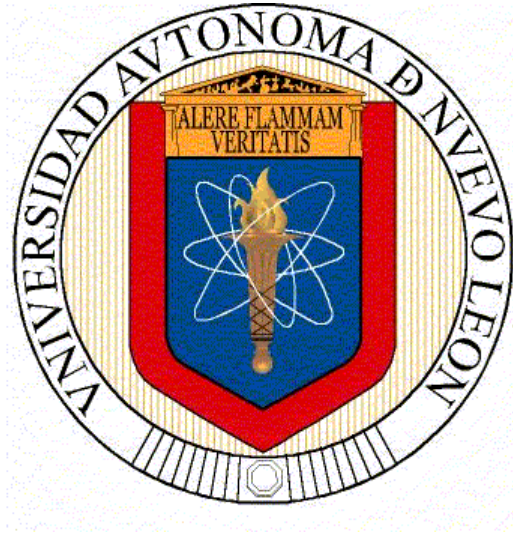


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**TOXICIDAD DEL PLOMO, CADMIO Y ARSÉNICO DESPUÉS DE UNA
EXPOSICIÓN CRÓNICA EN EL DNA DEL ESPERMATOCITO PRIMARIO DE
LA RATA MACHO**

Por


MARTHA PATRICIA NAVA HERNÁNDEZ

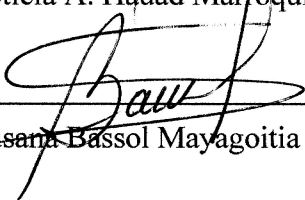
**Como requisito para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS
con acentuación en: Química de Productos Naturales.**

Julio, 2009

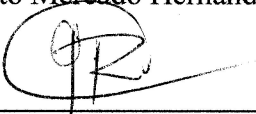
**TOXICIDAD DEL PLOMO, CADMIO Y ARSÉNICO DESPUÉS DE UNA
EXPOSICIÓN CRÓNICA EN EL DNA DEL ESPERMATOCITO PRIMARIO DE
LA RATA MACHO**

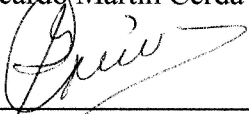
Comité de tesis


Dra. Leticia A. Háuad Marroquín Directora Interna


Dra. Susana Bassol Mayagoitia Directora Externa

Dr. Roberto Mercado Hernández Secretario


Dr. Ricardo Martín Cerda Flores Vocal


Dra. Guadalupe García Arenas Vocal



Dra. Diana Reséndez Pérez Subdirectora de Posgrado

TABLA DE CONTENIDO

| Sección | Página |
|---|---------------|
| 1. RESUMEN Y ABSTRACT | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 4 |
| 3. HIPOTESIS | 10 |
| 4. OBJETIVOS | |
| 4.1 Objetivo general | 10 |
| 4.2 Objetivos particulares | 10 |
| 5. ANTECEDENTES | 12 |
| 5.1 Metales Pesado | 14 |
| 5.1.1 Plomo | 17 |
| 5.1.2 Efectos en la Salud | 20 |
| 5.2 Cadmio | 21 |
| 5.2.1 Efectos en la Salud | 23 |
| 5.3 Arsénico | 26 |
| 5.3.1 Efectos en la Salud | 28 |
| 5.4 Espermatogénesis | 30 |
| 5.5 Mecanismos de reparación del DNA | 39 |
| 5.5.1 Reparación del apareamiento incorrecto de una sola base | 41 |
| 5.5.2 Reparación por escisión | 42 |
| 5.5.3 Reparación por unión de extremos de DNA no homólogo | 43 |
| 5.6 Genotoxicidad de Plomo, Cadmio y Arsénico | 44 |
| 6. METODOS | 50 |
| 6.1 Reactivos | 50 |
| 6.2 Animales | 51 |
| 6.3 Diseño del Estudio | 52 |

| | | |
|-------|---|----|
| 6.4 | Elutriación | 55 |
| 6.4.1 | Principios de separación celular | 57 |
| 6.5 | Preparación de la suspensión celular | 59 |
| 6.6 | Ensayo Cometa | 61 |
| 6.7 | Espectrofotometría de absorción atómica | 63 |
| 6.7.1 | Mediciones de Plomo y Cadmio en sangre | 63 |
| 6.7.2 | Mediciones de Arsénico en orina | 64 |
| 6.8 | Análisis estadístico | 65 |
| 7. | RESULTADOS | 66 |
| 7.1 | Peso corporal e Ingesta de Agua | 66 |
| 7.2 | Niveles de Plomo y Cadmio en sangre y Arsénico en orina | 67 |
| 7.3 | Daño en el DNA | 68 |
| 8. | DISCUSION | 71 |
| 9. | CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 75 |
| 10. | BIBLIOGRAFIA | 76 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|--|---------------|
| 1. Producción global y consumo de metales tóxicos 1850-1990. | 16 |
| 2. Concentración de plomo en sangre en niños (USA) | 18 |
| 3. Células germinales que no han completado su desarrollo | 31 |
| 4. Espermatogénesis | 32 |
| 5. Esquema del epitelio seminífero del testículo humano | 33 |
| 6. Esquema de un corte transversal através de un túbulo seminífero. | 37 |
| 7. Corte histológico del túbulo seminífero de la rata | 38 |
| 8. DNA de cadena simple | 46 |
| 9. Unión del plomo al grupo fosfato | 46 |
| 10. Rata cepa Wistar, utilizadas en el estudio | 52 |
| 11. Punción cardiaca | 54 |
| 12. Cajas metabólicas para recolección de orina de 24 hrs. | 54 |
| 13. Esquema del equipo de elutriación. | 55 |

| | |
|--|----|
| 14. Equipo de elutriación del departamento de Biología de la Reproducción, Facultad de Medicina de Torreón | 56 |
| 15. Diferentes estadios de células obtenidos en el proceso de elutriación. | 61 |
| 16. Espermatocono primario con daño en su DNA | 70 |
| 17. Espermatocono primario sin daño en su DNA | 70 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | Página |
|---|---------------|
| I. Parámetros de la purificación de la célula germinal | 60 |
| II. Peso corporal e ingesta de agua por semana | 67 |
| III. Daño en DNA, niveles en sangre de plomo, cadmio y concentración de arsénico en orina | 69 |

RESUMEN

Los agentes tóxicos pueden interferir con el sistema reproductor masculino en muchos puntos específicos. Uno de los mayores cuestionamientos sin resolver acerca de la infertilidad masculina es el origen molecular. Estudios clínicos en humanos y en animales indican que las anormalidades en la espermatogénesis resultan de una exposición a tres metales tóxicos (plomo, cadmio y arsénico), pero sus efectos en el DNA del espermatozoido primario de la rata macho después de una exposición crónica a estos metales no ha sido identificada. El propósito de este estudio fue analizar en tres experimentos independientes, el daño al DNA inducido por plomo (Pb), cadmio (Cd), y arsénico (As) en la célula germinal de la rata macho durante tres periodos de tiempo y conocer la relación entre el daño en el DNA y los niveles de plomo y cadmio en sangre y arsénico en orina. Para acetato de plomo y cloruro de cadmio la muestra de sangre fue recolectada mediante una punción cardíaca, y para trióxido de arsénico se recolectó orina de 24 horas. Posteriormente los animales fueron sacrificados por decapitación. Los espermatozoidos en la fase de paquiteno fueron purificados mediante una tripsinización seguida de una elutriación. Después de establecer la pureza y viabilidad de las células, el daño en el DNA (longitud de la cola) fue medido utilizando el ensayo cometa. Se encontró una relación significativa entre el daño en el DNA y los metales pesados en el

espermatocono primario. En conclusi3n estos hallazgos indican que la exposici3n a metales t3xicos afecta al DNA del espermatocono primario y sugieren una posible toxicidad testicular directa.

ABSTRACT

Toxic agents can interfere with the male reproductive system at many targets. One of the major unresolved questions concerning male infertility is identification of the molecular origin. Clinical and animal studies indicate that abnormalities of spermatogenesis result from exposure to three toxic metals (lead acetate, cadmium chloride, and arsenic trioxide), but the effects on primary spermatocyte DNA of the male rat after chronic exposure to these metals have not been identified. The aims of this study were to analyze, in three independent experiments, the DNA damage induced by lead (Pb), cadmium (Cd), and arsenic (As) in rat germinal cells during three time periods, and to know the relationship between DNA damage and blood Pb, blood Cd, and urine As levels. For Pb acetate and Cd chloride, blood was collected by cardiac puncture, while for As trioxide, a 24-h urine sample was collected. Afterward, the animals were sacrificed by decapitation. Pachytene spermatocytes from rat testes were purified by trypsin digestion followed by centrifugal elutriation. After establishment of cell purity and viability, DNA damage (tail length) was measured employing single cell gel/comet assay. Significant relationships between DNA damage and toxic metals at primary spermatocyte were found in chronic exposition (13 weeks). In conclusion, these findings indicate that exposure to toxic metals affects primary spermatocyte DNA and are suggestive of possible direct testicular toxicity.

2.- INTRODUCCIÓN

Los testículos representan uno de los mayores sistemas celulares con riesgo cuando los animales son expuestos a agentes genotóxicos medioambientales que causan daño al DNA debido a mutaciones heredables (Atorino et al., 2001). En los testículos, la espermatogénesis ocurre en tres fases; proliferación mitótica de la espermatogonia; reducción mitótica y división del espermatocito y diferenciación espermatide haploide (espermatogénesis) para formar un espermatozoide maduro (Handel, 1998). Diversos y únicos eventos toman lugar durante la meiosis que no se llevan a cabo en las células somáticas, las dos más importantes inician con el apareamiento de los cromosomas y recombinación durante la profase I (Hawley, 1988) y la reposición de las histonas con protaminas durante la condensación de la cromatina (Handel, 1998). Durante la replicación del DNA, pueden ocurrir errores, especialmente en el estadio de paquíteno, cuando en momentos de regular cortes en el DNA toman lugar síntesis de reparación las cuales son conocidas como reparaciones recombinantes. Aunque la espermatide secundaria no replica su DNA, ellas parecen ser capaces de reparar su daño genético antes de que ocurra la última condensación nuclear de la cromatina (Handel, 1998).

En los últimos años, la infertilidad masculina ha recibido la atención de investigadores involucrados en diferentes campos como toxicología, genética y

biología celular y molecular. Sus trabajos se han enfocado en los mecanismos fisiológicos y patológicos fundamentales en los defectos en la espermatogenesis.

En toxicología, varias observaciones sugieren que la salud reproductiva tanto de humanos como de animales ha sufrido efectos adversos como resultado de exposición medioambiental a químicos que interactúan con el sistema endocrino. Estas sustancias ejercen sus efectos durante el desarrollo embriológico de las gónadas y tracto genital o en las funciones testiculares en adultos (Ashby et al. 1997; Cooper et al. 1997; Cheek et al., 1998).

La continua producción de gametos masculinos en los mamíferos depende de un interrumpido inicio de la proliferación de espermatogonias y su diferenciación del espermatozoide maduro. El proceso requiere de interacciones precisas entre factores del eje hipotálamo-hipófisis-testículo (Shetty et al., 2001). Diariamente se producen 107 espermatozoides por gramo de tejido testicular. En cada especie de mamíferos el tiempo requerido para completar este proceso es único e inalterable (Franca et al., 1998).

La espermatogonia inicia un periodo de crecimiento como espermatocito y cada espermatocito es sometido a dos divisiones meióticas para producir espermátides haploides. Este proceso concluye con un periodo de maduración espermática durante el cual el material nuclear se condensa para formar la cabeza de un compacto espermatozoide móvil y la mayoría del citoplasma será desprendido como un cuerpo residual. Durante este proceso de proliferación, crecimiento y

maduración ocurren cambios en clase y cantidad de las macromoléculas sintetizadas por las células (Counot et al 1970; Loule et al., 1972). En cualquier sitio de los túbulos seminíferos se puede iniciar el proceso de espermatogenesis, el cual es cíclico y es seguido por una amplia y ordenada diferenciación celular. Ya que el ciclo de la célula en este proceso de diferenciación es genéticamente controlado, existen asociaciones celulares precisas para cada especie y estas relaciones son constantes (Russel et al 1990; Leblond et al., 1952).

Microscópicamente se puede diferenciar por especie la asociación celular presente en cortes histológicos de los túbulos seminíferos. Así también la duración de la espermatogenesis es diferente entre las especies, por ejemplo, en la rata el ciclo dura 12.9 días (Clemont y Harvey, 1965), en el ratón 8.6 días (Clemont y Trott, 1969) y en el humano 74 ± 4.5 días (Heller y Clemont, 1964).

El proceso complejo de la espermatogenesis ha presentado dificultades. La heterogénea población celular del testículo no permite llegar a conclusiones específicas debido al gran número de poblaciones de la célula germinal.

Análisis histoquímicos han ayudado en la localización de enzimas en células específicas; sin embargo, para análisis cuantitativos sería ideal obtener poblaciones celulares homogéneas del testículo (Bajpai et al., 1998).

Con la introducción de técnicas modernas de purificación como la elutriación es posible aislar y purificar poblaciones específicas de célula germinal en intervalo

de paquiteno durante la meiosis de la espermatogenesis que bioquímicamente se caracteriza por una estimulación importante de la actividad endonucleolítica donde este grupo de enzimas produce reparaciones en locus específicos del DNA; durante este estadio la célula es muy vulnerable a daños bioquímicos por agentes extracelulares (Stern y Hotta, 1977) (Stubbs y Stern, 1986) ya que entre más rápido se divide es más sensible a agentes externos y la espermatogonia demuestra una sensibilidad intermedia pero es una célula blanco muy importante para ocasionar oligospermia e infertilidad.

Cabe señalar, que el presente estudio se justificó dado que, en la comarca lagunera existen factores que han deteriorado la calidad de vida de sus habitantes como lo ha sido la industria del algodón, la agricultura y dos importantes fábricas metalúrgicas, las cuales fabrican diversos suplementos metálicos derivados principalmente del plomo, zinc, acero y cadmio. En un estudio previo conducido por investigadores de la Facultad de Medicina de Torreón, demostraron niveles significativos de plomo entre niños que viven cerca de una de estas fábricas. (Kordas et al., 2006) (Kordas et al., 2004).

Por otro lado, se reconoce en esta misma área geográfica que el agua esta contaminada por arsénico, así como la existencia de contaminación del suelo por arsénico, plomo y cadmio (Del Razo et al., 1990). Se han conducido estudios por grupos de nuestra universidad en individuos que viven en las zonas vecinas de las fabricas metalúrgicas encontrándose concentraciones altas de plomo en el líquido seminal y bajo porcentaje de espermatozoides móviles y viables al compararlos con grupos controles. También los niveles de Zinc fueron altos en los grupos expuestos

así como los de arsénico y en estos individuos la calidad espermática estaba disminuida en términos de concentración, movilidad y viabilidad (Hernández et al., 2005).

Además existen datos estadísticos derivados de investigaciones que son indicadores de baja calidad en salud reproductiva. Por ejemplo, embarazo en adolescentes de 10 a 23 años de edad; la prevalencia en México de nacimientos asociados a malformaciones congénitas es de 2.4/1000 nacimientos, en Coahuila esta cifra es superior con un nivel de 3.4/1000. Las alteraciones más comunes son: defectos del tubo neural, alta incidencia de malformaciones en general e infertilidad (Alfaro et al., 1994; Cortez et al., 1986).

La calidad deteriorada de vida en la Comarca Lagunera ocasionada por los factores de contaminación antes mencionados no ha sido investigada para evaluar efectos celulares y moleculares. Por esta razón es urgente y de alta prioridad establecer una asociación a nivel celular y molecular sobre el efecto de estos metales tóxicos y la célula germinal inmadura, seleccionando el estadio celular más vulnerable por su gran síntesis de DNA, como lo es el del espermatozoides primario y poder conocer si existe daño en su estructura por el plomo, cadmio y arsénico. En nuestro conocimiento no existen estudios utilizando este modelo de célula blanco bajo los efectos de estos metales, además, se estandarizó la metodología de elutriación, que en la República Mexicana no se ha empleado como una metodología de punta en la separación de poblaciones celulares específicas, además de que el

equipo es costoso y sólo existen dos grupos de investigadores nacionales que lo utilizan.

3.- HIPOTESIS

La exposición crónica a metales pesados provoca daño en la estructura del DNA de la rata macho.

4.- OBJETIVO

4.1 Objetivo General

Evaluar el daño genético en la estructura del DNA del espermatozoido primario de 27 ratas macho (prueba de ensayo cometa) expuestas a tres tratamientos de metales en forma independiente (9 a Pb, 9 a Cd y 9 a As) y analizar sus asociaciones.

4.2 Objetivos Particulares

1. Estandarizar la metodología de:

- a) Tripsinización, para la obtención de células germinales.
- b) Elutriación para la obtención de la población específica de espermatozoido primario.
- c) Tinción, para verificar la pureza de la muestra obtenida.

2. Evaluar los niveles de Pb y Cd en sangre y As en orina

3. Por medio de la técnica COMETA evaluar el nivel de daño ocasionado a nivel de DNA.

4. Relacionar el daño en el DNA con:

a) Dos dosis diferentes de concentraciones de Pb.

b) Dos dosis diferentes de concentraciones de Cd.

c) Dos dosis diferentes de concentraciones de As.

5.- ANTECEDENTES

Se ha considerado que en la exposición a metales pesados las gónadas son el principal órgano blanco (Clarkson et al., 1985) afectando primero a las células germinales tanto a la espermatogonia como al óvulo, posteriormente a la placenta y al desarrollo del embrión y finalmente al feto y a los estadios perinatales. En el humano ciertos metales pueden causar aborto, por ejemplo, el metal mercurio produce daño en la maduración del sistema nervioso. En un estudio se estimaron las concentraciones séricas de zinc en 244 embarazos anormales y se encontró que los niveles séricos de este metal fueron más bajos en embarazos con productos anencefálicos que en los normales (Buamah et al., 1984). Durante 20 años (1961-1980) se estudió la frecuencia de abortos espontáneos y de embarazos gemelares en una comunidad con una fábrica de productos con plomo y en una comunidad control sin una exposición específica a este metal (Saric M, 1984). Se evaluó también con el plomo la contaminación a zinc y cadmio. El promedio anual de aborto en la comunidad expuesta fue de 12/1000 y en la zona control fue de 6.7/1000 mujeres fértiles. La frecuencia acumulativa de nacimientos gemelares fue de 1.7/1000 habitantes en la zona con exposición y de 2.6/1000 en la zona control, los resultados indican una interferencia del plomo con la reproducción, apoyados por otros estudios como lo descrito por Logdberg de plomo (Logdberg et al., 1987) y los hallazgos de

supresiones cromosomales y otras aberraciones en células de hígado fetal, médula ósea y cerebro en ratones y monos expuestos a nitrato de plomo y a cloruro de cadmio (Nayak et al., 1989).

En animales adultos se ha observado un efecto central del plomo sobre el eje hipotálamo-hipófisis en las cuales bajas dosis de acetato de plomo en agua de bebida reduce los niveles séricos de prolactina y de LH (hormona luteinizante) significativamente (Sourgens et al., 1987). En otros estudios (Masson HJ, 1990; Saaranem et al., 1989) no se ha encontrado asociación entre exposición ocupacional a cadmio en el contenido del semen y calidad espermática o fertilidad, pero en otros reportes (Barrat et al., 1989; Krasovskii et al., 1979) se han descrito diferentes efectos adversos del plomo en animales sobre la disminución de la motilidad espermática, reducción en el número de espermatozoides, inhibición parcial de la espermatogenesis, cambios morfológicos de la célula de Leydig y un incremento en la actividad de la fosfatasa ácida. En el humano el arsénico, el cadmio y el plomo se han considerado mutagénicos y ocasionan malformaciones congénitas, abortos y cáncer.

Es un hecho que un incremento de aberraciones cromosómicas y aumento en el intercambio de cromátides hermanas se ha reportado en china en áreas expuestas a cadmio, (Tang et al., 1990) arsénico y a plomo (Beckman et al., 1978; Gasiorek y Bauchinger, 1981) aunque en otras publicaciones no se encontró asociación entre estos metales pesados y aberraciones cromosómicas (Bauchinger et al., 1976) (WHO

1985). En todos estos estudios los resultados son muy limitados para obtener conclusiones firmes.

La prevalencia de malformaciones congénitas reportadas en estudios mexicanos (Alfaro et al., 1995) es de 18.3x1000 nacidos vivos con un rango de 32.9-9.1x1000 (Canún., et al 1983, Cortez., et al 1986). La prevalencia en el área de la comarca lagunera es de 46x1000, más que el límite superior de la prevalencia nacional y el más alto valor reportado hasta la fecha en la República Mexicana. En otros estudios no mexicanos la alta prevalencia de malformaciones se ha relacionado con niveles altos congénitos de arsénico y plomo (Nordstrom et al., 1979; Carlsen et al., 1992).

Existen algunos datos publicados que sugieren que la exposición ocupacional a estos metales disminuye la fertilidad en el varón e incrementa la frecuencia de astenoteratozoospermia (WHO 1985).

Con estos antecedentes resulta prioritario ampliar los conocimientos acerca de los efectos tóxicos del plomo en el sistema reproductivo a nivel celular y molecular utilizando como célula blanco al espermatozoides primario de la rata macho adulta y analizando el número de poblaciones en este estadio celular en ratas expuestas crónicamente al plomo y sus controles, para en estudios posteriores analizar la estructura del DNA con éste mismo modelo.

5.1 Metales Pesados

Aunque no esta muy clara la definición de que es un metal pesado, la densidad es en la mayoría de los casos el factor que la define. Los metales pesados son así comúnmente definidos como aquellos que tienen una densidad de más de 5 g/cm³. La principal amenaza para la salud humana proveniente de los metales pesados esta asociada con la exposición a plomo, cadmio, mercurio y arsénico (el arsénico aunque es un metaloide, esta clasificado como un metal pesado). Estos metales han sido estudiados ampliamente y sus efectos en la salud regularmente revisados por agencias internacionales como WHO.

Aunque los efectos adversos en la salud por metales pesados han sido conocidos por mucho tiempo, la exposición a estos metales continúa y además se ha incrementado en algunas áreas. Por ejemplo, el mercurio es todavía utilizado en las minas de oro en muchas partes de América Latina. El arsénico es muy común en preservativos para maderas y el tetraethyl de plomo es todavía un aditivo común del petróleo, aunque estos usos han disminuido considerablemente en países desarrollados. (Figura 1)

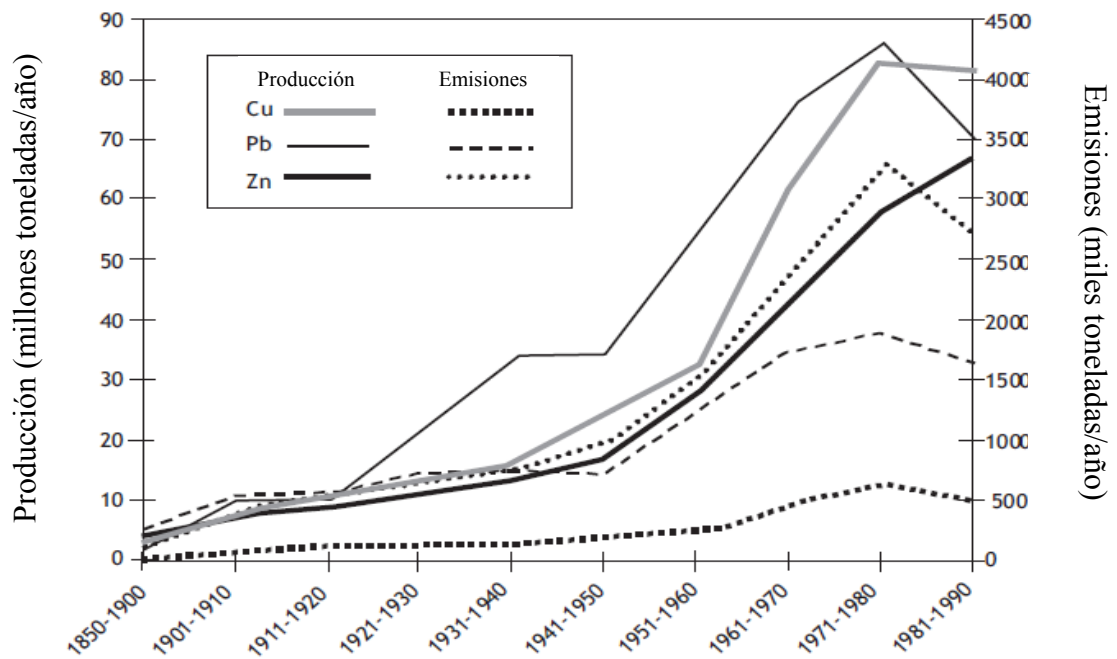


Figura 1. Producción global y consumo de metales tóxicos, 1850-1990.

