

Efecto de la exposición *in vitro* de espermatozoides humanos a plomo*

Yoeli Méndez López^{1**}, Francisco Báez Contreras¹, Armando Quintero-Moreno²
y Patricia Villamediana Monreal¹

¹Laboratorio de Citogenética. Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. ²Laboratorio de Andrología. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

Recibido: 14-04-11 Aceptado: 30-01-12

Resumen

El plomo es un agente contaminante presente en el ambiente producto de la minería, manufactura industrial y la quema de combustibles fósiles. Se ha observado que individuos expuestos ocupacionalmente a plomo presentaron disfunción de las glándulas sexuales anexas, disminución de la concentración espermática, disminución de la movilidad espermática y alteraciones en el empaquetamiento de la cromatina espermática. El objetivo de este estudio fue el de valorar el efecto de la exposición *in vitro* de espermatozoides humanos a plomo sobre la calidad espermática. Se incubaron suspensiones espermáticas por 24 horas bajo concentraciones de 0; 2,5 y 5 ppm Pb(NO₃)₂, se realizó la valoración de la movilidad y vitalidad espermática, integridad de membrana, reacción acrosómica e integridad de la cromatina espermática. La exposición *in vitro* a plomo aumentó el porcentaje de espermatozoides inmóviles ($p=0,01$), sin embargo, no causó un efecto estadísticamente significativo sobre la vitalidad espermática, integridad de membrana, reacción acrosómica e integridad de la cromatina espermática. *In vitro*, el plomo es capaz de disminuir la movilidad espermática pero no ocasiona alteraciones a nivel de membrana o de la cromatina espermática.

Palabras clave: Plomo, espermatozoides humanos, movilidad espermática, integridad de la cromatina.

In vitro exposure of human sperm to lead

Abstract

Lead is a contaminant agent present in the environment as a product of mining, industrial manufacturing and burning of fossil fuels. It has been observed that individuals occupationally exposed to lead showed dysfunction of the sexual glands, decrease of sperm concentration, decrease of sperm motility and alterations on the sperm chromatin packaging. The aim of this study was to assess the effect of *in vitro* exposure of human sperm to lead on sperm quality. Spermatozoa were incubated for 24 hours under 0, 2.5 and 5 ppm Pb(NO₃)₂ concentrations and motility, vitality, membrane integrity, acrosome reaction and sperm chromatin integrity was

* Trabajo de investigación realizado en el Laboratorio de Citogenética de la Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia.

** Autor para la correspondencia: yoe4_ml@hotmail.com

assessed. Lead *in vitro* exposure increase the percentage of immotile sperm ($p=0,01$), nevertheless, didn't caused a significant effect on sperm viability, membrane integrity, acrosome reaction and sperm chromatin integrity. *In vitro*, lead can cause decrease of sperm motility but doesn't produce alterations on membranes or sperm chromatin.

Key words: Lead, human spermatozoa, sperm motility, chromatin integrity.

Introducción

El plomo es un metal insoluble en agua que se bioacumula en vegetales y organismos acuáticos, especialmente en peces (1). Es considerado un contaminante ambiental, la mayor parte que se encuentra dispersa en el medio ambiente es producto de actividades como la minería, manufactura industrial y la quema de combustibles fósiles. El plomo se utiliza en la fabricación de baterías, municiones, cañerías, soldaduras y láminas de protección para rayos X mientras que su uso como aditivo en la gasolina ha disminuido en las últimas décadas (2, 3).

La incorporación del plomo en mamíferos puede darse por inhalación o absorción a través de la piel y del tracto gastrointestinal, acumulándose en hígado, riñón, médula ósea, sistema reproductivo, sistema nervioso central y hueso, sin presentar una función biológica conocida. Como mecanismos de acción presenta la unión a proteínas afines al zinc, interferencia con el metabolismo de la hemoglobina al unirse a metaloenzimas, alteración del metabolismo del calcio, inhibición la bomba de Na/K, interferencia en el metabolismo de la vitamina D, entre otros (4, 5).

Individuos expuestos ocupacionalmente a plomo presentaron disfunción de las glándulas sexuales anexas, alteración en la apariencia del fluido seminal, disminución de la concentración espermática (6, 7), disminución de la movilidad espermática (8), alteraciones a nivel de membrana (9, 10) y alteraciones en el empaquetamiento de la cromatina espermática (8) lo que conlleva a abortos espontáneos y disminución de la tasa de fertilidad (11).

