (2012). Effects of simultaneous exposure to formaldehyde vapor and noise on mouse testicular tissue and sperm parameters. *J. Health Scope* 1: 110-117.
- Wang HX, Zhou DX, Zheng LR, Zhang J, et al. (2012). Effects of paternal occupation exposure to formaldehyde on reproductive outcomes. *J. Occup. Environ. Health* 54: 518-524.
- Ward WS (1993). Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biol. Reprod.* 48: 1193-1201.
- Ward WS and Coffey DS (1991). DNA packaging and organization in the mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol. Reprod.* 44: 569-574.
- WHO (World Health Organization) (1989). Environmental Health Criteria 89, Formaldehyde. Available at [<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc89.htm>]. Accessed January 5, 2013.
- WHO (World Health Organization) (2000). Air Quality Guidelines for Europe. 2nd edn. Available at [http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0005/74732/E71922.pdf]. Accessed January 10, 2013.
- Zahra T, Tajik P, Fazelipour S and Taghva M (2007). Effect of formaldehyde injection in mice on testis function. *Int. J. Pharmacol.* 3: 421-424.
- Zhang J, Zhou D and Wang H (2011). Effects of acute formaldehyde exposure on serum testosterone content and sexual behavior in adult male rats. *Chin. J. Clin.* 5: 9.
- Zhou DX, Qiu SD, Zhang J, Tian H, et al. (2006). The protective effect of vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in the testes of adult rats. *Asian J. Androl.* 8: 584-588.
- Zhou DX, Zhang J and Wang H (2011). Assessment of the potential reproductive toxicity of long-term exposure of adult male rats to low-dose formaldehyde. *Toxicol. Ind. Health* 27: 581-598.
- Zribi N, Chakroun NF, Elleuch H, Abdallah FB, et al. (2011). Sperm DNA fragmentation and oxidation are independent of malondialdehyde. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9: 47.