A finales del siglo 20, sin embargo, las emisiones de los metales pesados empezaron a disminuir en los países desarrollados: en el Reino Unido, las emisiones de los metales pesados disminuyeron un 50% entre 1990 y 2000 (DETRS, 2001).

Las emisiones de metales pesados al medio ambiente ocurren via un amplio rango de procesos y caminos, incluyendo al aire (durante la combustión, extracción y procesamientos), a la superficie del agua (via la liberación de material almacenado y transporte) y al suelo (y de ahí a aguas subterráneas y coechas). Las emisiones atmosféricas tienden a ser mayores en términos de salud humana, tanto por las cantidades involucradas y la extensión de las dispersiones y potencialmente por la exposición resultante.

La gente puede estar expuesta a químicos potencialmente dañinos así como a agentes biológicos y físicos en el aire, alimentos, agua o suelo. Sin embargo, la exposición no resulta solamente de la presencia de un agente nocivo en el medioambiente. La llave mundial en la definición de exposición es contacto (Berglund et al., 2001). Debe haber contacto entre el agente y una parte exterior del cuerpo humano, tales como vías respiratorias, la piel ó la boca. La exposición es a menudo definida como una función de concentración y tiempo: “un evento que ocurre cuando hay contacto entre un el ser humano y el medioambiente con un contaminante de una concentración específica por un intervalo de tiempo” (NRC, 1991). Para que una exposición ocurra, por lo tanto, debe existir una co-existencia entre las personas y los metales pesados.

5.1.1 Plomo

Incidencia, exposición y dosis

La población en general, esta expuesta al plomo por el aire y comida en proporciones prácticamente iguales. En los inicios, el plomo en los alimentos, estaba originado por las cazuelas utilizadas para cocinar y almacenar comida, el acetato de plomo fue previamente utilizado para suavizar vino. Durante el último siglo las emisiones de plomo al ambiente han llevado a una contaminación de nuestro medioambiente, arriba del 50% de las emisiones de plomo son originadas del petróleo. Atraves de las últimas décadas, sin embargo, las emisiones en países desarrollados han disminuido considerablemente debido a la introducción de petróleo

sin plomo. Subsecuentemente los niveles de plomo en la población han disminuido (Figura 2).

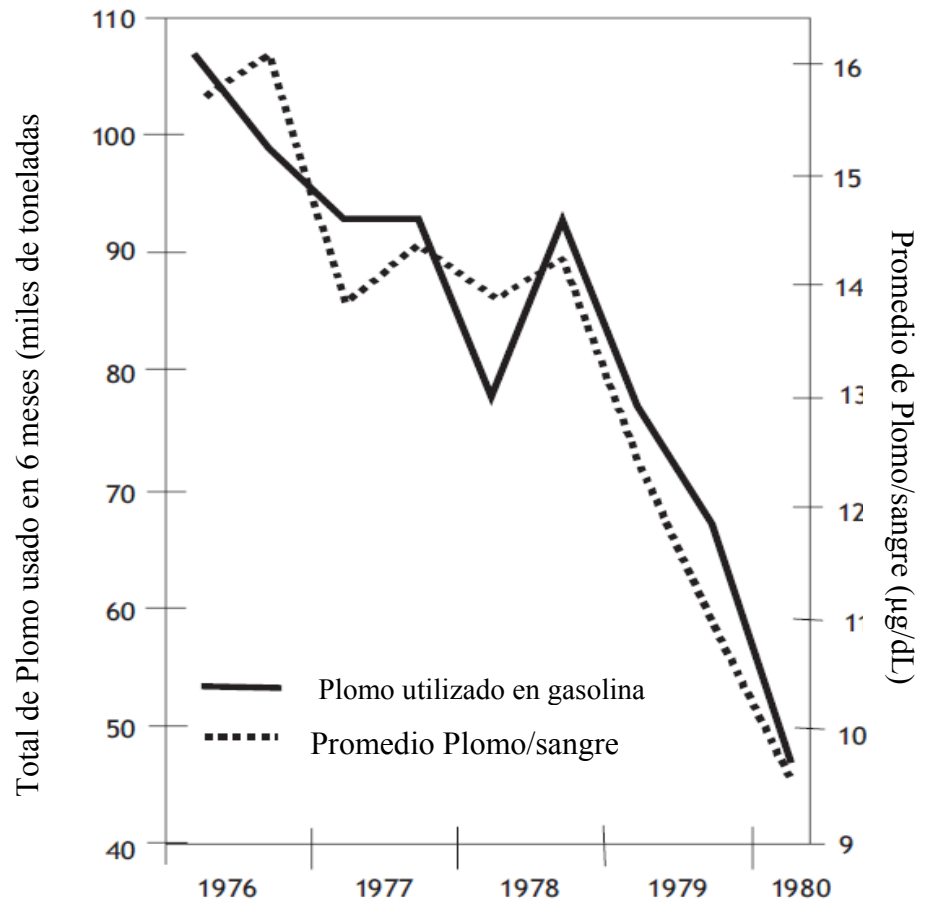


Figura 2. Concentraciones de plomo en sangre de niños (USA)

La exposición ocupacional a plomo inorgánico ocurre en minas, fundidoras así como en talleres de pintura y en plantas donde se fabrican baterías. Una baja a moderada exposición puede tener lugar en la industria del vidrio. Altos niveles de emisiones en el aire pueden contaminar áreas cercanas a las minas y fundidoras. El plomo llevado por el aire, puede ser depositado en el suelo y el agua, así es como llegan a formar parte de la cadena alimenticia del hombre. Arriba del 50% del plomo inorgánico inhalado puede ser absorbido por los pulmones. Los adultos pueden absorber entre un 10-15% del plomo en los alimentos y los niños hasta un 50% a través del tracto gastrointestinal. El plomo en la sangre se une a los eritrocitos y su eliminación es lenta y principalmente vía urinaria. El plomo se acumula en huesos y se libera de una forma muy lenta del mismo. La vida media del plomo en sangre es aproximadamente de un mes y en los huesos de 20 a 30 años (WHO, 1995).

En los adultos, el plomo inorgánico no penetra a la sangre y no traspasa las barreras del cerebro, sin embargo en los niños estas barreras están menos desarrolladas. La alta ingesta gastrointestinal y la permeabilidad de las barreras sanguíneas cerebrales hacen a los niños especialmente más susceptibles a las exposiciones a plomo con un consecuente daño cerebral. Los compuestos de plomo orgánico penetran tanto al cuerpo como a las membranas celulares. El tetrametilo de plomo y el tetraetilo de plomo penetran en la piel fácilmente. Estos compuestos pueden también cruzar las barreras sanguíneas cerebrales en los adultos, y así los adultos pueden sufrir de encefalopatías relacionadas a una exposición aguda a compuestos orgánicos de plomo.

5.1.2 Efectos en la Salud

Los síntomas de una exposición aguda a plomo son dolor de cabeza, irritabilidad, dolor abdominal y varios síntomas relacionados al sistema nervioso. La encefalopatía por plomo es caracterizada por cansancio y sueño. Los niños pueden ser afectados en su comportamiento, aprendizaje y concentración. En casos severos de encefalopatías por plomo, las personas afectadas pueden sufrir sicosis aguda, confusión y reducción de la conciencia. Las personas que han estado expuestas a plomo por períodos largos pueden sufrir de deterioro de la memoria, reacciones prolongadas y reducción de sus habilidades para entender. Individuos con niveles de plomo en sangre arriba de $3\mu\text{mol/l}$ pueden mostrar signos y síntomas en el sistema nervioso periférico con una reducción en la velocidad de conducción nerviosa y sensibilidad dérmica. Si la neuropatía es severa las lesiones pueden ser permanentes. La clásica imagen de una intoxicación con plomo es una línea azul oscura en el margen gingival. En casos menos serios, el signo más obvio de envenenamiento por plomo es el desequilibrio en la síntesis de hemoglobina, y exposiciones a plomo por períodos largos puede conducir a anemia.

Los niveles de plomo en sangre en niños debajo de $10\mu\text{g/dl}$ hasta ahora han sido considerados como aceptables, pero estudios recientes indican que puede haber efectos toxicológicos a plomo a niveles bajos de exposición que los antes mencionados. Existe también evidencia que ciertos factores medioambientales y genéticos pueden incrementar los efectos perjudiciales del plomo sobre el desarrollo

neuronal, por lo tanto ciertos niños pueden presentar más vulnerabilidad a la neurotoxicidad al plomo (Lidsky y Schenider, 2003).

La Agencia Internacional para Investigaciones en Cáncer (IARC), clasificó al plomo como un “posible carcinógeno humano” basado en datos tanto de animales como de humanos en 1987. Desde entonces algunos estudios han sido publicados, la evidencia general del plomo como carcinógeno ha sido pobre, la mayoría de los órganos afectados son pulmones, estómago y gliomas (Steenland y Boffetta, 2000).

5.2 Cadmio

Incidencia, exposición y dosis

El cadmio se encuentra de manera natural en las minas al igual que el zinc, plomo y cobre. Los compuestos de cadmio son utilizados como estabilizadores en productos de PVC, pigmentos de colores, diversas aleaciones y ahora más comúnmente en baterías de níquel recargables. El cadmio metálico ha sido mayormente usado como un agente anticorrosivo. En Europa el uso de cadmio disminuyó considerablemente durante 1990, principalmente debido a la salida gradual de productos con cadmio, baterías de níquel y cadmio y la implementación de más legislaciones medioambientales. Pese a estas reducciones en Europa, la producción de cadmio, consumo y emisiones al medioambiente alrededor del mundo se han incrementado dramáticamente durante el siglo 20, Los productos conteniendo cadmio son raramente reciclados, y frecuentemente eliminados con la basura de las casas, por lo tanto contaminan el ambiente, especialmente si la basura es incinerada.

Fuentes naturales así como antropogénicas de cadmio, incluyendo emisiones industriales y la aplicación de fertilizantes y aguas residuales en las granjas, pueden llevar a la contaminación de suelos e incrementar la ingesta de cadmio por los vegetales y las cosechas, que son para el consumo humano.

Los cigarrillos es la mejor fuente de exposición a cadmio. Monitoreos biológicos de cadmio en la población general han mostrado que los cigarrillos pueden causar incrementos significativos de los niveles de cadmio en sangre, las concentraciones de los fumadores están en un promedio 4 – 5 veces más altas que los no fumadores (Jarup et al, 1998). A pesar de la evidencia de la exposición del medioambiente, el humo del cigarrillo si embargo es una pequeña contribución al cadmio total que se encuentra en el organismo (Hossn et al., 2001).

Los alimentos es la fuente más importante de exposición a cadmio en la población no-fumadora en la mayoría de los países (WHO, 1992). El cadmio se encuentra presente en la mayoría de los alimentos, pero las concentraciones varían grandemente, y la ingesta individual también varía considerablemente debido a los diferentes hábitos alimenticios (Jarup., 1998). Las mujeres tienen una baja ingesta de cadmio diariamente, ya que consumen menos energía que los hombres. La absorción gastrointestinal de cadmio puede estar influenciada por factores de nutrición, como en el caso del cobre (Flanagan., 1978).

El cadmio en sangre generalmente refleja la exposición en el momento, pero parcialmente también la vida media del cadmio en el organismo (Järup., 1993). Las concentraciones de cadmio en orina esta principalmente influenciada por una concentración crónica en el organismo, siendo proporcional a la concentración en el riñón. Los fumadores y gente que vive en áreas contaminadas tienen concentraciones urinarias altas de cadmio y los fumadores tienen concentraciones aproximadamente lo doble que los no fumadores (Jarup, 1998).

5.2.1 Efectos en la Salud

Las inhalaciones de cadmio por el humo o partículas pueden ser una amenaza para la salud, y aunque los efectos pulmonares agudos no son comunes, existen casos esporádicos (Seidal et al., 1993) (Barbee et al., 1999). La exposición al cadmio puede causar daño al riñón. Los primeros signos de una lesión renal es usualmente una disfunción tubular, evidenciada por un incremento en la excreción de proteínas de bajo peso molecular [tales como β_2 -microglobulina y α_1 -microglobulina (proteína HC)] o enzimas [tales como N-Acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG)] (Jarup, 1998) (WHO, 1992). Se ha sugerido que el daño en los túbulos puede ser reversible (Hotz et al., 1999), pero también existe una fuerte evidencia de que el cadmio induce daño tubular y es ciertamente irreversible (Japur, 1998).

WHO, estima que la excreción urinaria de 10 nmol/mmol de creatinina (corresponden a 200 mg Cd/Kg de corteza de riñón) puede constituir un “límite

crítico” bajo en el cuál el daño al riñón no ocurra. Sin embargo, WHO calcula que hasta 10% de individuos con estas concentraciones en el riñón pueden resultar con un daño tubular. Varios reportes han mostrado que el daño en el riñón y en los huesos pueden ocurrir inclusive a bajas concentraciones de cadmio en los riñones. Estudios europeos han demostrado que el cadmio induce daño en el riñón a la población en general con niveles de cadmio en los riñones de 2 – 3 $\mu\text{g Cd/g}$ de creatinina (Buchet et al., 1990) (Jarup et al., 2000).

El daño inicial en los tubulos puede progresar a un daño más severo en el riñón, en los años 50, se reportaron casos de trabajadores que expuestos a cadmio, desarrollaron una disminución en los niveles de filtración glomerular (Friberg, 1950). Esto ha sido confirmado por estudios posteriores en trabajadores ocupacionalmente expuestos (Bernard et al., 1992) (Järup et al., 1995). Un exceso de riesgo sobre piedras en el riñón, posiblemente relacionadas a un incremento de calcio en la orina seguido de un daño tubular, se ha demostrado en varios estudios (Järup et al., 1998).

Recientemente, una asociación entre exposición a cadmio y un daño renal crónico fue demostrado (Hellström et al., 2001). Utilizando un registro de pacientes, los cuales han sido tratados para urinemia, los investigadores encontraron un doble riesgo para las personas que viven cerca (< 2 km) de plantas industriales que emitan cadmio así como trabajadores expuestos ocupacionalmente.

Las exposiciones por largo tiempo a cadmio pueden causar daño a los huesos, los primeros reportes fueron hechos en Japón, donde la enfermedad de itai-itai (una

combinación de osteomalacia y osteoporosis) fue descubierta en 1950. La exposición fue causada por agua contaminada usada para irrigación de los campos de arroz. Algunos estudios fuera de Japón han reportado similares hallazgos (Jarup et al., 1998).

Durante los recientes años, nuevos datos han sido reportados sugiriendo que también exposiciones relativamente bajas a cadmio pueden elevar daño en los huesos, evidenciado por una baja de minerales en los huesos (osteoporosis) y fracturas (Staessen et al., 1999, Nordberg et al., 2002).

Experimentos en animales han sugerido que el cadmio puede ser un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares, pero en los estudios en humanos no se ha podido confirmar esto (Jarup et al., 1998). Sin embargo, un estudio Japonés mostró un exceso de riesgo de mortalidad cardiovascular en personas expuestas a cadmio con signos de daño en el riñón comparado con individuos sin daño en el riñón (Nishijo et al., 1995).

La (IARC), ha clasificado al cadmio como un carcinógeno humano (grupo 1) en base a evidencias tanto en humanos como animales de experimentación (IARCA, 1993). La IARC, sin embargo, notó que las evaluaciones estaban basadas en algunos estudios de cáncer de pulmón de poblaciones ocupacionalmente expuestas, a menudo con datos de exposición incorrectos, y sin la capacidad de considerar una posible confusión por fumar u otras asociaciones de exposición como arsénico y níquel. El cadmio ha sido asociado con cáncer de próstata, y estudios tanto positivos como

negativos han sido publicados. Datos anteriores han indicado una asociación entre la exposición a cadmio y cáncer de riñón (Kolonel, 1976). Estudios posteriores no han sido capaces de confirmar esto claramente, pero un largo estudio multicéntrico mostró un riesgo total significativo de células renales cancerosas, aunque una relación dosis-respuesta negativa no soportó una relación causa-efecto (Mandel et al., 1965). En otro estudio multicentrico sobre carcinoma en células renales, encontró un riesgo en personas ocupacionalmente expuestas (Pesch et al., 2000). En suma, la evidencia del cadmio como un carcinógeno humano es más bien débil, en particular después de una exposición oral. Por lo tanto, una clasificación del cadmio como “probable carcinogénico a humanos” (IARC grupo 2 A) sería más apropiado.

5.3 Arsénico

Incidencia, exposición y dosis

El arsénico es ampliamente distribuido como un metaloide, que se encuentra en las rocas, suelo, agua y aire. El arsénico inorgánico esta presente en el agua subterránea usada para beber en varios países alrededor del mundo (Bangladesh, Chile y China), donde los compuestos orgánicos del arsénico como el arsenobetain esta principalmente en el pescado, lo cuál puede elevar la exposición del humano (WHO, 2001).

Las fundidoras de metales no férricos y la producción de energía de combustible fósil son dos de los mayores procesos industriales de contaminación por plomo y arsénico de aire, agua y polvo, las actividades de fundición han sido de las

más grandes fuentes antropogénicas de contaminación (Chilvers et al., 1987). Otras fuentes de contaminación son los productos manufacturados y el uso de pesticidas a base de arsénico y preservativos para maderas.

Las concentraciones en el aire en zonas rurales van de <1 a 4 ng/m^3 y en la ciudad se pueden encontrar alrededor de los 200 ng/m^3 . Concentraciones más altas ($>1000 \text{ ng/m}^3$) se han medido cerca de áreas industriales. Las concentraciones en agua son usualmente de $<10 \text{ } \mu\text{g/l}$, aunque altas concentraciones pueden ocurrir cerca de áreas antropogénicas. Los niveles en polvo se encuentran usualmente en el rango de 1 a 40 mg/kg , pero la aplicación de pesticidas y la eliminación de desperdicios puede dar como resultado las altas concentraciones (WHO, 2001).

La población generalmente es expuesta al arsénico mediante la comida que ingiere así como en el agua de beber. La comida es la fuente más importante, pero en algunas áreas, el arsénico en el agua de beber es una fuente muy significativa de exposición al arsénico inorgánico. Los suelos contaminados donde se encuentran minas, también son una fuente importante de exposición al arsénico (WHO, 2001).

La absorción del arsénico inhalado por partículas suspendidas en el aire es altamente dependiente de la solubilidad y el tamaño de las partículas. Los compuestos solubles de arsénico son fácilmente absorbidos por el tracto gastrointestinal. Sin embargo, el arsénico inorgánico es ampliamente metilado en los humanos y los metabolitos son excretados por la orina (WHO, 2001).

Las concentraciones de arsénico ó sus metabolitos en sangre, cabello, uñas y orina han sido utilizados como biomarcadores de exposición. El arsénico en el cabello y uñas pueden ser utilizados como indicadores de exposiciones a arsénico en le pasado, si se tiene cuidado de no contaminar las muestras con arsénico externo. La especiación de los metabolitos en orina son expresados tanto en la forma de arsénico inorgánico ó como (arsénico inorgánico + MMA + DMA) y es generalmente la mejor estimación de una dosis de arsénico. Sin embargo, el consumo de ciertos alimentos de mar puede confundirla estimación de la expoición a arsénico inorgánico, por lo tanto, deben evitarse estos alimentos antes de tomar una muestra de orina (WHO, 2001).

5.3.1 Efectos en la Salud

El arsénico inorgánico es extremadamente tóxico y la ingesta de grandes cantidades lleva síntomas gastrointestinales, severas molestias del sistema cardiovascular así como el sistema nervioso central y eventualmente la muerte. En sobrevivientes se pueden llegar a observar problemas en médula ósea, hemólisis, hepatomegalias, polineuropatías y encefalopatías. La ingestión de arsénico inorgánico puede inducir enfermedades vasculares, los cuales en su forma extrema puede llegar a gangrena.

Las poblaciones expuestas a arsénico vía agua de beber muestras riesgo excesivo de mortalidad por cáncer de pulmón, vejiga y riñón. También existe un

incremento de cáncer de piel y otras lesiones en la piel, tales como hiperqueratosis y cambios de pigmentación.

Estudios en varias poblaciones expuestas a arsénico por inhalación, como trabajadores en refinerías, mineras y fabricantes de pesticidas en diferentes países consistentemente han demostrado un exceso en cáncer de pulmón. Aunque todos estos grupos están expuestos a otros químicos además del arsénico, no existe otro factor común que pueda explicar estos hallazgos.

Las últimas evaluaciones de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2001), concluyen en que la exposición al arsénico vía agua de beber esta casualmente relacionada al cáncer de pulmón, vejiga, riñón y piel y este último es precedido por una observación directa de lesiones precancerosas. La incertidumbre en las exposiciones en le pasado son importantes cuando se esta valorando la relación exposición-respuesta, si embargo parecería que las concentraciones de arsénico en el agua de beber de aproximadamente 100 µg/l han originado el cáncer en estos sitios, y el precursor de la piel de cáncer ha estado asociado con niveles de 50 – 100 µg/l.

La relación entre la exposición a arsénico y otros efectos en la salud son menos claros. Existe una relativa evidencia para la hipertensión y enfermedades cardiovasculares, pero las evidencias son sólo sugestivas para diabetes y efectos reproductivos y mucho menos clara para enfermedades cerebro vascular, efectos neurológicos y otros tipos de cáncer diferentes a pulmón, vejiga, riñón y piel.

5.4 Espermatogenesis

El término espermatogénesis se refiere a la secuencia completa de acontecimientos de tipo proliferativo y de modificaciones citológicas que acompañan a la maduración de las células germinales masculinas iniciales, las espermatogonias, hacia los espermatozoides maduros, (Figura 3). Desde un punto de vista descriptivo, se suele dividir este proceso en tres estadios o fases. En la primera de ellas, la espermatocitogénesis de tipo A sufre una serie de divisiones que incrementan su número y que dan lugar a la espermatogonia de tipo B. La división de esta última generación de espermatogonias hace aparecer los espermatocitos primarios. Durante la segunda fase de la espermatogénesis, la meiosis, los espermatocitos sufren dos divisiones madurativas que reducen a la mitad su número de cromosomas y que originan grupos de espermátidas. En la tercera fase, denominada espermiogénesis, las espermátidas atraviesan una espectacular secuencia de transformaciones citológicas que culminan en la liberación de los espermatozoides en la luz del túbulo seminífero (Leblond et al., 1952; Russell et al., 1990) (figura 4).

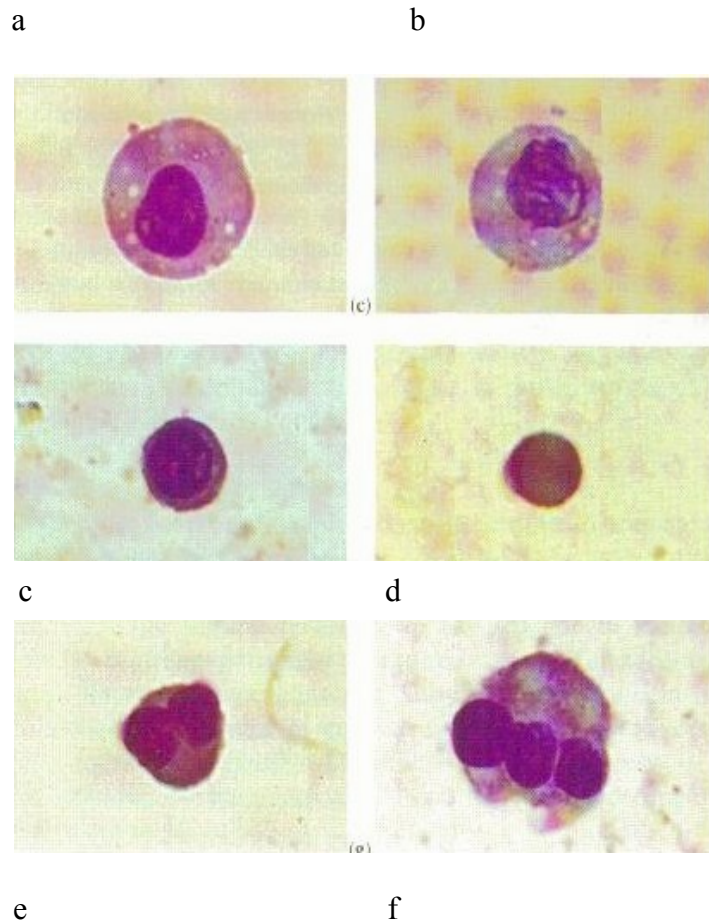


Figura 3. Células germinales que no han completado su desarrollo. Ellas se clasifican de acuerdo a su tinción y características morfológicas. En general su núcleo se tiñe de violeta púrpura y el citoplasma es gris utilizando la tinción de Leishman y Bryan. (a) Espermatogonia tipo A, (b) Espermatocito primario, (c) Espermatocito secundario, (d), (e) y (f) Espermatides. Varias espermatides pueden compartir un citoplasma común y se diferencian de un leucocito polimorfonuclear por su citoplasma granuloso.