La mayoría de los estudios que se han realizado sobre la infertilidad masculina con el fin de elucidar los mecanismos bajo los que el plomo ejerce su efecto tóxico se han llevado a cabo *in vivo*, obteniendo resultados de la influencia de este metal sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, tejido testicular y espermatozoides. El objetivo de esta investigación fue identificar el efecto que ejerce el plomo directamente sobre los parámetros espermáticos en un ambiente de condiciones controladas.

Materiales y métodos

Obtención de la muestra

El estudio estuvo basado en un número de 10 muestras de semen, siendo utilizada como criterio de inclusión la normalidad de las mismas de acuerdo a los parámetros establecidos por la Organización Mundial de la Salud. Los participantes fueron individuos voluntarios residentes en el Municipio Maracaibo, Estado Zulia, en edades comprendidas entre 20-30 años, quienes autorizaron la evaluación y tratamiento de las muestras suministradas bajo la protección de la divulgación de las identidades de sus mismos.

La toma de la muestra se realizó por masturbación, luego de 3-5 días de abstinencia sexual, depositándola en un colector estéril. Esta fue llevada en los próximos 20 minutos al Laboratorio de Citogenética de la Facultad Experimental de Ciencias de la Universidad del Zulia para su evaluación (12).

Evaluación seminal

El análisis seminal incluyó evaluación del color, volumen, pH y viscosidad seminal, la concentración, movilidad, morfología, y

vitalidad espermática, bajo los parámetros establecidos por la Organización Mundial de la Salud (12).

Integridad de la membrana plasmática

La evaluación de la integridad de membrana se realizó aplicando el Test Hiposmótico (HOST). En 500 μL de solución hiposmótica (Citrato de sodio al 1%) se colocaron 125 μL de semen y se incubó a 37°C por 30 min. Para medir el hinchamiento espermático se procedió a observar bajo el microscopio de contraste de fase a 400X, evaluando 100 espermatozoides por muestra. Se consideraron viables aquellos que presentaron cola curvada o enrollada como reacción al cambio osmótico (13).

Reacción acrosómica

Se colocaron 100 μL de una suspensión espermática en un vial, posteriormente se añadieron 100 μL de una solución de Clortetraciclina (20 mM Tris-HCl, 130 mM NaCl, 5 mM L-cisteína y 750 mM CTC) y se mezclaron con cuidado. Luego de 10 segundos se detuvo la reacción por adición de 16 μL de una solución de paraformaldehído al 12,5% v/v en 0,5M de Tris-HCl, las muestras se mantuvieron a 4°C en la oscuridad hasta su evaluación dentro de las 24h posteriores a la preparación. Se evaluaron 100 espermatozoides por muestra. Los espermatozoides fueron clasificados como no capacitados (NC), aquellos que presentaron fluorescencia verde brillante distribuida uniformemente en la cabeza del espermatozoide; como capacitados (C), aquellos que presentaron la región acrosomal verde fluorescente y región postacrosomal oscura; y como acrosoma reaccionado (AR), aquellos que presentaron la cabeza del espermatozoide teñida parcialmente de verde fluorescente o verde en la región postacrosomal (14).

Compactación de la cromatina espermática

Se realizó un frotis de la suspensión espermática y se dejó secar al aire para proceder

al tratamiento con el kit Dipp-Quick® según lo propuesto por Sousa y col., 2009 (15). Se evaluaron 100 espermatozoides clasificándolos como espermatozoides con cromatina compactada, aquellos débilmente teñidos y como espermatozoides con cromatina descompactada, aquellos fuertemente teñidos.

Fragmentación del DNA espermático

El análisis de la fragmentación del DNA espermático se llevó a cabo bajo la metodología desarrollada por Fernández y col., 2003 (16). Las muestras fueron teñidas con la solución de Wright y se contaron 100 espermatozoides por muestra clasificándolos como espermatozoides sin DNA fragmentado, aquellos con un halo de DNA grande o mediano y como espermatozoides con DNA fragmentado, aquellos con un halo de DNA pequeño, sin halo o degradados.