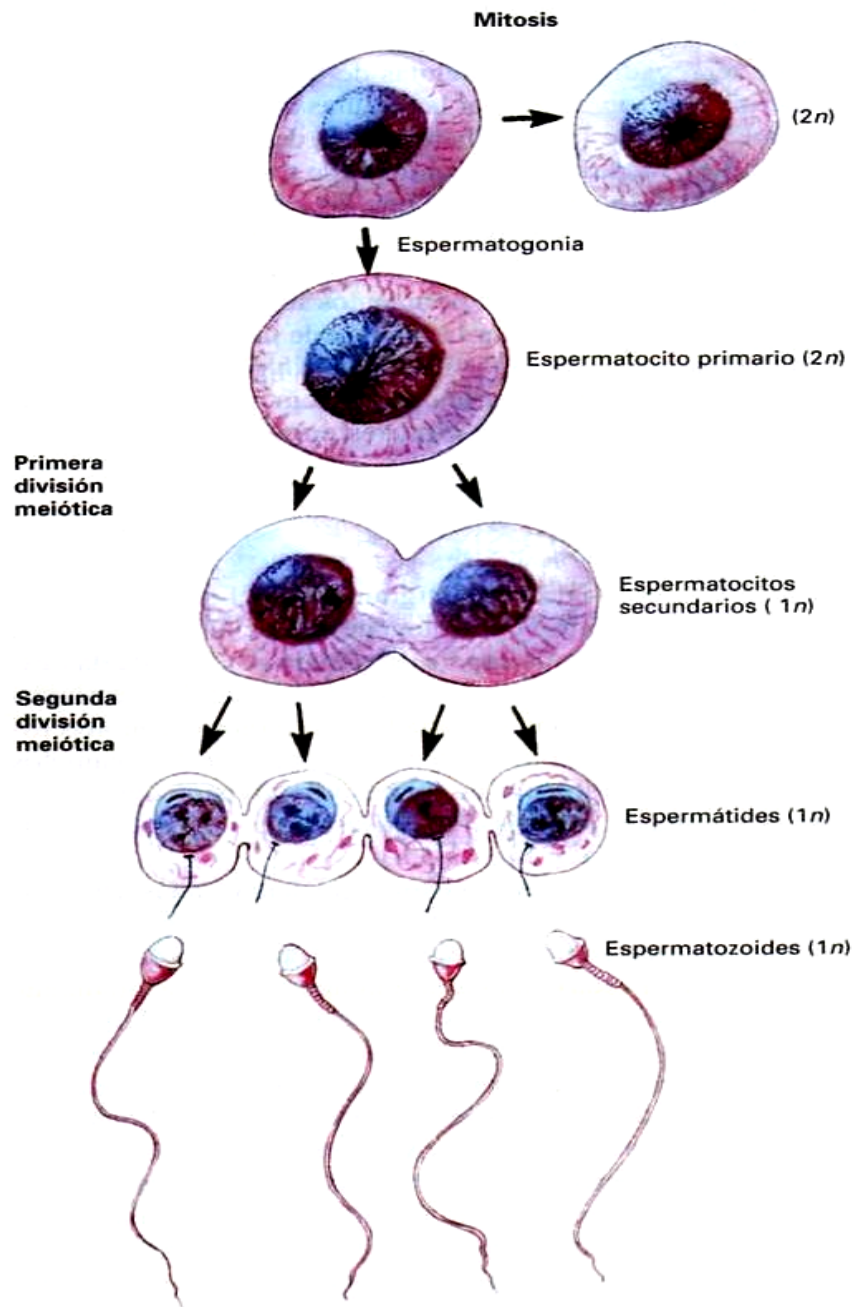


Figura 4. Las espermatogonias experimentan una división mitótica en la cuál se renuevan a sí mismas y producen una célula hija que entrará en división meiótica. Esta célula recibe el nombre de espermatocito primario. Al terminar la primera división meiótica, las células hijas reciben el nombre de espermatocitos secundarios. Cada una de ellas completa una segunda división meiótica para formar las espermátides. Observe que las cuatro espermátides producidas por la meiosis de un espermatocito primario están interconectadas. Cada espermátide forma un espermatozoide maduro.

Las espermatogonias de tipo A son células con forma de cúpula que descansan sobre la lámina basal del epitelio seminífero, las cuales se pueden observar en la, (figura 5).

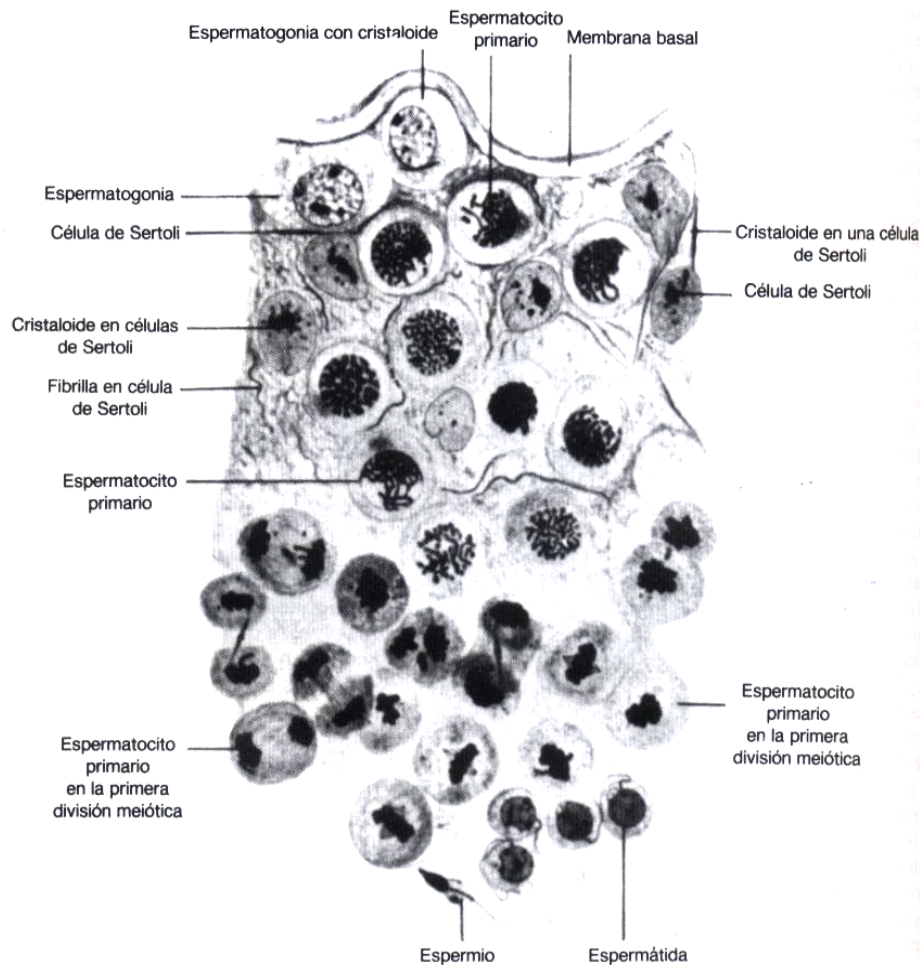


Figura 5. Esquema del epitelio seminífero del testículo humano en el que se observan las espermatogonias en la base del epitelio (parte superior de la figura), algunos espermatocitos primarios en la fase o estadio inicial de la meiosis, y otros (cerca de la luz) en la metafase y anafase de la primera división meiótica.

La espermatogonia tipo A tiene un núcleo ovoide que contiene una cantidad escasa de heterocromatina y dos nucléolos que se suelen localizar adyacentes a la

envoltura o membrana nuclear. Las espermatogonias de tipo B se distinguen por su núcleo más redondeado en el que se observan grumos más toscos de heterocromatina marginal, así como un único nucléolo de localización central. Los espermatocitos primarios son células grandes y redondeadas que siguen a la espermatogonia. Al poco tiempo de su origen por la división de las espermatogonias de tipo B, los espermatocitos primarios inician la profase de la primera división meiótica. Se pueden distinguir varias fases de la meiosis según las diferencias en la forma y las relaciones que presentan las parejas de cromosomas homólogos, y también por su grado de condensación. En la fase denominada leptoteno, los cromosomas aparecen como hilos largos y delgados que serpentean en el núcleo del espermatocito y que son difíciles de identificar en las preparaciones histológicas. Durante la fase siguiente, el cigoteno, se juntan los cromosomas homólogos constituyendo el número haploide de pares, que son más fáciles de identificar en las preparaciones histológicas de rutina. En la fase paquiteno, los pares cromosómicos se contraen longitudinalmente, aumentan de grosor y se hacen más conspicuos. Los dos miembros de cada par cromosómico también se dividen longitudinalmente, formándose unidades tetraméricas cada una de las cuales posee cuatro cromátidas paralelas. En la siguiente fase de la profase, diploteno, los segmentos correspondientes de los pares cromosómicos se intercambian en un proceso que es específico de la meiosis y que se denomina recombinación (crossing-over). De esta forma, los genes parentales se mezclan y reagrupan formando nuevas combinaciones (Fawcett, 1995).

La profase de la primera división meiótica es muy prolongada y dura aproximadamente 22 días. Por tanto, en los cortes histológicos del epitelio se puede observar más de una generación de espermatocitos en las diferentes fases o estadios de la profase. Al final de la profase desaparece la membrana nuclear y las unidades tetraméricas se disponen en el plano ecuatorial de la metafase. Durante la anafase, se separan los miembros de cada par homólogo de cromosomas y se desplazan hacia los extremos opuestos del huso. Por tanto, en la telofase el número de cromosomas de cada célula hija se reduce hasta el número haploide 23, y estos cromosomas son diferentes de los maternos y paternos debido a que se presentan los intercambios que se produjeron en la recombinación (Clemont, 1960).

Los espermatocitos secundarios resultantes de la primera división meiótica permanecen en interfase sólo un período muy corto de tiempo y, por tanto, no se suelen observar en los cortes histológicos de los túbulos seminíferos. La profase de la segunda división meiótica también es muy breve. Durante la metafase, los centrómeros de los cromosomas se dividen de una forma similar a como ocurre en la mitosis, permitiendo a las cromátidas emigrar hacia los polos opuestos durante la anafase. La telofase resulta en la aparición de dos espermátidas con un número haploide de cromosomas.

La meiosis incluye también un mecanismo que garantiza un número aproximadamente igual de descendientes masculinos y femeninos. De los 23 pares de cromosomas que poseen los espermatocitos primarios del ser humano, 22 están formados por autosomas y uno por cromosomas sexuales; estos últimos difieren entre

sí por su tamaño y por su dotación genética. Uno de ellos es el cromosoma X, que determina el sexo femenino, y el otro es el cromosoma Y que determina el masculino. La separación de los pares cromosómicos durante la anafase de la primera división, meiótica garantiza que las espermatidas, y los espermatozoides que derivan de ellas, serán de dos tipos: unas portadoras del cromosoma X y otras del Y. De esta manera, en el ser humano el masculino es el sexo heterogamético, mientras que el femenino es el sexo homogamético. (Stuart, 2003)

La investigación de las fases o estadios iniciales de la espermatogénesis se fundamentó durante mucho tiempo en los acontecimientos de la división nuclear (cariocinesis), suponiéndose que la división citoplasmática (citocinesis) de las células germinales no difería de la observada en las células somáticas. Los estudios con microscopía electrónica han demostrado en la actualidad que esta suposición era incorrecta. En todas las divisiones de las células germinales masculinas posteriores a las divisiones de renovación propia de las espermatogonias de tipo A, las células hijas permanecen conectadas mediante un puente intercelular en el que el surco de separación se une al haz de microtúbulos del huso que se extiende de polo a polo en la anafase. Estos puentes aparecen como estructuras transitorias en las telofases de las mitosis de las células somáticas. Sin embargo, en las divisiones de las células germinales masculinas persiste la comunicación entre las células hijas tras el desensamblaje de los microtúbulos del huso. Se pueden observar puentes intercelulares entre parejas de espermatogonias, en las cadenas de espermatocitos primarios y secundarios, y como estructuras de conexión en grupos grandes de espermatidas. De esta manera, la progeñe de una pareja de espermatogonias unidas

forma un grupo de células germinales que permanecen en continuidad citoplasmática durante todas las fases de diferenciación. Indudablemente, este mecanismo explica la sincronía de desarrollo observada en las células de cualquier área del epitelio seminífero. Los espermatozoides individuales se separan del sincitio en el momento de su liberación en la luz del túbulo, (Figura 6).

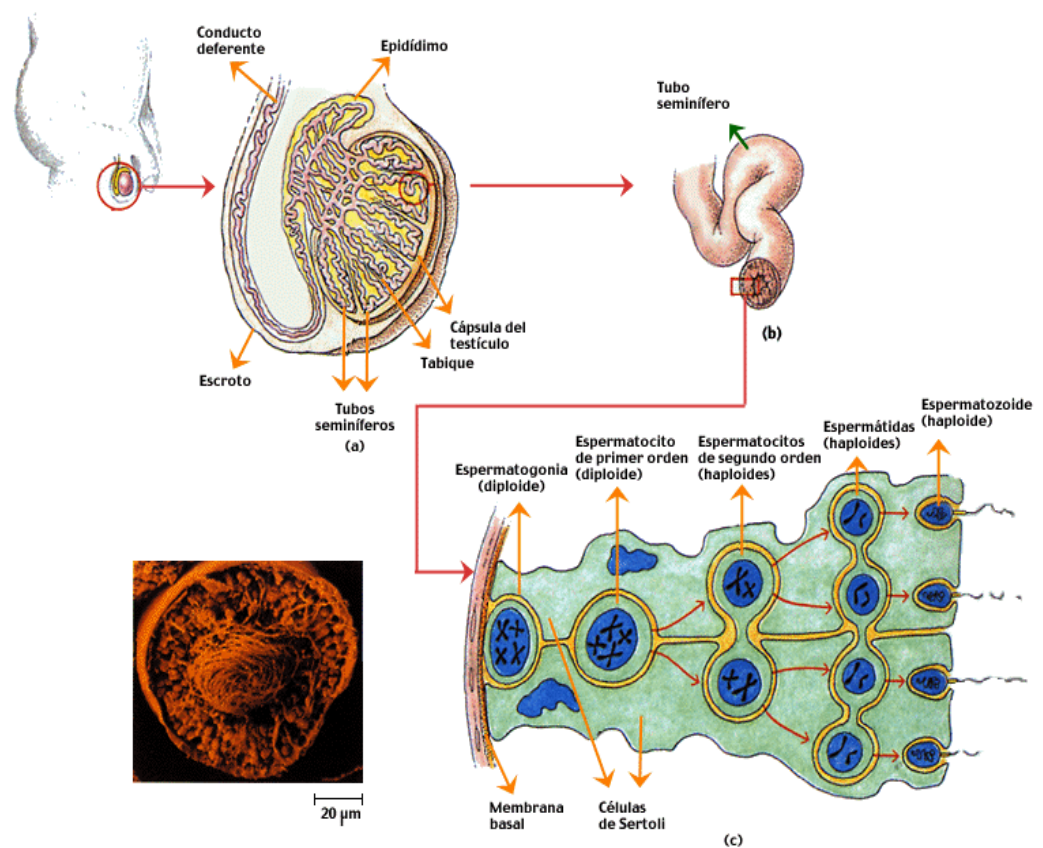


Figura 6. Esquema de un corte transversal a través de un túbulo seminífero, localizado en el testículo, donde ocurre la espermatogénesis. Las espermatogonias que son células de la línea germinal se localizan en la base del túbulo seminífero y se dividen por mitosis para proveer las células necesarias para la espermatogénesis. El proceso de meiosis que se inicia entre el espermatocito primario y el secundario reduce el número de cromosomas a la mitad. Todo el proceso de la espermatogénesis es facilitado por las células de Sertoli que proveen apoyo y alimento.

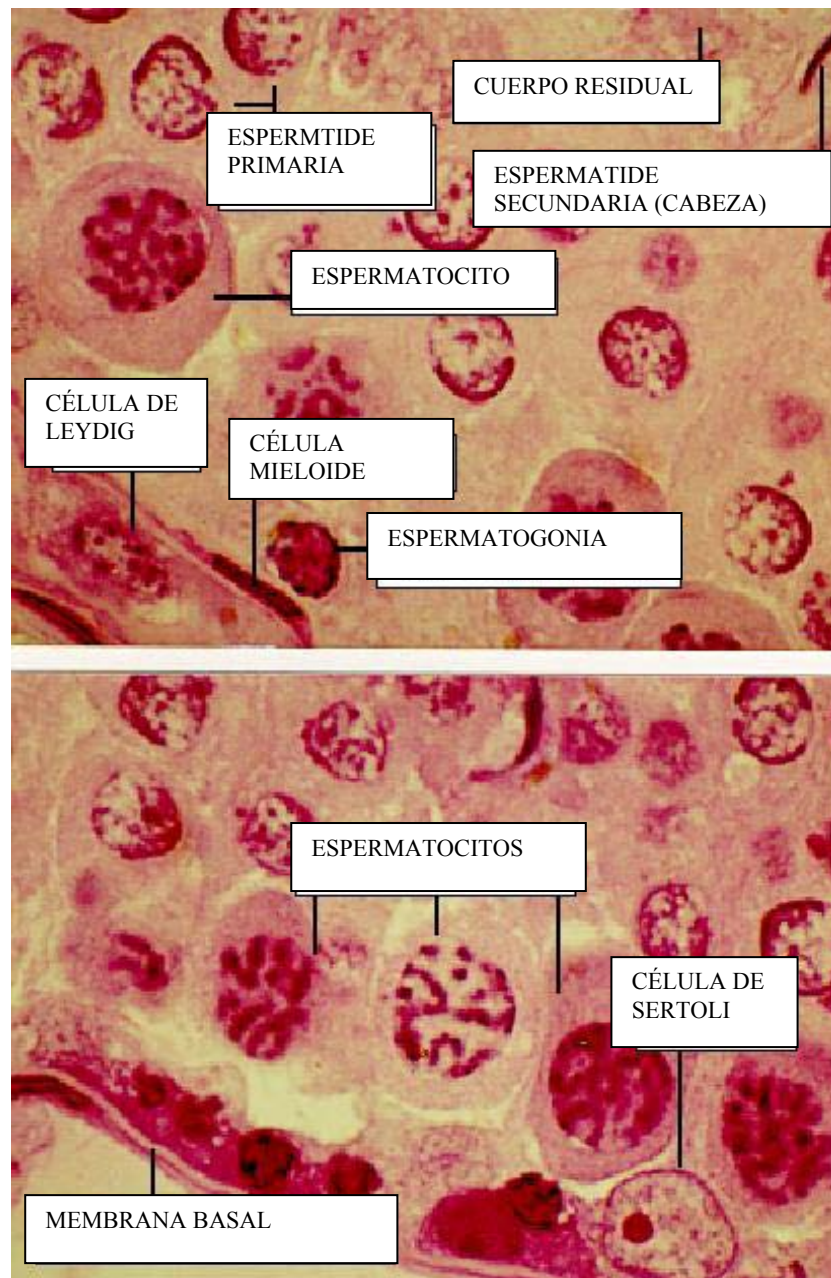


Figura 7. Corte histológico del túbulo seminífero de la rata, mostrando diferentes tipos de células espermáticas.

5.5 Mecanismos de reparación del DNA

El “daño” al DNA consiste en cualquier cambio que introduzca una desviación de la estructura habitual de doble hélice. (Lewin, 2001).

La secuencia del DNA puede modificarse como resultado de errores de copiado introducidos por las DNA polimerasas durante la replicación y por agentes ambientales, como las sustancias químicas mutagénicas y ciertos tipos de radiación. Si los cambios en la secuencia del DNA, cualquiera que sea la causa, se dejan sin corregir, las células somáticas y germinales podrían acumular tantas mutaciones que su funcionamiento sería imposible, y no se podría generar una descendencia viable. Por consiguiente, la corrección de los errores en la secuencia del DNA en todos los tipos celulares es importante para la supervivencia (Friedberg., et al, 1996).

Además de la actividad de lectura de prueba de las DNA polimerasas, que pueden corregir bases mal copiadas durante la replicación, las células han desarrollado mecanismos para reparar el DNA dañado por sustancias químicas o radiación.

Los organismos complejos, con genomas grandes y tiempos de generación relativamente prolongados, contienen numerosas células que se dividen con mucha lentitud o que no se dividen (células del hígado y cerebro). Estas células deben utilizar la información de su DNA durante semanas, meses e incluso años, lo que aumenta mucho la probabilidad de que se produzcan daños en su DNA. Si los

procesos de reparación fuesen ciento por ciento eficaces, los compuestos químicos y la radiación no representarían un peligro para el DNA celular. Por desgracia, la reparación de las lesiones causadas por algunos agentes ambientales es relativamente ineficaz y estas lesiones pueden conducir a mutaciones que en última instancia ocasionan un cáncer. En teoría, un carcinógeno podría actuar mediante su unión al DNA y la producción de un cambio en la secuencia que se perpetúa durante la replicación de éste. Sin embargo, los datos disponibles en la actualidad indican que muchos cambios permanentes de la secuencia del DNA son inducidos por los propios procesos de reparación que las células utilizan para deshacerse del DNA dañado (Chu, 1997).

Los mecanismos de reparación del DNA han sido ampliamente estudiados en *E. coli* mediante el empleo de una combinación de métodos genéticos y bioquímicos. La notablemente diversa colección de mecanismos enzimáticos de reparación descubiertos por estos estudios puede dividirse en tres amplias categorías:

- Reparación del apareamiento incorrecto, que se produce inmediatamente después de la síntesis DNA y utiliza la cadena progenitora como plantilla, para corregir la incorporación errónea de un nucleótido en la cadena recién sintetizada.
- Reparación por escisión, que comprende la eliminación de una región dañada por sistemas de nucleasas especializadas y luego la síntesis de DNA para rellenar la brecha.

- Reparación de roturas del DNA bicatenario, que en organismos multicelulares se lleva a cabo principalmente por un proceso de unión de extremos.

5.5.1 Reparación del apareamiento incorrecto de una sola base:

Muchas mutaciones espontáneas son puntiformes, o sea que comprenden un cambio en un solo par de bases de la secuencia del DNA. Pueden originarse por errores de la replicación, durante la recombinación genética y, en particular, por *desaminación de bases*, con lo cual un residuo de citocina (C) es convertido en uno de uracila (U).

Las células bacterianas y eucariontes poseen un sistema de reparación de errores de apareamiento que reconoce y repara todos los apareamientos incorrectos de una sola base, excepto C-C, como también pequeñas inserciones y deleciones. El problema conceptual en la reparación de estos malos apareamientos es determinar cuál es la cadena de DNA normal y cuál la mutante, y reparar esta última de manera que pueda aparearse en forma adecuada con la cadena normal (Kolodner, 1996).

5.5.2 Reparación por escisión:

Las células se valen de la reparación por escisión para reparar regiones del DNA con bases químicamente modificadas, a menudo llamadas *aducciones químicas*, que distorsionan la forma normal del DNA local. Un fundamento para este tipo de reparación es la capacidad de ciertas proteínas de deslizarse a lo largo de la superficie de una molécula de DNA bicatenario mientras buscan saliencias u otras irregularidades en la conformación de la doble hélice. Este mecanismo repara dímeros de timina (timina-timina), el tipo de daño más común que produce la luz UV, estos dímeros interfieren tanto en la replicación como en la transcripción del DNA. La reparación por escisión también puede corregir regiones del DNA con bases alteradas por la fijación de grupos químicos de gran tamaño como el benceno que es un carcinógeno (Lindahl., et al, 1997).

Los efectos de metales sobre los sistemas de reparación por escisión pueden ser ensayados mediante cultivos celulares en presencia y ausencia de concentraciones no tóxicas de metales después de la exposición de las células a agentes dañinos al DNA y monitorear la supervivencia y mutagenicidad. Puesto que existen una gran variedad de enzimas las cuales reconocen daños al DNA, agentes que causan diferentes tipos de daño deben ser probados. Si el metal inhibe la reparación por escisión, se verá un aumento en la frecuencia de mutaciones y disminuirá la sobrevivencia. Ensayos bioquímicos pueden ser usados para localizar con precisión los lugares que han sido afectados. Si las enzimas de reparación han sido

identificadas, ensayos directos de los efectos de los metales sobre estas enzimas pueden ser llevados a cabo (Rossman, 1981).

5.5.3 Reparación por unión de extremos de DNA no homólogos:

Una célula que ha sufrido una rotura bicatenaria particular en su DNA suele contener otras roturas; éstas pueden repararse reconectando los extremos libres del DNA. La unión de los extremos de corte de diferentes cromosomas, no obstante, conduce a la translocación de trozos de DNA de un cromosoma a otro. Estas translocaciones pueden desencadenar una proliferación celular anormal al colocar un protooncogén cerca, y por ende bajo el control inadecuado, de un promotor de otro gen. La radiación ionizante y los fármacos antineoplásicos, como la bleomicina, producen roturas bicatenarias lo que explica su uso para destruir células en rápida proliferación.

Las roturas bicatenarias sólo se reparan en forma correcta si los extremos libres del DNA se reconectan con exactitud. Esta reparación se complica por la ausencia de regiones monocatenarias que puedan dirigir el apareamiento de las bases durante el proceso de reconexión. Uno de los dos mecanismos que han surgido para reparar roturas bicatenarias es la recombinación homóloga. En este proceso, la rotura de la doble cadena en un cromosoma es reparada usando la información del cromosoma homólogo intacto.

Sin embargo, en los organismos multicelulares el mecanismo predominante para la reparación de las roturas bicatenarias comprende la reconexión de los extremos de dos moléculas de DNA. Aunque este proceso, produce una molécula bicatenaria continua, trae como consecuencia la pérdida de varios pares de bases a la altura del punto de unión. La aparición de una deleción posiblemente mutagénica como ésta es un ejemplo de cómo la reparación del daño del DNA puede introducir mutaciones. Un proceso similar puede vincular dos moléculas de DNA cortadas, incluso de diferentes cromosomas (Clark, 1991).

Para utilizar la reparación de ADN con fines terapéuticos, el desafío es descubrir qué enzimas específicos muestran mayor especificidad para los lugares dañados, de forma que su sobreexpresión conduzca a una reparación del ADN más eficiente. Una vez que se conozcan los factores de reparación adecuados, el paso siguiente es seleccionar los medios apropiados para insertarlos en la célula, para producir tratamientos viables de enfermedades y envejecimiento.

5.6 Genotoxicidad de Plomo, Cadmio y Arsénico.

Los metales pueden unirse a bases, grupos fosfatos o azúcares en los nucleótidos. Los grupos fosfato parecen ser el grupo coordinador más fuerte de los metales. En general, la estabilidad de los compuestos de metales a los nucleótidos refleja una firmeza de unión a los grupos fosfatos. Las lesiones de los grupos

fosfatos o azúcares del DNA se asume sean una pequeña consecuencia biológica a menos que se produzcan graves distorsiones en la cadena de DNA, (Eichhorn, 1973).

Bertini y colaboradores (1994) describieron en detalle los sitios de unión de los metales en el DNA. Sin los iones metálicos, no habría dúplex y reconocimiento de secuencias específicas usando las bases o proteínas. Los metales que pueden ser perjudiciales a los ácidos nucleicos son Cd, Cr, Ni, Co y Pb. El DNA de cadena simple, tiene dos sitios complejos para los metales (figura 8).

Las bases adenina (A) guanina (G) y citosina (C) contienen grupos amino hexocíclicos así como también anillos amínicos, sin embargo es el anillo amínico el que actúa como una base de Lewis. Las bases de Lewis ácidas difieren de una base a otra con la posición N7 de guanosina siendo más básica. Otras bases de Lewis encontradas en las nucleobases son N7 de adenosina, N3 de citosina y la N3 de timidina o uridina. Las aminas son ligandos suaves y preferentemente se unen a metales suaves como Pt (II), Pd (II) o Ru (II); sin embargo, algunos metales de transición, como el Cu (II) y el Zn (II), también se ha visto que forman complejos aunque con ligandos de mayor labilidad.

El otro sitio complejo de importancia para los metales en el DNA de cadena simple son los fosfatos. Los fosfatos se considera son ligandos fuertes y con preferencia por metales fuertes como el plomo (figura 9).

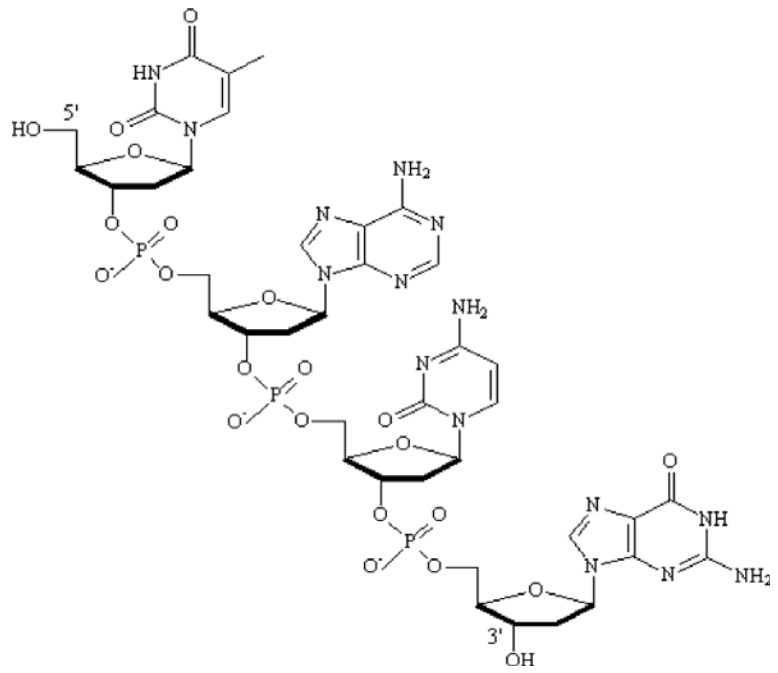


Figura 8. DNA de cadena simple

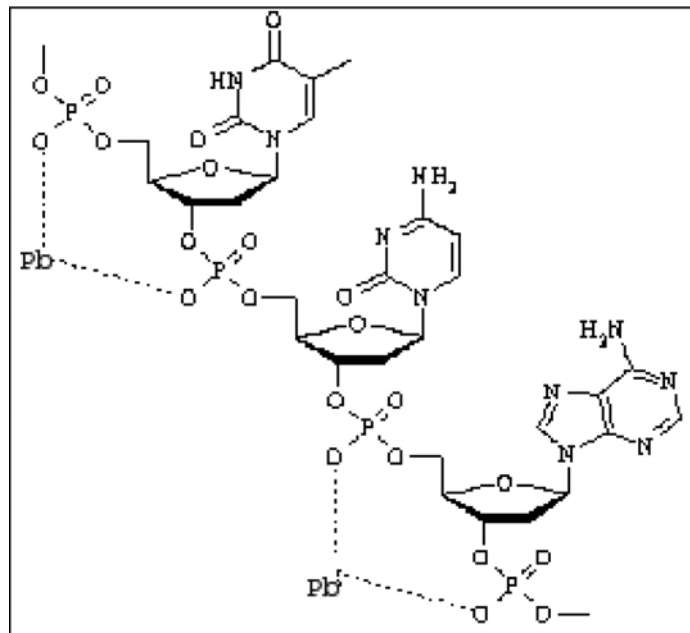


Figura 9. Unión de Plomo al grupo fosfato

La preferencia por los grupos fosfatos del DNA de los anillos aminos de las bases se ha establecido de la siguiente manera como Mg (II) > Co (II) > Ni (II) > Mn (II) > Zn (II) > Cd (II) > Cu (II) (Bertini et al., 1994). Cropeck (2002) ha señalado una región específica sobre el DNA como DNA catalítico el cuál tiene una alta selectividad hacia el plomo y puede ser reactiva sólo a plomo.

La disposición del plomo en eritrocitos y tejidos blandos será responsable de los efectos del metal. La vida media de plomo difiere en cada uno de los tejidos, siendo de 25 a 40 días en los eritrocitos, 40 días en tejidos blando, y hasta 28 años en los huesos. (Barry, 1981; Wittmers et al., 1988). El plomo es una hemo-tóxina y puede impedir la producción de células rojas bloqueando la síntesis de los grupos hemo. El plomo se va a distribuir de acuerdo a un modelo farmacocinético de tres compartimentos. La sangre y los tejidos blandos representan los sitios activos y los huesos el sitio de almacenamiento. La mayor parte de plomo se une a la hemoglobina en los eritrocitos en una concentración de 16 veces más que en el plasma (Onalaja y Claudio, 2000; Winder y Bonin, 1993).

Los posibles mecanismos para que se lleve a cabo la fragmentación de una cadena sencilla de DNA en tratamientos con plomo puede ser el incremento de la formación de radicales libres llevando a un daño en el DNA. Numerosos estudios han concluido que la formación de radicales libres de O₂ y H₂O₂ (generados por la reacción de Fenton) son capaces de dañar al DNA (Anderson, 1994). Bajo condiciones estándares, el ensayo Cometa, detecta la cantidad de células con fragmentación de DNA de cadena sencilla. Estas fragmentaciones son directamente

producidas por muchos agentes tóxicos ó como consecuencia de una incompleta reparación por escisión (Rydberg et al., 1978).

El cadmio y los compuestos de cadmio producidos por la industria y practicas agrícolas, han sido aceptados como carcinógenos de categoría I (humano) por la Agencia Internacional para Investigaciones en Cáncer (IARC), pero los mecanismos de las acciones del cadmio permanecen sin estar muy claros.

En estudios previos, con cultivo celulares de mamíferos, se han demostrado fragmentaciones de DNA de cadena sencilla y aberraciones cromosómicas inducidas por cadmio (T Ochi., et al 1983, T Ochi., et al 1984) y se sabe que el cadmio es mutagénico (T Ochi., et al 1983, T Ochi., et al 1984, T Helledey., et al 2000), clastogénico (Y Shiraishi., et al 1972), teratogénico y carcinogénico (N Degrave, 1981).

Como ya se mencionó anteriormente la exposición a arsénico con cáncer de piel, hígado, pulmón y vejiga. (NAS, 2001). Los mecanismos responsables para estos resultados, no han sido claramente explicados y parecen ser multifactoriales.

La metilación, ó la adición covalente de un grupo metilo de S-adenosilmetionina (SAM) a la citosina por la DNA metil-transefrasa (DNMTs), es una modificación epigenetica en el genoma de células de mamíferos (Klein y Costa, 1997), (Robertson y Jones, 2000). La metilación del DNA ocurre casi exclusivamente sobre los nucleótidos de C-G en secuencias repetidas así como en

regiones de codones e intrones. Por el contrario, la mayoría de los residuos de citosina en regiones ricas de C-G ó G+C se encuentran en la región 5' de muchos genes no metilados. Una metilación apropiada del DNA, juega un rol importante en la regulación transcripcional, la inactivación del cromosoma X, supresión de secuencias de DNA, reparación de bases de DNA mal apareadas y en el mantenimiento de la estabilidad del DNA (Robertson y Jones, 2000).

La hipometilación genómica del DNA se piensa constituye un evento previo en algunos tipos de cáncer y es comúnmente visto en tumores y transformado en las células donde la hipometilación puede inducir inestabilidad cromosómica (Cerdeira y Weitzman, 1997) (Poirier., 1994).

Las exposiciones ambientales como el cigarrillo, pesticidas, radiaciones y cadmio (Dolinoy et al., 2007) (Russo et al., 2004) y otros factores tales como deficiencia de los folatos (Davis, 2004) (Shellmut et al., 2004) y la edad ((Richardson, 2003) (Suzuki et al., 2006), están asociados con la metilación alterada del DNA. Los cultivos celulares en estudios animales sugieren que la exposición a arsénico inducen hipometilación genómica del DNA (Chen et al., 2004) (Zhao et al., 1997). El arsénico, altera los patrones de metilación de la citosina de las regiones promotoras del gen p53 supresor de tumores en células pulmonares de humanos (Chanda et al., 2006) (Mass y Wang, 1997) (Wainfan et al., 1989).

6.- MATERIALES Y METODOS

6.1 Reactivos

Las sustancias utilizadas en las diferentes técnicas en este trabajo fueron obtenidas en varias casas comerciales dedicadas a la venta de productos químicos. DNase I, solución de BSA, glucosa, cloruro de sodio, cloruro de potasio, fosfato de sodio bibásico, dipotasio hidrogenofosfato, cloruro de magnesio y cloruro de cadmio (buffer de fosfatos) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. Tripsina pura e inhibidor de tripsina en Worthington Biochemical Corporation (EUA) y el NDA en Fluka. Para el ensayo cometa la agarosa, Tris base; Triton X-100, dimethyl sulfoxide (DMSO), se obtuvo de GIBCO-BRL (Life Technologies), y el hidróxido de sodio y el EDTA fue adquirido en Sigma-Aldrich. El Acetato de plomo, Cloruro de cadmio y Trióxido de arsénico se adquirieron de J.B. Baker. Las soluciones que se podían preparar con anticipación y almacenadas ya sea en refrigeración, congelación o a temperatura ambiente se prepararon con aguas destilada.

6.2 Animales

Una muestra de 27 ratas jóvenes adultas, con un peso de 280-300 g fueron obtenidas del Laboratorio Experimental de Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad Juárez del Estado de Durango, (figura 10). Las ratas fueron puestas en el bioterio en cajas separadas con un ciclo de 12 hrs luz/obscuridad y bajo sistemas de temperatura controlada ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$). Los animales fueron puestos en cajas de plástico y tuvieron acceso en forma libre a dieta estándar para roedores el consumo de agua fue ad libitum. Los animales se sometieron a un periodo de aclimatación por 7 días antes de iniciar el tratamiento con los metales. Cada grupo consistió de tres ratas. Este trabajo fue conducido de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (SAGARPA).



Figura 10. Ratas cepa Wistar, utilizadas en el estudio

6.3 Diseño del estudio

Las 27 ratas macho estudiadas pertenecieron a la raza Wistar con una edad de 60 días. La edad de los animales fue seleccionada de acuerdo a los eventos de maduración en el ciclo reproductivo de la rata. En la rata, el período prepuberal inicia ~40–52 días de edad. Para cada experimento, nueve ratas fueron tratadas durante 90 días y fueron clasificadas en tres periodos de tiempo (1, 7 y 13 semanas). La selección de la dosis de los metales así como el tiempo de exposición, fueron basados en estudios previos en donde se había trabajado con este modelo animal

investigando daño en otros órganos y tejidos debido a plomo, cadmio y arsénico. En el caso de plomo (Sokol et al., 1985; Murthy et al., 1991; Jadhay., et al; 2007) para cadmio (Fatma et al., 2004; Jadhay et al., 2007) y para arsénico (Jadhay et al., 2007; Murthy et al., 1991; Lou et al., 2009). Cada experimento fue diseñado de la siguiente manera:

- I. Los tres grupos se dividieron así: tres ratas con agua desionizada (grupo control: Pb0), tres ratas con 250 mg/l (Pb1), y tres ratas con 500 mg/l (Pb2) acetato
- II. Tres ratas controles (Cd0), tres ratas con 25 mg/l (Cd1) y tres ratas con 50 mg/l (Cd2) cloruro de cadmio.
- III. Tres ratas controles (As0), tres ratas con 50 mg/l (As1) y tres ratas con 100 mg/l (As2) trióxido de arsénico.

Para plomo y cadmio la muestra de sangre fue obtenida mediante una punción cardiaca (figura 11) y para arsénico se recolecto orina de 24 hrs. (figura 12). Posteriormente, los animales fueron sacrificados por decapitación. Los espermatozoides en paquiteno de los testículos de las ratas fueron purificados mediante una digestión con tripsina seguida de una elutriación. Después de establecer la pureza y viabilidad de las células, el daño en el DNA del espermatozoides fue medido utilizando el ensayo cometa.



Figura 11. Punción Cardíaca



Figura 12. Cajas metabólicas para recolección de orina de 24 hrs.

6.4 Elutriación

La elutriación es el método de elección para la separación de células testiculares de acuerdo a la velocidad de sedimentación celular. El rotor para elutriación (modelo JE-6, Instrumentos Beckman, palo alto California) es impulsado por la centrífuga J21-B de Beckman sobre la cual el rango de velocidad abarca de 0 a 6000 rpm para permitir ajustes finos. El equipo del sistema se esquematiza en la (figura 13 y 14). Las células son transportadas por la bomba peristáltica. La cámara del buffer, la jeringa por donde se inyecta la muestra, la bomba y la tubería accesoria del sistema son mantenidas en una cámara refrigerada a 4 ± 1 °C. La regulación de la temperatura del buffer es importante para que se lleve a cabo el proceso de separación, ya que la viscosidad celular varía con la temperatura, a mayor temperatura mayor viscosidad celular y por lo tanto mayor dificultad en la separación

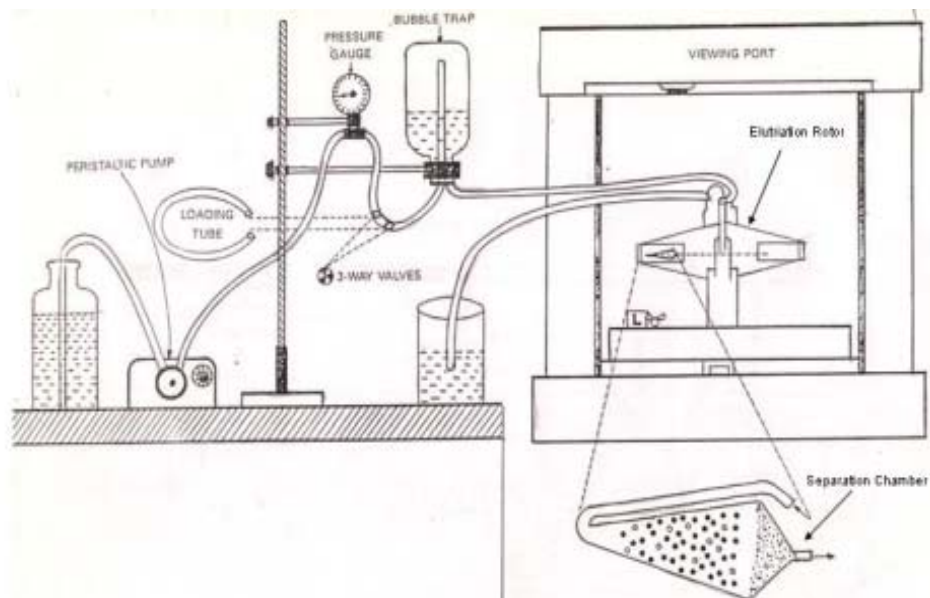


Figura 13. Esquema del equipo de elutriación.



Figura 14. Equipo de Elutriación, Departamento Biología de la Reproducción del Centro de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina UAC, Unidad Torreón.

El rotor de elutriación y la tubería asociada son los primeros que se llenan con el buffer. Se emplea PBS con adición de BSA al 0.5% para preservar la integridad de las células y reducir la adhesión celular. Cuando más de 3×10^8 células son separadas en una corrida, 5 mM de NDA son incluidos al buffer. La suspensión celular se prepara con el método de tripsinización y es filtrada a través de una malla de nylon de $25\mu\text{m}$ antes de ser sometida a la elutriación. Después de que se enciende la bomba, la suspensión celular se introduce al rotor a través de una llave de 3 vías. Cuando las células entren a la cámara de elutriación, la colección de la primera fracción comienza. Cuando la suspensión celular se encuentra dentro del rotor se cierra la llave de tres vías para evitar el regreso de la muestra. El rango de flujo y la velocidad del rotor se pueden ajustar para incrementar la sedimentación y cuando eso

se realice se obtendrá la segunda fracción, y así se continua hasta que la elutriación de las siguientes clases de células de la cámara sea completada. Estos pasos son repetidos según las fracciones que se deseen obtener. Entonces las células sobrantes son lavadas de la cámara con un rango de flujo alto hasta el momento en que se detenga el rotor.

La elutriación es el método de elección para la separación de células de acuerdo a la velocidad de sedimentación. Con la elutriación, la separación celular se lleva a cabo en un tiempo más corto que con otros métodos, con volúmenes muy grandes de células se pueden colectar las células que se deseen obtener, y se consume poca cantidad de BSA. El acortamiento en el tiempo de obtención nos ayuda cuando se necesita realizar otro paso de purificación o si se necesita realizar extracciones de material fresco. Con la elutriación se pueden obtener espermatozoides en el paquiteno y espermátides redondas con alta pureza. La única desventaja que tiene esta técnica es el alto costo del equipo.

6.4.1 Principios de separación celular

Los principios de separación son basados en la ley de Stokes de sedimentación lenta, la cual dice que el coeficiente de esta relación varía con la forma del objeto:

$$S = (p_c - p_o) V^{2/3} g/nf$$

En donde S es el rango de sedimentación de la partícula con respecto al fluido; p_c y p_o son las densidades de la partícula y del fluido respectivamente; V es el volumen de la partícula; g es la aceleración gravitacional debido a la tierra o a la centrifugación; n es la viscosidad del fluido; f es el coeficiente friccional el cual depende el tamaño de la partícula y equivale a 11.7 para una esfera.

Cuando la densidad del fluido es menor que el de la partícula, la partícula continuará sedimentándose en la dirección del campo gravitacional. Si el fluido esta en reposo, la partícula se sedimentará hacia el fondo de la cámara. Sin embargo, cuando el flujo del fluido es equivalente pero opuesto a la sedimentación de la partícula, la partícula puede permanecer estacionaria. Este principio es la base de la elutriación. Un rango de gradiente de flujo se establece y la partícula se mueve a una posición donde el rango de flujo del fluido sea exactamente balanceado con el rango de sedimentación. Si el rango de sedimentación de la partícula es menor que el rango de flujo del fluido mínimo en la cámara, ésta puede ser llevada fuera de la cámara en una dirección centrípeta y ser colectada. La velocidad de sedimentación máxima, S (mm/hr/g), de las células elutriadas de la cámara pueden ser calculadas según las dimensiones de la cámara, los rangos de flujo del fluido (f , ml/min) y la velocidad del rotor, R (103 RPM):

$$S = 1.93 f/R^2$$

Las diferencias en la talla, antes que la densidad o el tamaño del objeto, es el mayor factor que influye en la separación de las diferentes clases de células testiculares por velocidad de sedimentación.

6.5 Preparación de la suspensión celular.

En cualquier método de separación celular, la preparación de la suspensión celular es un paso crítico y de gran importancia. En general es importante para maximizar el número de células intactas o viables, para dispersar el grupo de células y para minimizar la reagregación, (Meistrich, 1977).

Los espermatoцитos en paquitenio y las espermátides redondas fueron aisladas mediante una digestión con tripsina y purificadas mediante elutriación por el método descrito por (Meistrich et al., 1981). Los testículos obtenidos de las ratas fueron decapsulados y cortados en pequeñas piezas mediante un cortador electrónico en tres direcciones a 300 micrones. Los tejidos cortados fueron transferidos a un matraz de tripsinización conteniendo buffer de fosfatos/glucosa, tripsina (2.5%), DNasa (20 µg/ml) posteriormente se pusieron en baño maria con agitación a 32°C por 30 min. Se adicionó suero fetal de bovino al 10% como concentración final, las muestras se filtraron a través de una malla de acero de 80 micrones (pre-mojada) dentro de un tubo de plástico de 50 ml, se centrifugaron a 1500 rpm por 10 min. A temperatura ambiente, el sobrenadante se aspiró y el contenido de las células fue resuspendido en 20 ml de solución Y (2.5% STI, CD-25, 30% BSA, 100mM NDA en buffer de fosfatos) a temperatura ambiente. La acción de la tripsina fue detenida con en

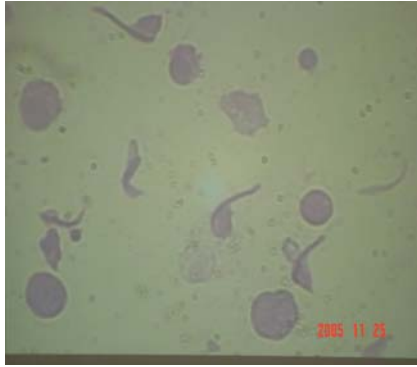
inhibidor de tripsina (2.5%) en presencia de DNasa1 y el suero de albumina bovina al (30%), las muestras fueron nuevamente filtradas através de una malla de nylon de 25 micrones (pre-mojada), y la muestra fue colocada dentro de rotor del elutriador (JE-6B) con una cámara estándar situada en la centrífuga de alta velocidad Beckman (J2-21). Se recolectaron cuatro fracciones a 2000 rpm con los siguientes flujos, 12.2, 18.2, 26.0 y 42.0 ml/min respectivamente. La fracción IV contenía los espermatozoides en paquiteno con una pureza de ~80% (tabla 1) y (figura 15).