Diseño experimental

Luego de colectadas y transportadas las muestras al laboratorio se procedió a realizar la evaluación seminal, evaluación de la integridad de la membrana plasmática, evaluación de la capacitación espermática y reacción acrosómica, evaluación de la compactación de la cromatina espermática y evaluación de la fragmentación del DNA espermático.

Seguidamente, se tomaron tres alícuotas de una concentración de 5×10^6 espermatozoides/mL, una de éstas se empleó como control mientras que las dos restantes se emplearon para realizar el tratamiento con concentraciones de 2,5 y 5 ppm $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (17). Las muestras fueron incubadas por 24 horas en una atmósfera de 5% CO_2 en aire saturado de humedad y a una temperatura de 37°C en medio definido modificado (mDM) desarrollado por Brackett y Oliphant, 1975 y modificado por Younis, 1991 (18).

Luego de realizado el tratamiento se procedió a evaluar la movilidad, vitalidad, integridad de membrana plasmática, capa-

citación espermática y reacción acrosómica, compactación de la cromatina espermática y fragmentación del DNA espermático.

Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como media \pm desviación estándar. El análisis estadístico fue realizado con el programa SAS (19) mediante el Procedimiento Lineal General (PROC GLM) y el estadístico LSMEANS. El nivel de significancia aceptado fue de $p \leq 0,05$.

Resultados

Los resultados obtenidos evidenciaron que la exposición de espermatozoides humanos a $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ durante un período de 24 horas ocasionó un aumento significativo en el porcentaje de espermatozoides inmóviles a una concentración de 5 ppm ($p < 0,01$), mientras que una concentración de 2,5 ppm $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ no causó efecto sobre la movilidad espermática (tabla 1).

Por otro lado, la vitalidad espermática, integridad de membrana y reacción acrosómica no se vieron afectadas tras la exposición a ambas concentraciones de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (tabla 1).

De modo similar, la evaluación del material nuclear indica que la exposición de espermatozoides humanos *in vitro* a $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ no causa un efecto significativo sobre la integridad de la cromatina espermática o sobre la fragmentación del DNA espermático. Los datos obtenidos pueden observarse en la tabla 2.

Discusión

Durante los últimos años se ha reportado el incremento de la infertilidad masculina especialmente en trabajadores ocupacionalmente expuestos a metales pesados. Se ha observado que trabajadores en contacto continuo con fuentes de plomo presentan alteraciones a nivel del sistema reproductivo, lo que se ve reflejado en la disminución de la calidad espermática (6, 9, 20).

Tabla 1
Efecto del $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ sobre los parámetros espermáticos tras 24 horas de incubación

	Control	Pb 2,5 ppm	Pb 5 ppm
Movilidad			
Rápidos	1,3 \pm 2,2	2,6 \pm 3,1	1 \pm 1
Moderados	30 \pm 20,4	28,4 \pm 17,4	23,7 \pm 20,1
Lentos	13,2 \pm 6,5	10,3 \pm 5	8,6 \pm 6,8
<i>In situ</i>	21,8 \pm 13,3	20,6 \pm 8,3	18,5 \pm 6,2
Inmóviles	33,2 \pm 16,1 ^a	37,8 \pm 19,7 ^{a,b}	48 \pm 20,7 ^b
Vitalidad			
Muertos	58,2 \pm 16,5	52,7 \pm 21	62 \pm 14,9
Integridad de membrana			
No reaccionados	51,3 \pm 16,9	52,7 \pm 17,9	47,3 \pm 21
Reacción acrosómica			
Acrosomas reaccionados	51,5 \pm 12,9	55,8 \pm 9,2	52,4 \pm 10,3

Superíndices distintos en las filas indican diferencias significativas ($p < 0,01$). Media \pm DE.

Tabla 2
Efecto del $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ sobre el material nuclear tras 24 horas de incubación

	Control	Pb 2,5ppm	Pb 5ppm
Integridad de la cromatina espermática			
Descompactados	91 ± 5	89,2 ± 8,2	87,4 ± 8,3
Fragmentación del DNA espermático			
Fragmentados	95 ± 6,1	94,9 ± 5,3	93,4 ± 10,2

Media ± DE.