TABLA I

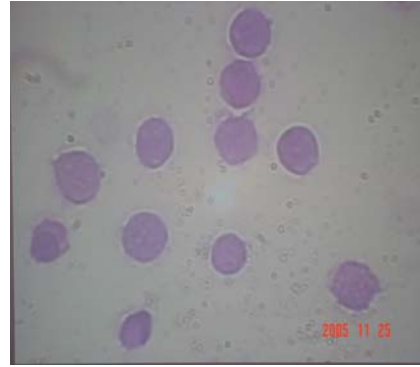
Parámetros de la purificación de la célula germinal utilizando el procedimiento de elutriación en testículos de ratas expuestas a acetato de plomo, cloruro de cadmio y trióxido de arsénico.

| Fracción | Parámetros | | | Tipo de célula |
|----------|----------------|-------|--------------|--------------------------|
| | Flujo (ml/min) | RPM | Volumen (ml) | |
| I | 12.2 | 2,000 | 150 | Espermatozoides |
| II | 18.6 | 2,000 | 90 | Células redondas |
| III | 26.0 | 2,000 | 150 | Células redondas |
| IV | 42.0 | 2,000 | 90 | Espermatozocito primario |

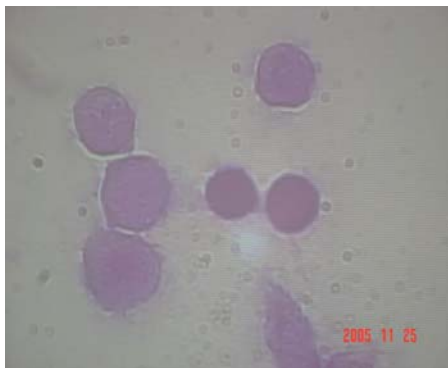
RPM: Revoluciones por minuto.



Fracción I



Fracción II



Fracción III



Fracción IV

Espermatocito primario

Figura 15. Diferentes estadios de células obtenidos en el proceso de elutriación

6.6 Ensayo Cometa

Un número de técnicas para detectar daño en el DNA, como opuestas a los efectos biológicos (ejm. Micronúcleos, mutaciones, aberraciones de la estructura de cromosomas) que resultan de un daño al DNA, han sido utilizadas para identificar sustancias con actividad genotóxica. En 1988, Sing, introdujo una técnica de microgel que utilizaba electroforesis bajo condiciones alcalinas ($\text{pH} > 13$)

condiciones para detectar daño en el DNA en una célula. Esta versión del ensayo ofrece una gran sensibilidad para identificar agentes genotóxico.

Una vez que se han obtenido las células, se suspenden en agarosa de bajo punto de fusión y se colocan en un porta objetos pre-cubierto con una capa de agarosa al 0.75%. Se utiliza un cubre objeto para extender la capa de agarosa, y el gel se introdujo en el refrigerador por 10 min. para que el gel se solidificara. Posteriormente se retira el cubre objeto cuidadosamente, y otra capa de agarosa de bajo punto de fusión se adhiere y se repite el procedimiento. Después de que la agarosa ha solidificado, las laminillas fueron puesta por 1 hr. en solución de lisis. Al finalizar el período de lisis, las laminillas fueron incubadas en bufer alcalino (pH >13.0) antes de la electroforesis para producir la expresión de una simple cadena de DNA. La solución alcalina desarrollada por (Sing et al., 1988) consiste de 1 mM de EDTA y 300 mM de hidróxido de sodio. El buffer alcalino utilizado durante la electroforesis tenía un pH >13.0 Las condiciones para la electroforesis desarrolladas por (Sing et al., 1988) fueron de 25 V y 300 mA, por 20 min. en la oscuridad a 5°C, ya que el uso de baja temperatura se piensa provee un incremento en la reproducibilidad. Después de la electroforesis, la alcalinidad del gel fue neutralizado sumergiendo las laminillas en buffer de neutralización (Trizma a pH 7.5) tres veces por 5 min. cada vez. Después de la neutralización, las laminillas fueron teñidas con Bromuro de Etidio y los cometas resultantes fueron contados utilizando un Microscopio de Fluorescencia Olympus IX70 con un objetivo de 40X y un filtro de excitación de 340 nm. 100 imágenes de los nucleos fueron capturados. Las imágenes fueron analizadas empleando un software para análisis de cometas

Kinetic 5.5 el cuál ha sido diseñado exclusivamente para este tipo de imágenes. Cuatro parámetros fueron evaluados: cabeza del DNA (%); cola del DNA (%); longitud de la cola (μm) y de inicio de la cola del COMETA (μm).

6.7 Espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito, corrector de fondo, muestreador automático, modificador de matriz, plataforma de L'vov.

6.7.1 Mediciones de Plomo y Cadmio en Sangre

Método para la determinación de plomo y cadmio en sangre por espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito, corrector de fondo y muestreador automático, usando modificador de matriz y plataforma de L'vov. Este método es adecuado para evaluar el plomo y cadmio en sangre que tengan concentraciones de este metal hasta 80 g/dl. Sin embargo, pueden determinarse niveles mayores de plomo cuando se aplican diluciones a la muestra original. El principio del método es el siguiente: A partir de muestras de sangre y estándares de concentración conocida, se obtienen átomos de plomo en estado elemental; se hace pasar a través de éstos un haz de luz de 283.3 nm y se mide la cantidad de luz absorbida, que es proporcional al número de átomos presentes; para ello, se acondicionan las muestras de sangre y los estándares con modificador de matriz, el cual es el reactivo químico que se adiciona a las muestras y a los estándares para que se incremente la volatilidad de la matriz y estabilice al analito de interés, transformándolo en un compuesto definido de propiedades conocidas. Las muestras

se colocan en forma individual y automatizada en una plataforma de L'vov de temperatura estable, instalada en un tubo de grafito pirolítico. Posteriormente se someten a un tratamiento térmico inducido por resistencia eléctrica y se hace pasar a través de la nube atómica obtenida, un haz de luz generado por lámparas específicas de cátodo hueco o de descarga sin electrodo. Se obtiene la respuesta instrumental de absorbancia integrada, usando un corrector de fondo y se compara la absorbancia integrada de muestras y estándares para obtener la concentración de plomo en la sangre estudiada.

Las muestras fueron colectadas por punción cardiaca. 2 ml. de sangre fueron obtenidos de cada rata utilizando tubos vacutainer libres de plomo. Los tubos fueron almacenados bajo refrigeración hasta su análisis. Los análisis de plomo y cadmio en sangre fueron realizados en el Departamento de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, empleando un Espectrofotómetro de Absorción Atómica con Horno de Grafito Zeeman con un límite de detección de 2µg/dl para plomo y 0.3 µg/dl para cadmio. Los análisis fueron llevados a cabo bajo la Norma Oficial Mexicana de 1994 (NOM-084-STPS).

6.7.2 Mediciones de Arsénico en Orina.

El arsénico fue medido en orina ya que la vida media de arsénico en sangre es muy corta (10 hrs.) y sus niveles en sangre son solamente útiles durante algunos días en exposiciones agudas, pero no son útiles para exposiciones crónicas (Goyer, 1996).

Las ratas fueron puestas en cajas metabólicas para la recolección de orina de 24 hrs. El trióxido de arsénico fue cuantificado mediante un espectrofotómetro de fluorescencia atómica con generador de hidruros (Zeeman) con un límite de detección de 2 µg/dl. Estos exámenes fueron realizados en el Departamento de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

6.8 Análisis estadístico

Los datos fueron capturados en una base de datos para el análisis estadístico, el cuál fue conducido en tres etapas. La primera etapa consistió en un análisis descriptivo (media y desviación estándar [SD] del peso corporal, ingesta de agua, porcentaje de daño en el DNA (cola del DNA), niveles plomo en sangre, cadmio en sangre y arsénico en orina. Posteriormente se realizó una ANOVA de una vía y la prueba de Tukey para comparaciones múltiples en inter poblaciones para detectar una posible diferencia para el daño al DNA, y niveles de plomo en sangre, cadmio en sangre y arsénico en orina. Finalmente, para determinar la relación entre el daño del DNA y cada uno de los metales, se llevó a cabo un análisis de correlación de Pearson. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como nivel de significancia.

7.- RESULTADOS

7.1 Peso corporal e Ingesta de Agua

Los niveles de exposición no afectaron significativamente el peso corporal comparado con los controles al momento de sacrificarlos (Tabla 2). La ingesta de agua tampoco estuvo influenciada por estos niveles, excepto en el tratamiento con Plomo, en el cuál las ratas expuestas a menor concentración bebieron mas agua (30.0 ml) que las expuestas a mayor concentración (27.0 ml), debido probablemente a un mal sabor del agua causada por las concentraciones altas a plomo, como se reportó en un estudio llevado a cabo por Sokol et al., 2002. (tabla 2).

TABLA II

Peso corporal e ingesta de agua por semana en tres grupos de ratas usando acetato de plomo, cloruro de cadmio y trióxido de arsénico.

| Metal | Semana | Grupo | Numero | Peso Corporal (gr) Mean ± SD | Ingesta de Agua (ml) Mean ± SD |
|-------|--------|-------|--------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Pb | 1 | L0 | 3 | 289.83 ± 8.27 | 237.30 ± 64.95 |
| | | L1 | 3 | 278.63 ± 8.12 | 209.16 ± 30.02 |
| | | L2 | 3 | 270.90 ± 6.48 | 193.33 ± 27.53 |
| | 7 | L0 | 3 | 378.03 ± 13.00 | 228.13 ± 14.43 |
| | | L1 | 3 | 396.83 ± 36.20 | 203.73 ± 24.88 |
| | | L2 | 3 | 423.86 ± 11.63 | 185.53 ± 15.02 |
| | 13 | L0 | 3 | 430.36 ± 1.25 | 183.33 ± 14.43* |
| | | L1 | 3 | 434.66 ± 59.91 | 118.00 ± 12.12 |
| | | L2 | 3 | 479.46 ± 13.68 | 174.83 ± 22.96 |
| Cd | 1 | C0 | 3 | 254.45 ± 7.56 | 317.10 ± 16.82* |
| | | C1 | 3 | 293.00 ± 9.53 | 251.90 ± 33.72 |
| | | C2 | 3 | 276.33 ± 18.58 | 198.03 ± 19.95 |
| | 7 | C0 | 3 | 294.55 ± 11.80 | 249.90 ± 3.55* |
| | | C1 | 3 | 326.60 ± 16.11 | 207.16 ± 11.80 |
| | | C2 | 3 | 320.50 ± 6.45 | 178.20 ± 20.31 |
| | 13 | C0 | 3 | 333.90 ± 9.33* | 300.00 ± 4.00* |
| | | C1 | 3 | 356.03 ± 10.54 | 252.73 ± 58.73 |
| | | C2 | 3 | 357.40 ± 3.21 | 176.33 ± 2.30 |
| As | 1 | A0 | 3 | 269.73 ± 14.50* | 311.53 ± 2.88* |
| | | A1 | 3 | 297.66 ± 17.50 | 207.06 ± 67.99 |
| | | A2 | 3 | 323.33 ± 6.50 | 192.96 ± 40.29 |
| | 7 | A0 | 3 | 391.13 ± 21.29 | 341.33 ± 62.90* |
| | | A1 | 3 | 416.10 ± 27.28 | 221.53 ± 44.98 |
| | | A2 | 3 | 435.36 ± 20.29 | 172.66 ± 48.95 |
| | 13 | A0 | 3 | 441.03 ± 25.32 | 292.86 ± 115.50 |
| | | A1 | 3 | 443.20 ± 26.45 | 155.33 ± 17.76 |
| | | A2 | 3 | 434.46 ± 43.01 | 154.66 ± 27.30 |

L0.- 0, L1.- 250, L2.- 500. C0.- 0, C1.- 25, C2.- 50 A0.- 0, A1.- 50, A2.- 100.

*($P < 0.05$). SD = Desviación Estandar.

7.2 Niveles de Plomo y Cadmio en sangre y Arsénico en orina.

En el caso de plomo, todos los animales control tuvieron una media muy consistente en los niveles de sangre $< 5 \mu\text{g/dl}$. Todos los animales expuestos tuvieron niveles de sangre mayores que las controles [(pb1) $19.54 \mu\text{g/dl}$ y (pb2) $20.90 \mu\text{g/dl}$]. En este caso, ninguno de los grupos expuestos presentó una diferencia significativa, probablemente debido a que el grupo (pb2) bebió menos agua que el grupo (pb1). En el grupo de cadmio, todos los controles tuvieron una media de 5

$\mu\text{g/dl}$ en las concentraciones de sangre, (Cd1) 14.3 $\mu\text{g/dl}$ y (Cd2) 32.0 $\mu\text{g/dl}$. En el grupo control de arsénico la media en las concentraciones urinarias fue de 487.33 $\mu\text{g/dl}$, con (As1) 21,456 $\mu\text{g/dl}$ y (As2) 87,447 $\mu\text{g/dl}$. Estos resultados revelan un marcado incremento en los niveles de los diferentes metales en las ratas expuestas por 13 semanas.

7.3 Daño en el DNA

En el ensayo cometa un incremento en la fragmentación de las cadenas del DNA llevó a una migración del DNA fuera del núcleo produciéndose una cola de cometa. La extensión del daño dependiendo de la dosis se muestra en la tabla 3. Para el grupo control (Pb0), el porcentaje de daño fue de 20.50%, para (Pb1) 58.53% y (Pb2) 61.13%. En el caso de Cadmio, grupo control (Cd0), el porcentaje fue de 23.0% (Cd1) 42.33% y (Cd2) 69.66%. Para Arsénico, el grupo control (As0) fue de 19.33%, (As1) fue de 48.0% y (As2) 890.0%. La media de células mostrando daño en el DNA mediante el ensayo cometa en los tres grupos controles fue significativamente más bajo que en los grupos expuestos a los diferentes metales (figuras 16 y 17).

TABLA III

Daño en DNA, niveles en sangre de plomo, cadmio, y concentración de arsénico en orina en tres grupos de utilizando acetato de plomo, cloruro de cadmio y trióxido de arsénico durante 13 semanas de exposición.

| Metal | Semana | Grupo | Numero | Daño en DNA (%) Mean ± SD | Niveles (µg/dl) Mean ± SD |
|-------|--------|-------|--------|---------------------------------|------------------------------|
| Pb | 13 | L0 | 3 | 20.50 ± 3.50* | 2.00 ± 0.76* |
| | | L1 | 3 | 58.53 ± 7.42 | 19.54 ± 4.18 |
| | | L2 | 3 | 61.13 ± 3.75 | 21.90 ± 7.27 |
| Cd | 13 | C0 | 3 | 23.00 ± 4.24* | 5.00 ± 1.00* |
| | | C1 | 3 | 42.33 ± 2.51 | 14.36 ± 3.50 |
| | | C2 | 3 | 69.66 ± 7.76 | 32.00 ± 10.53 |
| As | 13 | A0 | 3 | 19.33 ± 8.50* | 487.33 ± 325.06* |
| | | A1 | 3 | 48.00 ± 6.08 | 21,456.67 ± 2,551.73 |
| | | A2 | 3 | 80.00 ± 7.81 | 87,447.00 ± 8,539.45 |

L0.- 0, L1.- 250, L2.- 500. *: $\mu_{L0} \neq \mu_{L1} = \mu_{L2}$

C0.- 0, C1.- 25, C2.- 50. *: $\mu_{C0} \neq \mu_{C1} = \mu_{C2}$

A0.- 0, A1.- 50, A2.- 100. *: $\mu_{A0} \neq \mu_{A1} = \mu_{A2}$

*($P < 0.00001$). SD = Desviación estandar.

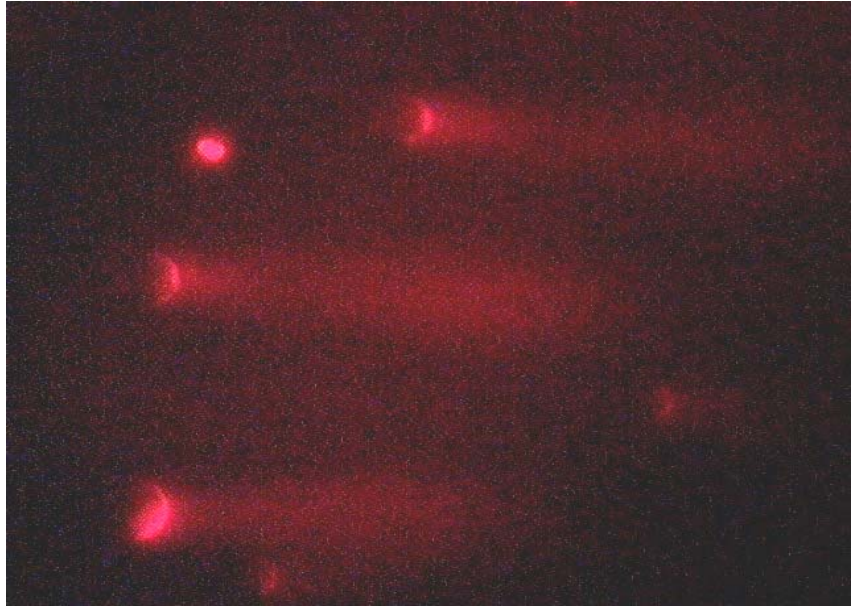


Figura 16. Espermatocito primario con daño en su DNA

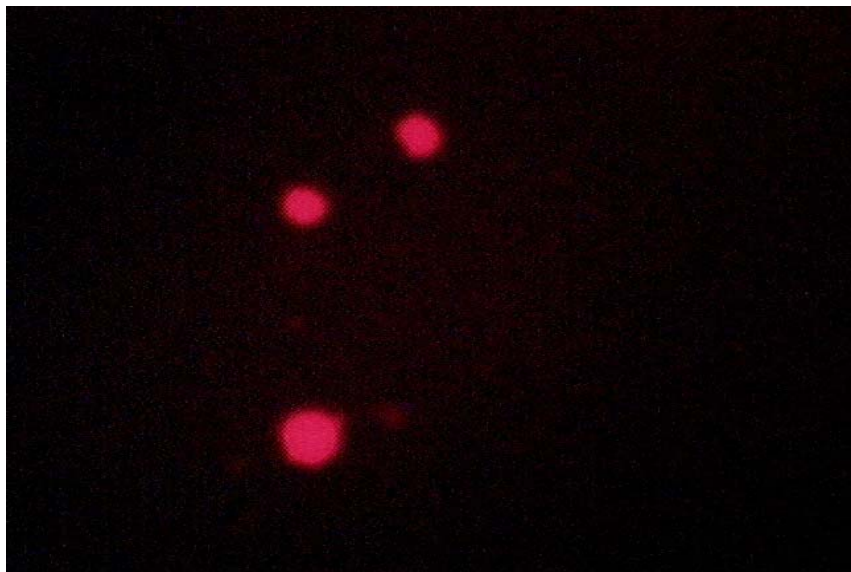


Figura 17. Espermatocito primario sin daño en su DNA

8.- DISCUSIÓN

La contaminación por metales pesados en la Comarca Lagunera, es especialmente problemática para niños y adultos, quienes ingieren hasta 90 mg. De polvo por día (Agencia de Protección al Medio Ambiente [EPA] 1997; Calabrasc et al., 1989). El promedio de ingesta de Arsénico en esta área es de 57.6 ppb, en la forma de (As+5) más del mínimo permitido por la Organización Mundial de la Salud (WHO 1984) (Coronado-González et al., 2007). Estudios previos en la exposición a metales pesados en México fueron enfocados principalmente en el plomo de la gasolina y en las vasijas de cerámica. Otros contaminantes ambientales, tales como el cadmio y el arsénico han sido ignorados. Por otro lado, existe una poca investigación de la contaminación industrial proveniente de las refinerías. En otros países, plomo, cadmio y arsénico, han sido bien establecidos como problemas de salud para las personas que viven en comunidades alrededor de las refinerías y (Baghurst et al., 1992; Roels et al., 1980).

Con el conocimiento de que la contaminación por metales pesados es alta y la susceptibilidad de la espermatogénesis puede ser dañada principalmente en el DNA, el presente estudio evaluó los efectos de plomo, cadmio y arsénico a nivel de la espermatogénesis en ratas expuestas a altas concentraciones de estos tres metales en el agua de beber. La importancia de este estudio, es que nos permite evaluar el efecto sobre las células más viables a ser dañadas en la espermatogénesis que es el

espermatozoides primarios y lo cual, nunca ha sido reportado en la literatura. Es importante mencionar que las concentraciones seleccionadas para cada metal fueron calculadas de acuerdo a las dosis citadas por WHO que se conocen son elevadas en plasma en humanos.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que la exposición a Pb, Cd y As ocasionan un daño en el espermatozoides primario en la rata. Sin embargo, en el caso de Pb, las ratas expuestas a menor concentración bebieron más agua (30.0 ml) que las expuestas a una mayor concentración (27.0 ml), debido probablemente a un desagradable sabor del agua causado por la concentración alta de Pb, en el cual las ratas expuestas a Pb bebieron menos agua que sus respectivos controles, y esto pudo dar como resultado que el porcentaje de daño y los niveles de Pb en sangre no presentaran una diferencia significativa en los dos grupos expuestos en la semana 13 ($p < 0.05$). Existen otras dos posibles explicaciones: primero, los niveles de plomo en sangre están normalmente relacionados con la exposición aguda. Para una exposición crónica, los niveles de plomo en huesos es más relevante, y segundo, existe la posibilidad de que la absorción de plomo en el tracto gastrointestinal fuera limitado; así, los niveles pudieran no estar asociados a la exposición. Con respecto a los otros metales, los grupos expuestos a Cd y As mostraron el mismo comportamiento en el consumo de agua. Ellos presentaron daño y niveles de sangre y orina con una significativa correlación a la semana 13 ($p < 0.05$), y esta ingesta provocó una toxicidad que soporta la hipótesis de daño en la estructura del DNA del espermatozoides primario de la rata debido a la exposición crónica a Pb, Cd y As. Estudios previos empleando este modelo animal y plomo han demostrado un daño a

nivel testicular y una disminución en los volúmenes de la célula germinal en el epitelio seminífero como una parte dinámica del testículo, en donde la división mitótica y meiótica ocurre (Massanyi et al., 2007). La administración del plomo es reflejada en los niveles de fertilidad. En estudios sobre cinética celular, se han detectado disminuciones significativas en varias poblaciones como, espermátides y espermatozoides maduros (Batra et al., 2004). El cadmio es uno de los contaminantes ambientales que puede afectar a varios tejidos y órganos incluyendo los testículos. El efecto nocivo del cadmio sobre los testículos se sabe que es en la degeneración de la célula germinal y defecto en la esteroidogénesis testicular (Sadik, 2008). Existen reportes de un incremento en la acumulación de cadmio en el hipotálamo, pituitaria y testículos y una disminución de los niveles plasmáticos de hormona del folículo estimulante (FHS) en ratas, sugiriendo un posible efecto del cadmio en el eje hipotalámico-pituitario-testicular (Lafuente et al., 2000). Los trabajos de (Jana et al., 2006) reportaron la manera en la cuál el arsénico puede alterar las funciones reproductivas mediante una disminución de la masa testicular, inhibiendo la androgénesis testicular y disminuyendo las concentraciones de testosterona y gonadotrofinas además de aumentar la actividad adrenal. (Sanghamitra et al., 2008) reportó los efectos tóxicos del arsénico en testículos de ratones y demostró que los ratones tratados con arsénico presentaron una reducción gradual dosis-dependiente en el diámetro de los túbulos seminíferos y varias poblaciones de células gametogénicas, por ejemplo, espermátocitos secundarios, espermátocitos en paquíteno y espermátides en estadio 7 con la excepción de la espermatogonia. Estos hallazgos confirman que los metales pueden inducir una toxicidad testicular. Los resultados del presente estudio demostraron que el plomo,

cadmio y arsénico son directamente tóxicos al espermatocito primario produciendo un daño en el DNA. Mantener la integridad del DNA del genoma masculino es de suma importancia en la reproducción. Es bien sabido que las lesiones en el DNA de la célula germinal pueden llevar a problemas de infertilidad así como resultados anormales tales como, abortos espontáneos, enfermedades genéticas e incremento de la incidencia de cáncer (Spano et al., 2000, Brinkworth et al., 2000). Las anomalías en el DNA en el espermatozoide están bien documentadas (Sakkas et al., 2002; Spano et al., 1998). El origen del daño en el DNA y los mecanismos de la fragmentación en el espermatozoide maduro, permanecen aún sin claridad. La fragmentación del DNA puede tomar lugar directamente en el espermatozoide maduro así como puede ser una consecuencia de exposiciones endógenas (especies de oxígeno reactivos [ROS] ó exógenas (químicos o radiaciones) mutágenos ó a través de alteraciones en el proceso de creación y ligación de nicks durante la espermiogénesis (Ahmadi et al., 1999, Sakkas et al., 2002, Álvarez et al., 2002, Aitken et al., 1998). Estudios en animales, analizando la integridad del DNA en el espermatozoide después de radiaciones X, mostraron que los espermatozoides con lesiones en el DNA podrían también haber derivado de algún daño de la célula germinal en la fase pre-miética (Haines et al., 2002, Sailer et al., 1995).