Los resultados obtenidos en esta investigación indican que la exposición *in vitro* de espermatozoides humanos a plomo provoca la disminución de la movilidad espermática. Tal disminución de la movilidad puede ser causada por el plomo al provocar éste una disminución de la actividad ATPasa, alteración de la fructólisis y modificación del metabolismo de las proteínas, con lo que disminuiría la disponibilidad de nutrientes y metabolitos energéticos (9). Estos resultados concuerdan con los observados *in vitro* por Huang y col. (21), donde evidencian que una concentración de 500 ppm Pb afecta la movilidad de espermatozoides humanos y con los resultados obtenidos de exposición ocupacional, donde se observa que una concentración de 0,002 ppm (2 µg/L) en fluido seminal disminuye la movilidad espermática.

Este estudio coincide con lo observado en investigaciones anteriores sobre la vitalidad espermática e integridad de membrana. Oliveira y col. (22), al inyectar una concentración de 100 ppm (100 mg/kg) PbCl_2 a ratones, observaron que no existía una variación en la vitalidad espermática tras cuatro días de suministro del metal. De igual modo, Huang y col. (21) al exponer espermatozoides humanos a una concentración de 500 ppm Pb observaron que no hubo un incremento en la peroxidación lipídica. Por otro lado, Naha y col. (9), realizaron una evaluación a individuos expuestos a plomo durante 7 a 10 años en una fábrica de baterías, los cuales presentaron una concentración de 0,13 ppm (13 µg/dL) en fluido seminal, observando una disminución de la vitalidad espermática.

Durante la espermatogénesis y el tránsito epididimario, el espermatozoide es dependiente de la actividad antioxidante de los testículos y el epidídimo (23) por lo que la exposición continua a plomo disminuiría la capacidad antioxidante del tracto genital masculino, favoreciendo la peroxidación lipídica y la disminución de la vitalidad espermática. Posiblemente *in vitro*, la capacidad protectora de las enzimas antioxidantes espermáticas no se vio sobrepasada durante el tiempo de exposición a plomo utilizado en este estudio.

Contrario a lo reportado por Benoff y col. (17), quienes valoraron la reacción acrosómica tras incubar espermatozoides humanos en presencia de una concentración de 5 ppm (5180 µg/L) de acetato de plomo observando un aumento en la reacción acrosómica espontánea, los resultados de esta investigación no evidenciaron incremento en el desarrollo de la reacción acrosómica. Se ha documentado que el plomo es capaz de bloquear los canales de Ca dependientes de voltaje (CCDV) inhibiendo el influjo de Ca y el desarrollo de la reacción acrosómica (24).

Estudios epidemiológicos llevados a cabo en poblaciones ocupacionalmente expuestas a plomo documentan la presencia de alteraciones en la estabilidad de la cromatina espermática, con un consecuente descenso de la fertilidad (8). Este trabajo sugiere que el $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ *in vitro* no es capaz de alterar la estructura de la cromatina espermática.

Los últimos avances en el entendimiento del mecanismo de acción del plomo

sobre la estabilidad de la cromatina espermática apuntan a que el efecto de este metal sobre el material nuclear es dependiente del sitio de incorporación al espermatozoide en el tracto genital masculino. De esta manera, la incorporación de plomo durante el tránsito epididimario produce un aumento de la condensación de la cromatina espermática, mientras que la incorporación de este metal en el parénquima testicular produce descompactación de la cromatina (25). Sin embargo, un estudio realizado por Oliveira y col. (22) no evidenció cambio alguno en la estructura de la cromatina espermática al inyectar 100 ppm (100 mg/kg) $PbCl_2$ a ratones.

Aún cuando la vitalidad, integridad de membrana, reacción acrosómica e integridad de la cromatina espermática no se ven afectadas por el plomo bajo las concentraciones estudiadas, la disminución de la movilidad espermática es considerada como un factor influyente en el deterioro de la calidad espermática, lo que soporta las investigaciones anteriormente realizadas donde califican al plomo como un metal pesado que altera el potencial fecundante del hombre. Resulta necesario profundizar en el estudio sobre la dinámica de la compactación del DNA a lo largo del conducto epididimario y sobre los mecanismos celulares involucrados en la alteración de parámetros indicadores de la calidad espermática bajo la presencia de agentes tóxicos como el plomo.

Agradecimiento

Se agradece a la División de Investigación de la Facultad Experimental de Ciencias de la Universidad del Zulia por su contribución para la realización de esta investigación (FDI: 02-2009).