9.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados de este trabajo de investigación nos llevan a creer que la fragmentación del DNA presente en los espermatozoides puede provenir de un proceso de fragmentación en el DNA ocurrido en el espermatocito primario después de la exposición a estos metales tóxicos. Basándonos en los trabajos de Shelby y colaboradores, ellos mencionaron que el daño inducido en el material genético de la célula germinal en desarrollo puede no afectar la habilidad del espermatozoide resultante para fertilizar un ovulo y este daño puede ser potencialmente transmitido a generaciones sucesivas.

En el futuro, será de mucha importancia que estos hallazgos sean validados por otros investigadores y será muy interesante examinar la histología de testículos de ratas después de una exposición crónica a estos metales/metaloides con el objetivo de proveer alguna evidencia si el daño al DNA fue el primero ó segundo efecto de otros efectos en el espermatocito y nos podrá también dar alguna idea del destino de estas células dañadas.

10. - BIBLIOGRAFIA

Ahmadi A, Ng SC (1999) Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. J Exp Zool. 284(6):696-704.

Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS. (1998) Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. Biol Reprod. 59(5):1037-1046.

Alfaro- Alfaro N., Prado-Aguilar C., López- Zermeño MC., García de Alba García J., Cabrera- rojas h., Angulo-Castellanos E., Pérez Molina JJ., Arce I. (1994). Malformaciones congénitas en 1975, 788 nacimientos consecutivos en cuatro hospitales de Guadalajara México. Perinatol Reprod Hum. 8: 91-100.

Alvarez JG, Sharma RK, Ollero M, Saleh RA, López MC, Thomas AJ Jr, Evenson DP, Agarwal A. (2002). Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. Fertil Steril. 78(2):319-329.

Anderson, D., Yu, T. W., Phillips, B. J., Schmezer, P. (1994). The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutat. Res.* 307:261–271.

Ashby J, Houthoff E, Kennedy SJ. (1997). The challenge posed by endocrine-disrupting chemicals. *Environ Health Perspect.* 105:164-169.

Atorino L, Di Miglio S, Farina B, Jones R, Quesada P. (2001). Rat germinal cells require PARP for repair of DNA damage induced by γ -irradiation and H₂O₂. *Eur J. Cell Biol.* 80:222–229.

Bajpai M, Gupta G, Setty BS. (1998). Changes in carbohydrate metabolism of testicular germ cells during meiosis in the rat. *European Journal of endocrinology.* 138: 322-327.

Barbee Jr JY, Prince TS. (1999). Acute respiratory distress syndrome in a welder exposed to metal fumes. *South Med J.* 92: 510–512

Barrat C. L. R, Davies A.G, Bansal M.R. (1989). The effects of lead on the male rat reproductive system . *Andrología.* 21: 161-166.

Barry, PSI. (1981). Concentrations of lead in the tissues of children. *Br. J. Ind. Med.* 38:61–71.

Batra N, Nehru B, Bansal MP. (2004), Reproductive potential of male Portan rats exposed to various levels of lead with regard to zinc status. Br J Nutr. 91(3):387-391.

Bauchinger M. Schmid E. Einbrodt HJ. (1976). Chromosome aberrations in lymphocyte after occupational exposure to lead and cadmium. *Mutat Res.* 49:57-62.

Beckman G., Beckman L., Nordenson I. (1997). Chromosome aberrations in workers exposed to arsenic. *Environ Health Perspect.* 19: 145-146.

Berglund M, Elinder CG, Järup L. (2001). *Humans Exposure Assessment. An Introduction.* WHO/SDE/OEH/01.3.

Bernard A, Roels H, Buchet JP, Cardenas A, Lauwerys R. (1992). Cadmium and health: the Belgian experience. *IARC Scientific Publications.* 118: 15–33

Bertini, J., Gray, H. B., Lippard, S. J., Valentine, J. S. (1994). *Bioinorganic Chemistry.* Mill Valley, CA:University science books.

Brinkworth MH. (2002). Paternal transmission of genetic damage: findings in animals and humans. *Int J Androl.* 23:123–135.

Buamah PK, Rusell M, Bates G, Ward AM y Skillen AW. (1984). Maternal Zinc status: a determination of central nervous system malformation . Br J. Obset Gynecology. 91: 788-790.

Buchet JP, Lauwerys R, Roels H, Bernard A, Bruaux P, Claeys F, Ducoffre G, DePlaen P, Staessen J, Amery A, Lijnen P, Thijs L, Rondia D, Sartor F, Saint Remy A, Nick L. (1990). Renal effects of cadmium body burden of the general population. *Lancet* 336: 699–702

Burgdorf W., Kurvink K., Cervenka J. (1977). Elevated sister chromatide exchange rate in lymphocytes of subjets treated with arsenic. *Human genet.* 36: 69-72.

Canún S. S., Zafra G. (1983). Detección de malformaciones congénitas externas, incidencia en 3283 recién nacidos vivos consecutivos. *Biol. Med Hosp Inf Mex.* 41: 21-24.

Carlsen E. Giwercman. Keiding N. and Niels E. Skakkeback. (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ.* 305: 609-613.

Chanda S, Dasgupta UB, Guhamazumder D. (2006). DNA hypermethylation of promoter of gene p53 and p16 in arsenic-exposed people with and without malignancy. *Toxicol Sci.* 89:431–437.

Chen H, Li S, Liu J, Diwan BA, Barrett JC, Waalkes MP. (2004). Chronic inorganic arsenic exposure induces hepatic global and individual gene hypomethylation: implications for arsenic hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 25:1779–1786.

Chu, G. (1997). Double strand break repair. *J. Biol. Chem.* 272:24097-24100.

Clark, A.J. (1991). Rec. genes and homologous recombination proteins in *Scherichia coli*. *Biochimie* 73:523-532.

Cerda S, Weitzman SA. (1997). Influence of oxygen radical injury on DNA methylation. *Mutat Res* 386:141–152.

Clarkson TW, Nordberg GF, Sager PR. (1985). Reproductive and development toxicity of metals. *Scand J. Work Environ Health.* 11: 145-154.

Clermont Y, Harvey SC. (1965). Duration of the cycle of the seminiferous epithelia of normal, hypophy sectomized and hypophysectomized hormone treated albino rats. *Endocrinology.* 76: 80-89.

Clermont Y, Trott M. (1969). Duration of the cycle of the seminiferous epithelia um in the mouse and hamster determined by means of 3H-thymidine and radioautography. *Fertil Steril.* 20: 805-817.

Codrington AM, Hales BF, Robaire B. (2004). Spermio-genic germ cell phase-specific DNA damage following cyclophosphamide exposure. *J. Androl.* 25:354-362.

Cooper RL, and Kavlock RJ. (1997). Endocrine disruptors and reproductive development: a weight-of-evidence overview. *J. Endocrinol.* 152:159-166.

Cortez CR, Marin M. Samuel A. (1986). Epidemiología de las malformaciones congénitas externas. *Ginec Obstret Mex.* 48-49.

Counot, M; Hochereau- de Reviers, MT; and Ortavant, R. (1970). The testis (Johnson, A. D; Gomes, W. R and Vandermark, N.L. eds). VD1, pp 330-432, Academic Press, New York.

Cheek, AO and McLachlan JA. (1998). Environmental hormones and the male reproductive system. *J. Androl.* 19:5-10.

Chilvers DC, Peterson PJ. (1987). Global cycling of arsenic. In: Hutchinson TC, Meema KM (eds) *Lead, Mercury, Cadmium and Arsenic in the Environment*. Chichester: John Wiley & Sons. 279–303

Chowdhury A.R, Dewan A, Ghandhi D.N. (1984). Toxic effects of lead on the testes of rat. *Biomed Biochem Acta.* 43: 95-100.

Davis CD, Uthus EO. (2004). DNA methylation, cancer susceptibility, and nutrient interactions. *Exp Biol Med (Maywood)* 229:988 –995.

Del Razo LM, Arellano MA, Cebrián ME (1990). The oxidation states of arsenic in well-water from a chronic arsenic area of northern Mexico. *Environ Pollut.* 64(2):143-153.

Department of the Environment, Transport and the Regions. *Statistics Release 184 1999 UK Air Emissions Estimates* (28 March 2001).

Dolinoy DC, Weidman JR, Jirtle RL. (2007). Epigenetic gene regulation: linking early developmental environment to adult disease. *Reprod Toxicol* 86:169 –174.

Fawcett Don W. (1995). *Tratado de Histología*. Ed. McGraw- Hill Interamericana, México. 12ª edición. Pág. 836- 858.

Flanagan PR, McLellan JS, Haist J, Cherian MG, Chamberlain MJ, Valberg LS. (1978). Increased dietary cadmium absorption in mice and human subjects with iron deficiency. *Gastroenterology.* 74: 841–846.

França LR, Ogawa T, Avarbock MR, Brinster RL, Russell LD. (1998). Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biology of reproduction.* 59:1371-1377.

Friberg L. (1950). Health hazards in the manufacture of alkaline accumulators with special reference to chronic cadmium poisoning. *Acta Med Scand.* Suppl 240: 1–124

Friedberg, E., G. Walker, W. Siede. (1995). *DNA Repair and Mutagenesis*. ASM press.

Gasiorek K., Bauchinger M. (1981). Chromosome changes in lymphocyte after separate and combined treatment with divalent salts of lead cadmium and zinc. *Environ Mut.* 3: 513-518.

Haines GA, Hendry JH, Daniel CP, Morris ID. (2002). Germ cell and dose-dependent DNA damage measured by the comet assay in murine spermatozoa after testicular X-irradiation. *Biol Reprod.* 67:854-861.

Handel MA. (1998). *Meiosis and gametogenesis- current topics in developmental biology*. Vol. 37. New York, USA: Academic Press.

Hawley, R.S. (1988). Exchange and chromosomal segregation in eukaryotes. In: Kucherlapati R and Smith G, editors. *Genetic Recombination*. Washington, D.C., USA: American Society of Microbiology. pp. 497-527.

Heller CG; and Clermont Y. (1964). Kinetics of the germinal epithelium in man. *Recent Prog. Horm. Pes.* 20: 545-575.

Hellström L, Elinder CG, Dahlberg B, Lundberg M, Järup L, Persson B, Axelson O. (2001). Cadmium exposure and end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis.* 38: 1001–1008.

Hernández-Ochoa I, García-Vargas G, López-Carrillo L, Rubio-Andrade M, Morán-Martínez J, Cebrián ME, Quintanilla-Vega B. (2005). Low lead environmental exposure alters semen quality and Sperm Chromatin condensation in northern México. *Reprod Toxicol.* 20 (2): 221- 228.

Hossn E, Mokhtar G, El-Awady M, Ali I, Morsy M, Dawood A. (2001). Environmental exposure of the pediatric age groups in Cairo City and its suburbs to cadmium pollution. *Sci Total Environ.* 273: 135–146.

Hotz P, Buchet JP, Bernard A, Lison D, Lauwerys R. Renal effects of low-level environmental cadmium exposure: 5-year follow-up of a subcohort from the Cadmibel study. *Lancet* 1999; 354: 1508–1513.

IARC. (1993). Cadmium and cadmium compounds. In: *Beryllium, Cadmium, Mercury and Exposure in the Glass Manufacturing Industry*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 58. Lyon: International Agency for Research on Cancer. 119–237

Jana K, Jana S, Samanta PK. (2006). Effects of chronic exposure to sodium arsenite on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: possible an estrogenic mode of action. Reprod Biol Endocrinol. 4:9

Järup L, Persson B, Elinder C-G. (1995). Decreased glomerular filtration rate in cadmium exposed solderers. *Occup Environ Med*. 52: 818–822.

Järup L, Berglund M, Elinder CG, Nordberg G, Vahter M. (1998). Health effects of cadmium exposure—a review of the literature and a risk estimate. *Scand J Work Environ Health*. 24 (Suppl 1):1–51

Järup L, Hellstrom L, Alfven T, Carlsson MD, Grubb A, Persson B. (2000). Low level exposure to cadmium and early kidney damage: the OSCAR study. *Occup Environ Med*. 57: 668–672.

Klein CB, Costa M (1997). DNAmethylation and gene expression: introduction and overview. *Mutat Res* 386:103–105.

Kolodner, R. (1996). Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair. *Genes devel*. 10:1433-1442.

Kolonel LN. (1976). Association of cadmium with renal cancer. *Cancer*. 37: 1782–1787.

Kordas K, Canfield RL, López P, Rosado JL, Vargas GG, Cebrián ME, Rico JA, Ronquillo D, Stoltzfus RJ. (2006). Deficits in cognitive function and achievement in Mexican first-graders with low blood lead concentrations. *Environ Res.* 100 (3): 371- 386.

Kordas K, Lopez P, Rosado JL, García Vargas G, Alatorre Rico J, Ronquillo D, Cebrián ME, Stoltzfus RJ. (2004). Blood lead, anemia and short stature are independently associated with cognitive performance in Mexican school children. *J. Nutr.* 134 (2): 363- 371.

Krasovskii G.N Vasukovich L.Y, Chariev O. G. (1979). Experimental study of lead and aluminium following oral administration. *Environ Health Perspect.* 30:47-51.

Kutzman RS, Drew TR, Shiosuka RN. J. (1986). *Toxicol Environ Health.* 17. 175-189.

Lafuente A, Márquez N, Pérez-Lorenzo M, Pazo D, Esquifino AI. (2000). Pubertal and postpubertal cadmium exposure differentially affects the hypothalamic-pituitary-testicular axis function in the rat. *Food Chem Toxicol.* 38(10):913-923.

Leblond CP, Clermont Y. (1952). Spermogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchin sulfurous acid technique. *Am J Anat.* 90: 167-210.

Lewin B. (2001). Genes VII Ed. Marbán, España 2001 7ª edición. Pág. 441.

Lidsky TI, Schneider JS. (2003). Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates. *Brain*, 126: 5-19

Logdberg B. Berlin M and Schutz A. (1987). Effects of lead exposure on pregnancy outcome and the fetal brain of squirrel monkeys. *Scand J. Work Environ Health*, 13: 135-145.

Loule A. J; and Dixon, G. H. J.(1972). *Biol Chem*, 247: 5490-5497.

Mandel JS, McLaughlin JK, Schlehofer B, Mellempgaard A, Helmert U, Lindblad P, McCredie M, Adami HO. (1995). International renal-cell cancer study. IV. Occupation. *Int J Cancer*, 61: 601–605.

Mass MJ, Wang L. (1997). Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis. *Mutat Res*. 386:263–277.

Massanyi P, Lukac N, Makarevich AV, Chrenek P, Forgacs Z, Zakrzewski M, Stawarz R, Toman R, Lazor P, Flesarova S. (2007). Lead-induced alterations in rat kidneys and testes *in vivo*. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*. 42(5):671-676.

Masson HJ. (1990). Occupational cadmium exposure and testicular endocrine function. *Hum Exp Toxicol*, 9:91-94.

Meistrich M. L. (1977). Separation of spermatogenic cells and nuclei from rodent testes. *Methods in cell biology*, 25: 15-53.

Meistrich ML, Longtin J, Brock WA, Grimes SR, Mace ML. (1981). Purification of rat spermatogenic cells and preliminary biochemical analysis of these cells. *Biol Reprod*. 25:1065-1077.

Meistrich ML. (1986). Critical components of testicular function and sensitivity to disruption. *Biol. Reprod*, 34: 17-28.

National Academy of Sciences. (2001). Arsenic in drinking water.

Nayak BN, Ray M, and Persaud TV. (1989). Maternal and Fetal chromosomal aberrations in mice following prenatal exposure to subembryotoxic doses of lead nitrate. *Acta Anat*. 135;185-188.

Nayak BN, Ray M, Persaud TV and Nigli M. (1989). Embryotoxicity and *in vivo* cytogenetic changes following lead in mice. *Exp Pathol*, 36: 75-80.

N Degraeve. (1981). Carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects of cadmium. *Mutat Res* 86, 115-135.

Niebuhr E. Wulf H. C. (1984). Chapter 9: Genotoxic effects. In: Grandejean P, ed. *Biological effects of ornano-lead compounds*. Boca Raton FI: CRC Press, 117-124.

Nishijo M, Nakagawa H, Morikawa Y, Tabata M, Senma M, Miura K. (1995). Mortality of inhabitants in an area polluted by cadmium: 15 year follow up. *Occup Environ Med*, 52: 181–184.

Nordberg G, Jin T, Bernard A, Fierens S, Buchet JP, Ye T, Kong Q, Wang H. (2002). Low bone density and renal dysfunction following environmental cadmium exposure in China. *Ambio*, 6: 478–481.

Nordenson I., Beckman G, Beckman L. (1978). Occupational and environmental risk in and around a smelter in northern Sweden II. Chromosomal aberrations in workers exposed to arsenic. *Heredias*, 88;47-50.

Nordstrom S, Beckman L, Nordenson I. (1978). Occupational and environmental risk in and around a smelter in northern Sweden. III. Frequencies of spontaneous abortion among female employees and decreased birth weight in their offspring's. *Hereditas*, 90: 291-296.

Nordtrom S. Beckman L. Nordenson I. (1979). Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden VI. Congenital malformations. *Hereditas*, 90: 297-302.

NRC. (1991). *Human Exposure Assessment for Airborne Pollutants. Advances and Opportunities*. Washington, DC: National Research Council, National Academy Press.

Norma Oficial Mexicana, NOM-199-SSA1-2000, Salud ambiental para los niveles de plomo en sangre y acciones como criterios para proteger la salud de la población expuesta no ocupacionalmente.

Onalaja, A. O., Claudio, L. (2000). Genetic susceptibility to lead poisoning. *Environ. Health Perspect.* 108(1):23–28.

Pesch B, Haerting J, Ranft U, Klimpel A, Oelschlagel B, Schill W. (2000). Occupational risk factors for renal cell carcinoma: agent-specific results from a case-control study in Germany. MURC Study Group. Multicentre urothelial and renal cancer study. *Int J Epidemiol.* 29: 1014–1024.

Poirier LA. (1994). Methyl group deficiency in hepatocarcinogenesis. *Drug Metab Rev* 26:185–199.

Richardson B. (2003). Impact of aging on DNA methylation. *Aging Res Rev* 2:245–261.

Robertson KD, Jones PA. (2000). DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis* 21:461–467.

Roels HA, Buchet JP, Lauwerys RR, Bruaux P, Claeys-Thoreau F, Lafontaine A, Verduyn G. (1980). Exposure to lead by the oral route and the pulmonary routes of children living in the vicinity of a primary lead smelter. *Environ Res.* 22:81-94.

Rossmann G. (1981). Effects of Metals on Mutagenesis and DNA Repair. *Environmental Health Perspectives*, 40;189-195.

Rusell LD, Ettlín RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED. (1990). Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater; Cahe River Press.

Russo AL, Thiagalingam A, Pan H, (2005). Differential DNA hypermethylation of critical genes mediates the stage-specific tobacco smoke-induced neoplastic progression of lung cancer. *Clin Cancer.* 11:2466 –2470.

Rydberg, B., Johanson, K. J. (1978). Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In: Hanawalt, P. C., Friedberg, E. C., Fox, C. F., eds. *DNA Repair Mechanisms*. New York: Academic Press, pp. 465–468.

Saaranen M. Kantola M. Saarikoski S. (1989). Human seminal plasma. Comparison with fertility and smoking habits. *Andrología.* 21. 140-145.

Sadik NA. (2008). Effects of diallyl sulfide and zinc on testicular steroidogenesis in cadmium-treated male rats. *J Biochem Mol Toxicol.* 22(5):345-353.

Sanghamitra S, Hazra J, Upadhyay SN, Singh RK, Amal RC. (2008). Arsenic induced toxicity on testicular tissue of mice. *Indian J Physiol Pharmacol.* 52(1):84-90.

Sailer BL, Jost LK, Erickson KR, Tajiran MA, Evenson DP. (1995). Effects of X-irradiation on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *Environ Mol Mutagen.* 25(1):23-30.

Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D.(2002). Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod.* 66(4):1061-1067.

Saric M. (1984). Reproduction and exposure to lead. *Ann Acad Med Singapore.* 13: 383-388.

Seidal K, Jorgensen N, Elinder CG, Sjogren B, Vahter M. (1993). Fatal cadmium-induced pneumonitis. *Scand J Work Environ Health.* 19: 429–431.

Shelby MD, Bishop JB, Mason JM, Tindall KR.(1993). Fertility, reproduction, and genetic disease: studies on the mutagenic effects of environmental agents on mammalian germ cells. *Environ Health Perspect.* 100:283-291.

Shelnutt KP, Kauwell GP, Gregory JF III, (2004). Methylene tetrahydrofolate reductase 677C3T polymorphism affects DNA methylation in response to controlled folate intake in young women. *J Nutr Biochem* 15:554–560.

Shetty G, Wilson G, Huhtaniemi I, Boettger-Tong H, Meistrich ML. (2001). Testosterone inhibits spermatogonial differentiation in juvenile spermatogonial depletion mice. *Endocrinology*. 142:2789-2795.

Sourgens H, Klagesk, Bertram HP. (1987). Gonadal and Thyroid function after experimental lead exposure. *Trace Elements in Medicine*. 4: 8-12.

Spanò M, Kolstad AH, Larsen SB, Cordelli E, Leter G, Giwercman A, Bonde JP. (1998). The applicability of the flow cytometric sperm chromatin structure assay in epidemiological studies. *Asclepios. Hum Reprod*. 13(9):2495-2505.

Spanò M, Bonde JP, Hjöllund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. (2000). Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril*. 73(1):43-50.

Staessen JA, Roels HA, Emelianov D, Kuznetsova T, Thijs L, Vangronsveld J. (1999). Environmental exposure to cadmium, forearm bone density, and risk of fractures: prospective population study. Public Health and Environmental Exposure to Cadmium (PheeCad) Study Group. *Lancet*. 353: 1140–1144.

Steenland K, Boffetta P. (2000). Lead and cancer in humans: where are we now? *Am J Ind Med.* 38:295-299.

Stern H, and Hotta Y. (1977). Biochemistry of meiosis. *Philos Trans R. Soc Lond Bio Sci.* 277: 271-294.

Stuart I. (2003). *Fisiología Humana* Ed. McGraw- Hill Interamericana, México. 7ª edición. Pág. 74-79.

Stubbs L, and Stern H. (1986). DNA synthesis at selective sites during pachytene in mouse spermatocytes. *Chromosoma.* 93: 529-536.

Suzuki K, Suzuki I, Leodolter A, (2006). Global DNA demethylation in gastrointestinal cancer is age dependent and precedes genomic damage. *Cancer Cell* 9:199 –207.

Tang X. M., Chen X. Q., Zhang J. X. (1990). Cytogenetic investigation in lymphocytes of people living in cadmium-polluted areas. *Mutat Res.* 241: 243-249.

T Helleday, R Nilsson and D Jenssen. (2000). Arsenic (III) and heavy metal ions induced intrachromosomal homologous recombination in the *hprt* gene of V79 Chinese hamster cells. *Environ Mol Mutagen* 35, 114-122.

T Ochi, T Ishiguro and M Ohsawa. (1983). Participation of active oxygen species in the induction of DNA single-strand scission by cadmium chloride in cultured Chinese hamster cells. *Mutat Res* 122, 169-175.

T Ochi, M Mogi, M Watanabe and M Ohsawa. (1984). Induction of chromosomal aberrations in cultured Chinese hamster cells by short-term treatment with cadmium chloride. *Mutat Res* 137, 103-109.

Mass MJ, Wang L. (1997). Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis. *Mutat Res.* 386:263–277.

World Health Organization (WHO). (1984). *Guidelines for Drinking Water. Vol. 1. Recommendations* (WHO, Geneva, Switzerland).

WHO. (1985). Fourteenth annual report. Geneva pag 123.

WHO. (1992). *Cadmium*. Environmental Health Criteria, vol. 134. Geneva: World Health Organization.

WHO. (1995). *Lead*. Environmental Health Criteria, vol. 165. Geneva: World Health Organization.

WHO. (2001), *Arsenic and Arsenic Compounds*. Environmental Health Criteria, vol. 224. Geneva: World Health Organization.

Winder, C., Bonin, T. (1993). The genotoxicity of lead. *Mutat. Res.* 285:117–124.

Wittmers, L. J., Wallgren, J. E., Alich, A. (1988). Lead in bone. IV. Distribution of lead in the human skeleton. *Arch. Environ. Health* 43:381–391.

Y Shiraishi, H Kurahashi and TH Yoshida. (1972). Chromosomal aberrations in cultured human lymphocytes induced by cadmium sulphide. *Proc Jpn Acad* 48, 133-137.

Zhang SF, Yan SL, Ye BK, and Teng CS. (1989). Biological activity in the repopulating rat spermatocyte after the withdrawal of gossypol treatment: The activity for DNA synthesis. *Contraception.* 40: 233-242.

Zhao CQ, Young MR, Diwan BA, Coogan TP, Waalkes MP. (1997). Association of arsenic-induced malignant transformation with DNA hypomethylation and aberrant gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:10907–10912.

RESUMEN CURRICULAR

Martha Patricia Nava Hernández

Tesis: TOXICIDAD DEL PLOMO, CADMIO Y ARSÉNICO
DESPUÉS DE UNA EXPOSICIÓN CRÓNICA EN EL DNA
DEL ESPERMATOCITO PRIMARIO DE LA RATA MACHO.

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud.

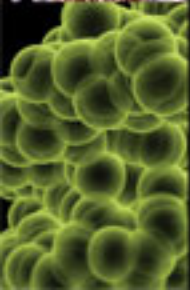
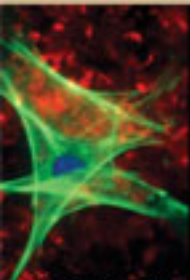
Datos Personales: Nacida en La Paz, B. C. Sur, el 20 de Septiembre de 1961. Hija del Sr. Víctor Nava Montes y Martha Consuelo Hernández Armendáriz.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Coahuila, grado obtenido de Químico Farmacobiólogo en el año de 1984. Maestra en Ciencias en Reproducción animal por la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, grado obtenido en el año de 1999.

Experiencia Profesional: Catedrático investigador de tiempo completo de la Universidad Autónoma de Coahuila Unidad Torreón desde 1988. Encargada del área de Hormonas Esteroides, Andrología y TSH Neonatal en el Departamento de Biología de la Reproducción del Centro de Investigación Biomédica. Responsable del curso de Bioquímica Avanzada a residentes de Ginecología de la Facultad de Medicina de Torreón, Coah.



DNA AND CELL BIOLOGY



Mary Ann Liebert, Inc.  publishers

Lead-, Cadmium-, and Arsenic-Induced DNA Damage in Rat Germinal Cells

Martha P. Nava-Hernández,^{1–3} Leticia A. Hauad-Marroquín,¹ Susana Bassol-Mayagoitia,³
Guadalupe García-Arenas,⁴ Roberto Mercado-Hernández,¹
Miguel A. Echávarri-Guzmán,² and Ricardo M. Cerda-Flores^{1,2,5}

Toxic agents can interfere with the male reproductive system at many targets. One of the major unresolved questions concerning male infertility is identification of its molecular origins. Clinical and animal studies indicate that abnormalities of spermatogenesis result from exposure to three toxic metals (lead acetate, cadmium chloride, and arsenic trioxide), but the effects on primary spermatocyte DNA of the male rat after chronic exposure to these metals have not been identified. The aims of this study were to analyze, in three independent experiments, the DNA damage induced by lead (Pb), cadmium (Cd), and arsenic (As) in rat germinal cells during three time periods, and to determine the relationship between DNA damage and blood Pb, blood Cd, and urine As levels. For lead acetate and cadmium chloride experiments, blood was collected by cardiac puncture, while for arsenic trioxide a 24-h urine sample was collected. Afterward, the animals were sacrificed by decapitation. Pachytene spermatocytes from rat testes were purified by trypsin digestion followed by centrifugal elutriation. After establishment of cell purity and viability, DNA damage (tail length) was measured employing a single cell gel/comet assay. Significant DNA damage was found in primary spermatocytes from rats with chronic exposure (13 weeks) to toxic metals. In conclusion, these findings indicate that exposure to toxic metals affects primary spermatocyte DNA and are suggestive of possible direct testicular toxicity.

Introduction

TESTIS REPRESENTS ONE OF THE major cell systems at risk when animals are exposed to environmental genotoxic agents that cause DNA damage, due to potential inheritable mutations (Atorino *et al.*, 2001). In the testis, spermatogenesis occurs in three major phases, mitotic proliferation of spermatogonia, reductional meiotic spermatocyte division, and haploid spermatid differentiation (spermiogenesis) to form mature spermatozoa (Handel, 1998). Several unique events take place during meiosis that are not found in somatic cells, the two most prominent being chromosome pairing and recombination during prophase I (Hawley, 1988) and histone replacement with protamines during chromatin condensation (Handel). During DNA replication mistakes can occur, especially at pachytene, when an interval of regulated DNA nicking followed by repair synthesis takes place, which is known as recombinational repair. Although late spermatids do not replicate their DNA, they remain able to repair

genetic damage prior to final nuclear chromatin condensation (Handel).

Recently, male infertility has received the attention of investigators in different fields such as toxicology, genetics, and molecular and cellular biology. Their work has shed light on the pathophysiological mechanisms underlying spermatogenic defects. In toxicology, several observations suggest that the reproductive health of both humans and wildlife have been adversely affected by environmental exposure to chemicals that interact with the endocrine system. These substances exert their effects during embryological development of gonad and genital tract and/or on adult testicular functions (Ashby *et al.*, 1997; Cooper and Kavlovk, 1997; Cheek and McLachlan, 1998).

Lead acetate

Lead (Pb), an environmental contaminant, affects the reproductive function of many animal species. Alterations in gonads affect gametogenesis and hence an individual's

¹Faculty of Biological Sciences, Autonomous University of Nuevo León (UANL), Monterrey, Mexico.

²Department of Population Genetics and Bioinformatics, Biomedical Investigation Center of the Northeast, Mexican Institute of Social Insurance, Monterrey, Mexico.

³Department of Reproductive Biology, Biomedical Investigation Center, Faculty of Medicine, Autonomous University of Coahuila-Torreón, Torreón, Mexico.

⁴Department of Pharmacology, Juárez University of the State of Durango, Gómez Palacio, Mexico.

⁵Nursing Faculty, Autonomous University of Nuevo León (UANL), Monterrey, Mexico.

ability to produce offspring. Certain types of environmental pollution may be toxic to the reproductive system, but according to Ewing and Mattison (1987), these have not been adequately tested for reproductive toxicity.

Continuous Pb emission into the environment from automobile exhaust in the past and from industries, its ability to bind with mammalian tissues, and its possible effects on the reproductive system emphasize the need to fully understand the effects of Pb toxicity on the reproductive system (Murthy *et al.*, 1991). A number of researchers have reported on Pb toxicity in testis and spermatogenesis. Hilderbrand *et al.* (1973) reported that Pb-exposed rats with blood Pb concentrations of 50 µg/dL manifested histological evidence of testicular damage and inhibited spermatogenesis. Eyden *et al.* (1978) noted similar histological abnormalities in testes of adult mice, while others reported no morphological changes in sperm after prolonged Pb exposure (Fowel *et al.*, 1980).

Cadmium chloride

Cadmium (Cd) is considerably more toxic than Zn, Pb, and other heavy metals (Gunn and Gould, 1970; Pařízek, 1983). Cd accumulates in the human body for long periods, even after minimal exposure, and has severe effects in prostate and lung cancer in humans and in the hematological system in animals (Itokawa *et al.*, 1973; Waalkes and Oberdorster, 1990; Magos, 1991; Koizumi and Li, 1992). Many toxicology studies have focused on the effects of Cd on vital organs such as liver, lungs, kidney, and pancreas, while excluding testes (Gunn and Gould; Stowe *et al.*, 1972). Reproductive studies conducted in male mammals have dealt primarily with testicular effects in rodents (Gunn and Gould; Aoki and Hoffer, 1978; Yan *et al.*, 1997). In males, the more accessible reproductive endpoint is semen (Xu *et al.*, 1993; Benoff *et al.*, 1997). There are several studies indicating that Cd chloride genotoxicity can be detected by comet assay at the molecular level. These endpoints are very useful for studying heavy metal-induced genotoxicity (Jianhua *et al.*, 2006).

Arsenic trioxide

Exposure to excess arsenic (As), principally from contaminated drinking water, is considered one of the major environmental health threats both in the United States and worldwide (Smith *et al.*, 1992; NRC, 1999, 2001; Abernathy *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 2003; Mukherjee *et al.*, 2006). The majority of this exposure derives from natural geological sources of As that contaminate groundwater.

As is a naturally occurring element widely distributed in the earth's crust (ATSDR, 2007). Inorganic As is a known human carcinogen. Epidemiologic studies show that chronic As exposure produces tumors of skin, urinary bladder, lung, liver, prostate, kidney, and possibly of other organs (IARC, 1987; Bates *et al.*, 1992; Smith *et al.*; NRC, 1999; ATSDR, 2000; Morales *et al.*, 2000; Achanzar *et al.*, 2002).

Tests for genotoxicity have indicated that As compounds inhibit DNA repair and induce chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, and micronuclei formation in both human and rodent cells in culture (Jha *et al.*, 1992; Wang and Rossman, 1996) and in exposed human cells. Based on comet assay, it has been reported that As trioxide

induces DNA damage in human lymphocytes (Schaumloffel *et al.*, 1998) and in mouse leukocytes (Saleha *et al.*, 2001).

Although these data are suggestive of possible direct testicular toxicity, it is not clear whether Pb, Cd, and As directly alter primary spermatocyte DNA, and that this is the manner in which spermatogenesis can be altered.

Effects on primary spermatocyte DNA of male rat after chronic exposure to these metals have not been identified. Based on these antecedents, the aims of this study were to analyze Pb-, Cd-, and As-induced DNA damage in rat germinal cells.

Materials and Methods

Animals

Young adult Wistar rats weighing 280–300 g were obtained from the Experimental Animal Laboratory of the Juárez University School of Medicine. They were housed in the rodent vivarium in a separate room with 12-h light/dark cycle and under a controlled temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). Animals were housed in plastic cages and given free access to standard pellet diet; water was provided ad libitum. They were allowed to acclimate to their new environment for 7 days prior to initiation of metals treatment. This investigation was conducted in accordance with Technique Specifications for the Production, Care, and Use of Laboratory Animals (SAGARPA in Mexico; NOM-062-ZOO, 1999) and was approved by the Ethical Committee of the Juárez University School of Medicine.

Study design

Male Wistar rats aged 60 days at treatment onset were studied. Age groups were selected based on significant maturation events in rat life cycle. In the male Wistar rat, peripubertal period occurs from ~40–52 days of age. For experiments with each metal, nine rats were treated during 90 days, classified into three time periods (1, 7, and 13 weeks). Selection of metal dose, exposure time, and procedure were based on previous studies investigating damage in other rat tissues and organs caused by Pb (Sokol *et al.*, 1985; Murthy *et al.*, 1991; Jadhav *et al.*, 2007), Cd (Fatma *et al.*, 2004; Jadhav *et al.*), and As (Murthy *et al.*; Jadhav *et al.*; Luo *et al.*, 2009). Each experiment was designed as follows:

- I. Three groups were treated in the following manner: three rats with deionized distilled water (control group: L0), three rats with 250 mg/L Pb acetate (L1), and three rats with 500 mg/L Pb acetate (L2).
- II. Three control rats (C0), three rats with 25 mg/L Cd chloride (C1), and three rats with 50 mg/L Cd chloride (C2).
- III. Three control rats (A0), three rats with 50 mg/L As trioxide (A1), and three rats with 100 mg/L As trioxide (A2).

For lead acetate and cadmium chloride, blood was collected by cardiac puncture, and for arsenic trioxide a 24-h urine sample was collected. Subsequently, animals were sacrificed by decapitation. Pachytene spermatocytes from rat testes were purified by trypsin digestion followed by centrifugal elutriation. After establishment of cell purity and viability, DNA damage was measured by employing the single cell gel/comet assay.

Chemicals

Crude DNase I, bovine serum albumin (BSA) solution, glucose, phosphate buffered saline (PBS: sodium chloride, potassium chloride, sodium phosphate dibasic, dipotassium hydrogenophosphate, magnesium chloride, and calcium chloride), pure trypsin, and trypsin inhibitor were obtained from Worthington Biochemical Corporation (Lakewood, NJ) and NDA (2-Naphtol-6,8-disulfonic acid) was purchased from Fluka (Toluca, Mexico). For the comet assay, agarose was obtained from GIBCO-BRL (Life Technologies, Federal District, Mexico) along with Tris base, Triton X-100, and dimethyl sulfoxide, while sodium hydroxide (NaOH) was purchased from Sigma Chemical (Toluca, Mexico) and EDTA, lead acetate, cadmium chloride, and arsenic trioxide were obtained from J.B. Baker (Federal District, Mexico). Solutions were prepared in advance and stored in the freezer in distilled water.

Germ cell purification

Mid-pachytene spermatocytes and round spermatids were isolated by trypsin digestion and purified by centrifugal elutriation using the method of Meistrich *et al.* (1981). Testes obtained from young adult rats were decapsulated and chopped into small pieces 300 μm in size by an electric chopper in three directions. The chopped tissues were transferred to a trypsination flask containing PBS/G, trypsin (2.5%), DNase (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) at 32°C for 30 min, with shaking in a shaker water bath. Fetal bovine serum was added to a 10% final concentration. The sample was filtered through an 80 μm stainless steel screen (prewetted) into 50 mL capped plastic tubes, spin-filtrated at 1500 rpm for 10 min at RT (room temperature), the supernatant aspirated off, and the pellet resuspended in 20 mL of solution Y [2.5% soybean trypsin inhibitor (STI), CD-25, 30% BSA, 100 mM NDA in PBS] at RT. Trypsin action was stopped with soybean trypsin inhibitor (2.5%) in the presence of DNase I and 30% BSA, and samples were filtered through a 25 μm nylon screen (prewetted). The samples were then loaded into a Beckman Elutriator Rotor (JE-6B), with a standard chamber fitted on a Beckman High Speed Centrifuge (J2-21). Four fractions were collected at 2000 rpm at flow rates of 12.2, 18.2, 26.0, and 42.0 mL/min. Fraction IV contained pachytene spermatocytes at purities of ~80% (Table 1).

Single cell gel/comet assay

Once a sample of cells was obtained, cells were suspended in low-melting-point (LMP) agarose and placed on a slide

TABLE 1. PARAMETERS OF GERM CELL PURIFICATION USED FOR THE ELUTRIATION PROCEDURE IN TESTES OF RATS EXPOSED TO LEAD ACETATE, CADMIUM CHLORIDE, AND ARSENIC TRIOXIDE

| Fraction | Parameters | | | Cell type |
|----------|---------------|------|-------------|----------------------|
| | Flow (mL/min) | RPM | Volume (mL) | |
| I | 12.2 | 2000 | 150 | Spermatozoa |
| II | 18.2 | 2000 | 90 | Round cells |
| III | 26.0 | 2000 | 150 | Round cells |
| IV | 42.0 | 2000 | 90 | Primary spermatocyte |

RPM, revolutions per minute.

precoated with a layer of regular agarose at 0.75%. A coverslip was used to flatten the agarose layer, and the gel was subsequently allowed to dry under refrigeration for 10 min. The coverslip was removed carefully, another layer of LMP agarose was adhered, and the procedure was repeated. After the agarose gel had solidified, slides were placed for the final 1 h in a lysis solution consisting of high salts and detergents. At the end of the lysing period, slides were incubated in alkaline buffer (pH < 13.0) prior to electrophoresis to produce single-stranded DNA and express alkali labile sites (ALS) as single strand breaks (SSB). The alkaline solution developed by Singh *et al.* (1988) consists of 1 mM EDTA and 300 mM NaOH. The alkaline buffer used during electrophoresis was the same pH < 13 buffer employed during alkali unwinding. The electrophoretic condition developed by Singh *et al.* (1988) was 25 V and 300 mA, with DNA electrophoresed for 20 min in the dark and at 5°C, because use of a lower temperature is thought to provide increased reproducibility. After electrophoresis, the gels were neutralized by rinsing the slides in pH 7.5 \times tris buffer three times for 5 min each. The slides were then stained and comets scored using an inverted fluorescence microscope (Olympus IX70) with an objective of 40 \times and an excitation filter of 340 nm. One hundred images of the nucleus were captured. Images were then analyzed employing Kinetic 5.5 comet analysis software, which is designed exclusively for this type of image. Four parameters were evaluated: head DNA (%), tail DNA (%), tail length (μm), and tail moment (μm).

Blood Pb and Cd measurements

Blood samples were collected by heart puncture. Two mL of blood were obtained from each rat using sealed EDTA vacutainer Pb-free tubes. The tubes were stored under refrigeration until analysis. Blood Pb and Cd analysis was performed at the Department of Toxicology, School of Medicine, Autonomous University of Nuevo León (UANL) in Mexico employing Zeeman graphite-furnace atomic absorption spectrophotometry with a 2 $\mu\text{g}/\text{dL}$ detection limit for Pb and 0.3 $\mu\text{g}/\text{dL}$ for Cd. Analysis was performed according to the 1994 Mexican Official Norm (NOM-084-STPS).

Urine sample measurements

As was measured in urine because the half life of As in blood is too short (10 h) and its levels in blood are useful only during some days in acute exposures, but not useful in chronic exposures (Goyer, 1996).

Rats were placed in metabolic cages for collection of 24-h urine samples. Arsenic trioxide was quantified by hydride generation atomic fluorescence spectrometer (Zeeman) with a detection limit of 2 $\mu\text{g}/\text{dL}$. This was performed at the Department of Toxicology, School of Medicine, UANL in Mexico.

Statistical analysis

Data were entered into a database for statistical analysis, which was conducted in three stages. The first stage included descriptive statistics (mean and standard deviation [SD]) of body weight, water ingestion, percentage of DNA damage (tail DNA), blood Pb, blood Cd, and urine As levels. One-way ANOVA with Tukey test for multiple comparisons at interpopulation levels was conducted in the second stage to

investigate any possible difference in DNA damage, blood Pb, blood Cd, and urine As levels. Finally, to ascertain the relationship between percentage of DNA damage and each of the three metals, we conducted a Pearson correlation analysis.

Results

Body weight and water consumption

Exposure levels did not significantly affect body weight compared with those of controls at the time of sacrifice (Table 2). Water consumption was also not influenced by exposure levels, except for Pb treatment, in which some rats exposed to a lower concentration drank more water (30 mL per day) than those exposed to a higher concentration (27 mL per day), probably due to poor water flavor caused by the greater concentration of Pb, as reported in a study by Sokol *et al.* in 2002 (Table 2).

Blood Pb, Cd levels, and urine As levels

All control animals had consistent mean blood Pb levels of <5 µg/dL. All Pb-treated animals had blood Pb levels greater than those of controls (L1, 19.54 µg/dL and L2, 21.90 µg/dL).

TABLE 2. BODY WEIGHT AND WATER INGESTED PER WEEK IN THREE GROUPS OF RATS USING LEAD ACETATE, CADMIUM CHLORIDE, AND ARSENIC TRIOXIDE

| Heavy metal | Week | Group | Number | Body weight (g) Mean ± SD | Water ingested (mL) Mean ± SD |
|-------------|------|-------|--------|------------------------------|----------------------------------|
| Pb | 1 | L0 | 3 | 289.83 ± 8.27 | 237.30 ± 64.95 |
| | | L1 | 3 | 278.63 ± 8.12 | 209.16 ± 30.02 |
| | | L2 | 3 | 270.90 ± 6.48 | 193.33 ± 27.53 |
| | 7 | L0 | 3 | 378.03 ± 13.00 | 228.13 ± 14.43 |
| | | L1 | 3 | 396.83 ± 36.20 | 203.73 ± 24.88 |
| | | L2 | 3 | 423.86 ± 11.63 | 185.53 ± 15.02 |
| | 13 | L0 | 3 | 430.36 ± 1.25 | 183.33 ± 14.43* |
| | | L1 | 3 | 434.66 ± 59.91 | 118.00 ± 12.12 |
| | | L2 | 3 | 479.46 ± 13.68 | 174.83 ± 22.96 |
| Cd | 1 | C0 | 3 | 254.45 ± 7.56 | 317.10 ± 16.82* |
| | | C1 | 3 | 293.00 ± 9.53 | 251.90 ± 33.72 |
| | | C2 | 3 | 276.33 ± 18.58 | 198.03 ± 19.95 |
| | 7 | C0 | 3 | 294.55 ± 11.80 | 249.90 ± 3.55* |
| | | C1 | 3 | 326.60 ± 16.11 | 207.16 ± 11.80 |
| | | C2 | 3 | 320.50 ± 6.45 | 178.20 ± 20.31 |
| | 13 | C0 | 3 | 333.90 ± 9.33* | 300.00 ± 4.00* |
| | | C1 | 3 | 356.03 ± 10.54 | 252.73 ± 58.73 |
| | | C2 | 3 | 357.40 ± 3.21 | 176.33 ± 2.30 |
| As | 1 | A0 | 3 | 269.73 ± 14.50* | 311.53 ± 2.88* |
| | | A1 | 3 | 297.66 ± 17.50 | 207.06 ± 67.99 |
| | | A2 | 3 | 323.33 ± 6.50 | 192.96 ± 40.29 |
| | 7 | A0 | 3 | 391.13 ± 21.29 | 341.33 ± 62.90* |
| | | A1 | 3 | 416.10 ± 27.28 | 221.53 ± 44.98 |
| | | A2 | 3 | 435.36 ± 20.29 | 172.66 ± 48.95 |
| | 13 | A0 | 3 | 441.03 ± 25.32 | 292.86 ± 115.50 |
| | | A1 | 3 | 443.20 ± 26.45 | 155.33 ± 17.76 |
| | | A2 | 3 | 434.46 ± 43.01 | 154.66 ± 27.30 |

L0, L1, L2 represent rats exposed to 0, 250, and 500 mg/L lead acetate; C0, C1, C2 represent rats exposed to 0, 25, and 50 mg/L cadmium chloride; A0, A1, A2 represent rats exposed to 0, 50, and 100 mg/L arsenic trioxide.

* $p < 0.05$; SD = standard deviation.

There was no significant difference between exposed groups, probably because L2 group drank less water than L1 group. In the case of Cd, all controls had mean blood levels of 5 µg/dL, with C1 at 14.3 µg/dL and C2 at 32.0 µg/dL. All control animals had mean urine As levels of 487.33 µg/dL, with A1 at 21,456 µg/dL and A2 at 87,447 µg/dL. These results reveal a marked increase in the levels of the different metals in rats exposed for 13 weeks (Table 3).

DNA damage

In the alkaline comet assay, an increase in DNA strand breaks leads to greater DNA migration out of the nucleus and into the comet tail (Fig. 1). The extent of dose-dependent DNA damage is shown in Table 3. For L0 the percentage of damage was 20.50%, for L1 58.53%, and for L2 61.13%. In the case of Cd, the damage was 23.0% for C0, 42.33% for C1, and 69.66% for C2. For As, A0 had 19.33% damage, A1 48.0%, and A2 80.0%. Mean cell numbers showing DNA damage by comet assay in all three control groups were significantly lower than those in the groups exposed to the different metals.

Discussion

Heavy metals contamination is especially problematic in the Comarca Lagunera area in Mexico for children and adults, who may ingest as much as 90 mg of soil per day (Calabrese *et al.*, 1989; EPA, 1997). Average ingestion of As (as As⁺⁵) in this population is 57.6 ppb higher than the 10 ppm average permitted by the WHO (1984) (Coronado-González *et al.*, 2007). Previous studies of exposure to heavy metals in Mexico were focused primarily on Pb in gasoline and household ceramics. Other environmental contaminants, such as Cd and As, have been largely ignored. Likewise, there is little investigation of industrial pollution from smelters and refineries (Albert and Badillo, 1991; Romieu *et al.*, 1992; Díaz-Barriga *et al.*, 1993; Romieu *et al.*, 1995; Díaz-Barriga *et al.*, 1997). In other countries, Pb, As, and Cd have been established as

TABLE 3. DNA DAMAGE, BLOOD LEVELS OF Pb AND Cd, AND URINE AS CONCENTRATION IN THREE GROUPS OF RATS USING LEAD ACETATE, CADMIUM CHLORIDE, AND ARSENIC TRIOXIDE DURING 13 WEEKS OF EXPOSURE

| Heavy metal | Week | Group | Number | DNA damage (%) Mean ± SD | Levels (µg/dL) Mean ± SD |
|-------------|------|-------|--------|-----------------------------|-----------------------------|
| Pb | 13 | L0 | 3 | 20.50 ± 3.50* | 2.00 ± 0.76 |
| | | L1 | 3 | 58.53 ± 7.42 | 19.54 ± 4.18 |
| | | L2 | 3 | 61.13 ± 3.75 | 21.90 ± 7.27 |
| Cd | 13 | C0 | 3 | 23.00 ± 4.24* | 5.00 ± 1.00 |
| | | C1 | 3 | 42.33 ± 2.51 | 14.36 ± 3.50 |
| | | C2 | 3 | 69.66 ± 7.76 | 32.00 ± 10.53 |
| As | 13 | A0 | 3 | 19.33 ± 8.50* | 487.33 ± 325.06 |
| | | A1 | 3 | 48.00 ± 6.08 | 21,456.67 ± 2551.73 |
| | | A2 | 3 | 80.00 ± 7.81 | 87,447.00 ± 8539.45 |

L0, L1, L2 represent rats exposed to 0, 250, and 500 mg/L lead acetate; $\mu_{L0} \neq \mu_{L1} = \mu_{L2}$.