Referencias bibliográficas

1. INSHT, Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. **Fichas Internacionales de Seguridad Química. Plomo**. Ministerio del Trabajo e Inmigración, España. <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/FISQ/Ficheros/0a100/nspn0052.pdf> Fecha de consulta: 14/03/2011.
2. SÁNCHEZ J., SANZ M., APELLANIZ A., PASCUAL A. **S.E.S.L.A.P.** 1 (2): 5-8. 2000.
3. ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Register. **Toxicological Profile for Lead**. U.S. Department of Health and Human Service. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=96&tid=22> 14/03/2011.
4. CORTEZ-LUGO, M., TELLEZ-ROJO M., GÓMEZ-DANTE H., HERNÁNDEZ-ÁVILA M. **Salud Publ Mex** 45 (2): 196-202. 2003.
5. VALDIVIA M. **Rev Soc Peru Med Interna** 18 (1): 22-27. 2005.
6. NAHA N., CHOWDHURY A. **Indian J Occup Environ Med** 9 (3): 118-123. 2005.
7. EL-RAHEEM T., SELIM A. **J Pan Arab League of Dermatology** 19 (3): 39-51. 2008.
8. HERNÁNDEZ-OCHOA I., GARCÍA-VARGAS G., LÓPEZ-CARRILLO L., RUBIO-ANDRADE M., MORÁN-MARTÍNEZ J., CEBRIÁN M., QUINTANILLA-VEGA B. **Reprod Toxicol** 20: 221-228. 2005.
9. NAHA N., BHAR R., MUKHERJEE A., CHOWDHURY A. **Indian J Physiol Pharmacol** 49 (2): 153-162. 2005.
10. KASPERCZYK A., KASPERCZYK S., HORAK S., OSTALOWSKA A., GRUCKA-MAMZARC E., ROMUK E., OLEJEK A., BIRKNER, E. **Toxicol Appl Pharmacol** 228 (3): 378-384. 2008.

11. CHOWDHURY A. *Al Ameen J Med Sci* 2 (2): 37-42. 2009.
12. WHO, World Health Organization. **WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen**. WHO Press, (Suiza). 5ta Edición. 7-102. 2010.
13. GIRALDO N., CORREA J., VÁSQUEZ N. *Revista CES* 2 (2): 8-16. 2006.
14. VALERIS R., VILLAMEDIANA P., QUINTERO A., PARRA O., SANDOVAL J., GHEBREHIWET B. *Rev Cient* 18 (1): 22-27. 2008.
15. SOUSA A., TAVARES R., VELEZ J., FIGUEIREDO H., ALMEIDA V., ALMEIDA-SANTOS T., RAMALHO-SANTOS J. *Hum Reprod* 24 (1): 28-36. 2009.
16. FERNÁNDEZ J., MURIEL L., RIVERO M., GOYANES V., VAZQUEZ R., ALVAREZ J. *J Androl* 24 (1): 59-66. 2003.
17. BENOFF S., CENTOLA G., MILLAN C., NAPOLITANO B., MAUMAR J., HURLEY I. *Hum Reprod* 18 (2): 374-383. 2003.
18. YOUNIS A., ZUELKE K., HARPER K., OLIVEIRA M., BRACKETT B. *Biol Reprod* 44: 1177-1182. 1991.
19. SAS, Statistical Analysis System Institute. 2001. *Sas/stat user's guide*, 8.2 edition. Cary, NC. USA.
20. NAHA, N., MANNA B. *Kathmandu Univ Med J* 5 (17): 85-94. 2007.
21. HUANG Y., TSENG W., LIN T. *J Toxicol Environ Health A* 62 (4): 259-267. 2001.
22. OLIVEIRA H., SPANÒ M., SANTOS C., PEREIRA M. (b). *Cell Biol Toxicol* 25: 341-353. 2009.
23. HAMMADEH M., FILIPPOS A., HAMAD M. *IJFS* 3 (3): 87-110. 2009.
24. FÉLIX R., LÓPEZ-GONZÁLEZ I., MUÑOZ-GARAY C., DARSZON A. *Adv Mol Cell Biol* 32: 407-431. 2004.
25. HERNÁNDEZ-OCHOA I., SÁNCHEZ-GUTIÉRREZ M., SOLÍS-HEREDIA M., QUINTANILLA-VEGA B. *Reprod Toxicol* 21: 171-178. 2006.