C0, C1, C2 represent rats exposed to 0, 25, and 50 mg/L cadmium chloride; $\mu_{C0} \neq \mu_{C1} = \mu_{C2}$.

A0, A1, A2 represent rats exposed to 0, 50, and 100 mg/L arsenic trioxide; $\mu_{A0} \neq \mu_{A1} = \mu_{A2}$.

* $p < 0.00001$; SD = standard deviation.

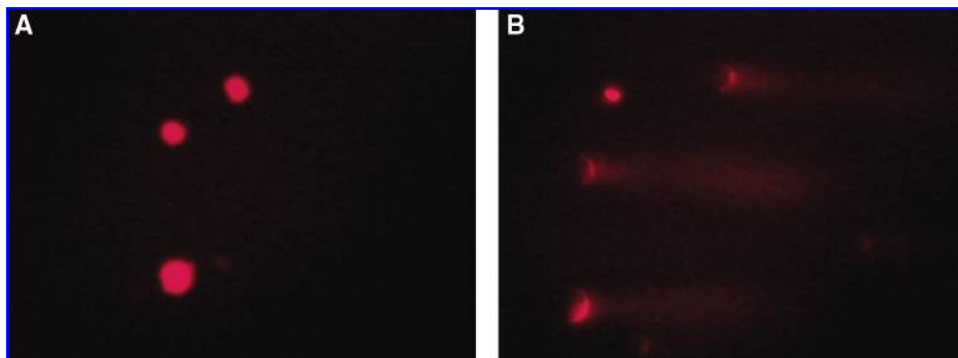


FIG. 1. (A) Primary spermatocyte without damage in its DNA. (B) Primary spermatocyte with damage in its DNA. Color images available online at www.liebertonline.com/dna.

health threats to persons living in communities surrounding ore smelters and refineries (Roels *et al.*, 1980; Baghurst *et al.*, 1992).

The present study evaluated the effect of Pb, Cd, and As on spermatogenesis in rats exposed to drinking water containing high concentrations of these metals. The importance of this study lies in that it evaluated the effect on the primary spermatocytes. To our knowledge, no appraisal on this cell type has been reported previously in the literature. The concentrations selected herein for each metal were calculated according to doses cited by the WHO that are known to raise the plasma levels of metals in humans.

The results obtained in this study indicate that exposure to Pb, Cd, and As results in DNA damage in rat primary spermatocytes. Rats exposed to a lower concentration of Pb drank more water than those exposed to a higher concentration, probably due to a poor water flavor caused by the greater concentration of the metal. Most Pb-exposed rats consumed less water than their respective controls. The percentage of DNA damage and Pb levels in blood would not present a significant difference in exposed groups until 13 weeks ($p < 0.05$). There are two possible explanations: First, blood Pb levels are usually related to current exposure. For chronic exposure, bone Pb level is more relevant. Second, it is possible that absorption of Pb in gastrointestinal tract was limited. Thus, Pb level in blood was not associated with exposure level. The rats exposed to Cd and As exhibited similar behavior with regard to water consumption. They presented damage in the DNA, and the amount of metals in blood and urine presented significant correlations at 13 weeks ($p < 0.05$). This supports the hypothesis of damage in primary-spermatocyte DNA structure of rats caused by chronic exposure to Pb, Cd, and As. Previous studies employing this animal model and Pb have demonstrated damage at testicular level and a decrease in the relative volume of germinal cell (seminiferous) epithelium as a dynamic part of the testes, in which mitotic as well as meiotic cell division occurs (Massanyi *et al.*, 2007). Pb administration causes an appreciable decline in fertility status. In cell kinetics studies, significant declines in several cell populations, spermatids, and mature spermatozoa were detected (Batra *et al.*, 2004).

Cd is one of the environmental pollutants that affect several tissues and organs including testis. The harmful effects of Cd on testis include germ cell degeneration and impairment of testicular steroidogenesis (Sadik, 2008). There are reports of increased Cd accumulation in hypothalamus, pituitary glands, and testis, and decreased plasma levels of

follicle-stimulating hormone in rats, suggesting a possible effect of the metal on the hypothalamic-pituitary-testicular axis (Lafuente *et al.*, 2000). Jana *et al.* (2006) reported the manner in which As can alter reproductive functions by decreasing paired testicular mass, inhibiting testicular androgenesis, and diminishing concentrations of testosterone and gonadotrophins, in addition to increasing adrenocortical activity. Sanghamitra *et al.* (2008) reported the toxic effect of As in testis of mice and demonstrated that As-treated mice exhibited dose-dependent gradual reductions in seminiferous tubular diameter and several gametogenic cell populations, for example, resting spermatocyte, pachytene spermatocyte, and step-7 spermatid with the exception of spermatogonia. These findings confirm that metals can induce testicular toxicity.

The results of the present study demonstrate that Pb, Cd, and As are directly toxic to primary spermatocytes, causing DNA damage. Maintenance of DNA integrity in the paternal genome is of utmost importance for reproduction (Cordelli *et al.*, 2003). DNA lesions in germ cells can lead to impaired fertility and abnormal reproductive outcomes such as spontaneous abortion, genetic diseases, and increased incidence of cancer (Brinkworth, 2000; Spanò *et al.*, 2000; Coddington *et al.*, 2004). DNA abnormalities in spermatozoa are well documented (Spanò *et al.*, 1998; Sakkas *et al.*, 2002). The origin of DNA damage and the mechanism of DNA fragmentation in mature spermatozoa still remain unclear. DNA fragmentation can take place directly in mature spermatozoa as a consequence of exposure to endogenous (reactive oxygen species) or exogenous (chemicals or radiations) mutagens or through alterations in the process of creating and ligating nicks during spermiogenesis (Aitken *et al.*, 1998; Ahmadi and Ng, 1999; Alvarez *et al.*, 2002; Sakkas *et al.*, 2002). Animal studies analyzing DNA sperm integrity after X-irradiation showed that spermatozoa with DNA lesions could also derive from premitotic germ cell damage (Sailer *et al.*, 1995; Haines *et al.*, 2002). The results of these investigations lead us to believe that DNA fragmentation present in the spermatozoa can derive from a process of DNA fragmentation occurring in the primary spermatocyte after exposure to these toxic metals. Shelby *et al.* (1993) mentioned that damage induced in the genetic material of the developing male germ cell may not affect the ability of the resulting sperm to fertilize the ovum, but this damage can be potentially transmitted to successive generations.

It will be very important for these findings to be validated by other researchers. Examining the histology of the testes after chronic exposure to these metals/metalloids will

provide some evidence of whether DNA damage is the primary or secondary effect in spermatocytes, and will also shed some light on the destination of these damage cells.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to CONACyT-México for doctoral grant 71908 to MPNH. Special thanks to Margaret Ellen Reynolds Adler for helpful suggestions and critical reading of the manuscript, and to Dr. Marvin Meistrich from Section of Experimental Radiotherapy, M.D. Anderson Hospital and Tumor Institute, Houston, Texas for his assistance on Elutriation technique.

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Abernathy, C.O., Thomas, D.J., and Calderón, R.L. (2003). Health effects and risk assessment of arsenic. *J Nutr* **133** (Suppl 1), 1536S–1538S.
- Achanzar, W.E., Brambila, E.M., Diwan, B.A., Webber, M.M., and Waalkes, M.P. (2002). Inorganic arsenite-induced malignant transformation of human prostate epithelial cells. *J Natl Cancer Inst* **94**, 1888–1891.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2000). *Toxicological Profiles for Arsenic* (USDHHS, Atlanta, GA).
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2007). *Toxicological Profiles for Arsenic* (USDHHS, Atlanta, GA).
- Ahmadi, A., and Ng, S.C. (1999). Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool* **284**, 696–704.
- Aitken, R.J., Gordon, E., Harkiss, D., Twigg, J.P., Milne, P., Jennings, Z., and Irving, D.S. (1998). Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* **59**, 1037–1046.
- Albert, L.A., and Badillo, F. (1991). Environmental lead in Mexico. *Rev Environ Contam Toxicol* **117**, 1–49.
- Alvarez, J.G., Sharma, R.K., Ollero, M., Saleh, R.A., López, M.C., Thomas, A.J., Jr., Evenson, D.P., and Agarwal, A. (2002). Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* **78**, 319–329.
- Aoki, A., and Hoffer, A.P. (1978). Reexamination of the lesions in rat testis caused by cadmium. *Biol Reprod* **18**, 579–591.
- Ashby, J., Houthoff, E., Kennedy, S.J., Stevens, J., Bars, R., Jekat, F.W., Campbell, P., Van Miller, J., Carpanini, F.M., Randall, G.L. (1997). The challenge posed by endocrine-disrupting chemicals. *Environ Health Perspect* **105**, 164–169.
- Atorino, L., Di Miglio, S., Farina, B., Jones, R., and Quesada, P. (2001). Rat germinal cells require PARP for repair of DNA damage induced by γ -irradiation and H_2O_2 . *Eur J Cell Biol* **80**, 222–229.
- Baghurst, P.A., Tong, S., McMichael, A.J., Robertson, E.F., Wigg, N.R., and Vimpani, G.V. (1992). Determinants of blood lead concentrations to age 5 years in a birth cohort study of children living in the lead smelting city of Port Pirie and surrounding areas. *Arch Environ Health* **47**, 203–210.
- Bates, M.N., Smith, A.H., and Hopenhayn-Rich, C. (1992). Arsenic ingestion and internal cancers: a review. *Am J Epidemiol* **135**, 462–476.
- Batra, N., Nehru, B., and Bansal, M.P. (2004). Reproductive potential of male Portan rats exposed to various levels of lead with regard to zinc status. *Br J Nutr* **91**, 387–391.
- Benoff, S., Hurley, I.R., Barcia, M., Mandel, F.S., Cooper, G.W., and Herschlag, A. (1997). A potential role for cadmium in the etiology of varicocele-associated infertility. *Fertil Steril* **67**, 336–347.
- Brinkworth, M.H. (2000). Paternal transmission of genetic damage: findings in animals and humans. *Int J Androl* **23**, 123–135.
- Calabrese, E.J., Barnes, R., Stanek, E.J., Pastides, H., Gilbert, C.E., Veneman, P., Wang, X., Lasztity, A., and Kostecky, P.T. (1989). How much soil do young children ingest: an epidemiologic study. *Regul Toxicol Pharmacol* **10**, 123–137.
- Cheek, A.O., and McLachlan, J.A. (1998). Environmental hormones and the male reproductive system. *J Androl* **19**, 5–10.
- Coddington, A.M., Hales, B.F., and Robaire, B. (2004). Spermiogenic germ cell phase-specific DNA damage following cyclophosphamide exposure. *J Androl* **25**, 354–362.
- Cooper, R.L., and Kavlock, R.J. (1997). Endocrine disruptors and reproductive development: a weight-of-evidence overview. *J Endocrinol* **152**, 159–166.
- Cordelli, E., Fresegna, A.M., Leter, G., Eleuteri, P., Spano, M., and Villani, P. (2003). Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X-irradiation. *Radiat Res* **160**, 443–451.
- Coronado-González, J.A., Del Razo, L.M., García-Vargas, G., Sanmiguel-Salazar, F., and Escobedo-de la Peña, J. (2007). Inorganic arsenic exposure and type 2 diabetes mellitus in Mexico. *Environ Res* **104**, 383–389.
- Díaz-Barriga, F., Bártres, L., Calderón, J., Lugo, A., Galvao, L., Lara, I., Rizo, P., Arroyave, M.E., and McConnell, R. (1997). The El Paso smelter 20 years later: residual impact on Mexican children. *Environ Res* **74**, 11–16.
- Díaz-Barriga, F., Santos, M.A., Mejía, J.J., Batrés, I., Yáñez, I., Carrizales, I., Vera, E., del Razo, L.M., and Cebrián, M.E. (1993). Arsenic and cadmium exposure in children living near a smelter complex in San Luis Potosí, Mexico. *Environ Res* **62**, 242–250.
- El-Demerdash, F.M., Yousef, M.I., Kedwany, F.S., and Baghdadi, H.H. (2004). Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and b-carotene. *Food Chem Toxicol* **42**, 1563–1571.
- Environmental Protection Agency (EPA). (1997). *Engineering Bulletin: Technology Alternatives for the Remediation of Soils Contaminated with As, Cd, Cr, Hg, and Pb*. EPA/540/S-97/500 (U.S. EPA, Office of Emergency and Remedial Response, Washington, DC).
- Ewing, L.L., and Mattison, D.R. (1987). Biological markers of male reproductive toxicology. *Environ Health Perspect* **74**, 11–13.
- Eyden, B.P., Maisin, J.R., and Mattelin, G. (1978). Long-term effects of dietary lead acetate on survival, body weight and seminal cytology in mice. *Bull Environ Contam Toxicol* **19**, 226–272.
- Fowel, B.A., Kimmel, C.A., Woods, J.S., McConnell, E.E., and Grant, L.D. (1980). Chronic low-level lead toxicity in the rat. III. An integrated assessment of long-term toxicity with special reference to the kidney. *Toxicol Appl Pharmacol* **56**, 59–77.
- Goyer, R.A. (1996). Toxic effects of metals. In *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. C.D. Klaassen, ed. (McGraw-Hill, NY), pp. 691–736.
- Gunn, S.A., and Gould, T.C. (1970). Cadmium and other mineral elements. In *The Testis*. Vol. 3. A.D. Johnson, W.R. Gomes, and N.L. VanDemark, eds. (Academic Press, NY), pp. 377–481.

- Haines, G.A., Hendry, J.H., Daniel, C.P., and Morris, I.D. (2002). Germ cell and dose-dependent DNA damage measured by the comet assay in murine spermatozoa after testicular X-irradiation. *Biol Reprod* **67**, 854–861.
- Handel, M.A. (1998). *Meiosis and Gametogenesis—Current Topics in Developmental Biology*. Vol. 37 (Academic Press, NY).
- Hawley, R.S. (1988). Exchange and chromosomal segregation in eukaryotes. In *Genetic Recombination*. R. Kucherlapati and G. Smith, eds. (American Society of Microbiology, Washington, DC), pp. 497–527.
- Hilderbrand, D.C., Der, R., Griffin, W.T., and Fahim, M.S. (1973). Effect of lead acetate on reproduction. *Am J Obstet Gynecol* **115**, 1058–1065.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (1987). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Supplement 7. Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs* (IARC Scientific Publications, Lyon, France), pp. 100–106.
- Itokawa, Y., Abe, T., and Tanaka, S. (1973). Bone changes in experimental chronic cadmium poisoning: radiological and biological approaches. *Arch Environ Health* **26**, 241–244.
- Jadhav, S.H., Sarkar, S.N., Patil, R.D., and Tripathi, H.C. (2007). Effects of subchronic exposure via drinking water to a mixture of eight water-contaminating metals: a biochemical and histopathological study in male rats. *Arch Environ Contam Toxicol* **53**, 667–677.
- Jana, K., Jana, S., and Samanta, P.K. (2006). Effects of chronic exposure to sodium arsenite on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: possible an estrogenic mode of action. *Reprod Biol Endocrinol* **4**, 9. doi: 10.1186/1477-7827.
- Jha, A.N., Noditi, M., Nilsson, R., and Natarajan, A.T. (1992). Genotoxic effects of sodium arsenite on human cells. *Mutat Res* **284**, 215–221.
- Jianhua, Z., Lian, X., Shuanlai, Z., Juan, D., and Shuanxi, Y. (2006). DNA lesion and *Hprt* mutant frequency in rat lymphocytes and V79 Chinese hamster lung cells exposed to cadmium. *J Occup Health* **48**, 93–99.
- Koizumi, T., and Li, Z.G. (1992). Role of oxidative stress in single-dose, cadmium induced testicular cancer. *J Toxicol Environ Health* **37**, 25–36.
- Lafuente, A., Márquez, N., Pérez-Lorenzo, M., Pazo, D., and Esquifino, A.I. (2000). Pubertal and postpubertal cadmium exposure differentially affects the hypothalamic-pituitary-testicular axis function in the rat. *Food Chem Toxicol* **38**, 913–923.
- Luo, J.H., Qiu, Z.Q., Shu, W.Q., Zhang, Y.Y., Zhang, L., and Chen, J.A. (2009). Effects of arsenic exposure from drinking water on spatial memory, ultra-structures and NMDAR gene expression of hippocampus in rats. *Toxicol Lett* **184**, 121–125.
- Magos, L. (1991). Epidemiological and experimental aspects of metal carcinogenesis: physicochemical properties, kinetics, and the active species. *Environ Health Perspect* **95**, 157–189.
- Massanyi, P., Lukac, N., Makarevich, A.V., Chrenek, P., Forgacs, Z., Zakrzewski, M., Stawarz, R., Toman, R., Lazor, P., and Flesarova, S. (2007). Lead-induced alterations in rat kidneys and testes *in vivo*. *J Environ Sci Health Part A Tox Hazard Subst Environ Eng* **42**, 671–676.
- Meistrich, M.L., Longtin, J., Brock, W.A., Grimes, S.R., and Mace, M.L. (1981). Purification of rat spermatogenic cells and preliminary biochemical analysis of these cells. *Biol Reprod* **25**, 1065–1077.
- Morales, K.H., Ryan, L., Kuo, T.L., Wu, M.-M., Chen, C.-J. (2000). Risk of internal cancers from arsenic in the drinking water. *Environ Health Perspect* **108**, 655–661.
- Mukherjee, A., Sengupta, M.K., Hossain, M.A., Ahamed, S., Das, B., Nayak, B., Lodh, D., Rahman, M.M., Chakraborti, D. (2006). Arsenic contamination in groundwater: a global perspective with emphasis on the Asian scenario. *J Health Popul Nutr* **24**, 142–163.
- Murthy, R.C., Saxena, D.K., Gupta, S.K., and Chandra, S.V. (1991). Lead induced ultrastructural changes in the testes of rats. *Exp Pathol* **42**, 95–100.
- National Research Council (NRC). (1999). *Arsenic in the Drinking Water* (National Academy Press, Washington, DC), pp. 1–310.
- National Research Council. (2001). *Arsenic in Drinking Water. Update* (National Academy Press, Washington, DC).
- NOM-062-ZOO. (1999). Especificación Técnica Para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (SAGARPA).
- NOM-084-STPS. (1994). Higiene Industrial. Medio Ambiente Laboral. Procedimiento General para la determinación de Metales. Método de Espectrofotometría de Absorción Atómica. Dirección General de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Mexico.
- Pařízek, J. (1983). Cadmium and reproduction: a perspective after 25 years. In *Reproductive and Developmental Toxicity of Metals*. T.W. Clarkson, G.F. Nordberg, P.R. Sager, eds. (Plenum Press, NY), pp. 301–313.
- Roels, H.A., Buchet, J.P., Lauwerys, R.R., Bruaux, P., Claeys-Thoreau, F., Lafontaine, A., and Verduyn, G. (1980). Exposure to lead by the oral route and the pulmonary routes of children living in the vicinity of a primary lead smelter. *Environ Res* **22**, 81–94.
- Romieu, I., Carreón, T., López, L., Palazuelos, E., Ríos, C., Manuel, Y., and Hernández-Avila, M. (1995). Environmental urban lead exposure and blood lead levels in children of Mexico City. *Environ Health Perspect* **103**, 1036–1040.
- Romieu, I., Palazuelos, E., Meneses, F., and Hernández-Avila, M. (1992). Vehicular traffic as a determinant of blood-lead levels in children: a pilot study in Mexico City. *Arch Environ Health* **47**, 246–249.
- Sadik, N.A. (2008). Effects of diallyl sulfide and zinc on testicular steroidogenesis in cadmium-treated male rats. *J Biochem Mol Toxicol* **22**, 345–353.
- Sailer, B.L., Jost, L.K., Erickson, K.R., Tajiran, M.A., and Evenson, D.P. (1995). Effects of X-irradiation on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *Environ Mol Mutagen* **25**, 23–30.
- Sakkas, D., Moffatt, O., Manicardi, G.C., Mariethoz, E., Tarozzi, N., and Bizzaro, D. (2002). Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* **66**, 1061–1067.
- Saleha Banu, B., Danadevi, K., Jamil, K., Ahuja, Y.R., Visweswara Rao, K., and Ishaq, M. (2001). *In vivo* genotoxic effect of arsenic trioxide in mice using comet assay. *Toxicology* **162**, 171–177.
- Sanghamitra, S., Hazra, J., Upadhyay, S.N., Singh, R.K., and Amal, R.C. (2008). Arsenic induced toxicity on testicular tissue of mice. *Indian J Physiol Pharmacol* **52**, 84–90.
- Schaumloffel, N., and Gebel, T. (1998). Heterogeneity of the DNA damage provoked by antimony and arsenic. *Mutagenesis* **13**, 281–286.
- Shelby, M.D., Bishop, J.B., Mason, J.M., and Tindall, K.R. (1993). Fertility, reproduction, and genetic disease: studies on the mutagenic effects of environmental agents on mammalian germ cells. *Environ Health Perspect* **100**, 283–291.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., and Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* **175**, 184–191.
- Smith, A.H., Hopenhayn-Rich, C., Bates, M.N., Goeden, H.M., Hertz-Picciotto, I., Duggan, H.M., Wood, R., Kosnett, M.J., and

- Smith, M.T. (1992). Cancer risks from arsenic in drinking water. *Environ Health Perspect* **97**, 259–267.
- Sokol, R.Z., Madding, C.E., and Swerdloff, R.S. (1985). Lead toxicity and the hypothalamic-pituitary-testicular axis. *Biol Reprod* **33**, 722–728.
- Sokol, R.Z., Wang, S., Wan, Y.J., Stanczyk, F.Z., Gentschein, E., and Chapin, R.E. (2002). Long-term, low-dose lead exposure alters the gonadotropin-releasing hormone system in the male rat. *Environ Health Perspect* **110**, 871–874.
- Spanò, M., Bonde, J.P., Hjøllund, H.I., Kolstad, H.A., Cordelli, E., and Leter, G. (2000). Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril* **73**, 43–50.
- Spanò, M., Kolstad, A.H., Larsen, S.B., Cordelli, E., Leter, G., Giwercman, A., and Bonde, J.P. (1998). The applicability of the flow cytometric sperm chromatin structure assay in epidemiological studies. *Asclepios. Hum Reprod* **13**, 2495–2505.
- Stowe, H.D., Wilson, M., and Goyer, R.A. (1972). Clinical and morphological effects of oral cadmium toxicity in rabbits. *Arch Pathol* **94**, 389–405.
- Waalkes, M.P., and Oberdorster, G. (1990). Cadmium carcinogenesis. In *Biological Effects of Heavy Metals*. E.C. Koulkes, ed. (CRC Press, Boca Raton, FL), pp. 129–158.
- Wang, Z., and Rossman, T.G. (1996). The carcinogenicity of arsenic. In *Toxicology of Metals*. L.W. Chang, L. Magos, and T. Suzuki, eds. (CRC Press, Boca Raton, FL), pp. 221–229.
- Watanabe, C., Inaoka, T., Matsui, T., Ishigaki, K., Murayama, N., and Ohtsuka, R. (2003). Effects of arsenic on younger generations. *J Environ Sci Health* **38A**, 129–139.
- World Health Organization (WHO). (1984). *Guidelines for Drinking Water*. Vol. 1. *Recommendations* (WHO, Geneva, Switzerland).
- Xu, B., Chia, S.E., Tsakok, M., and Ong, C.N. (1993). Trace elements in blood and seminal plasma and their relationship to sperm quality. *Reprod Toxicol* **7**, 613–618.
- Yan, H., Carter, C.E., Xu, C., Singh, P.K., Jones, M.M., Johnson, J.E., and Dietrich, M.S. (1997). Cadmium-induced apoptosis in the urogenital organs of the male rat and its suppression by chelation. *J Toxicol Environ Health* **52**, 149–168.

Address reprint requests to:
Martha P. Nava-Hernández, Ph.D.
Departamento de Biología de la Reproducción
Centro de Investigación Biomédica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Coahuila-Torreón
Gregorio A. García 198 Sur, Col. Centro
27200 Torreón, Coahuila
Mexico

E-mail: mpn15@yahoo.com

Received for publication January 15, 2009; received in revised form March 2, 2009; accepted March 2, 2009.