

ORIGINALES

Contaminación química ambiental y daño espermato génico

Eduardo Bustos-Obregón y Ricardo Hartley

Laboratorio de Biología de la Reproducción. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. Santiago. Chile.

RESUMEN

Objetivos: El objetivo de la presente revisión es estudiar el daño reproductivo masculino ocasionado por contaminación química ambiental, en particular la debida a agropesticidas.

Métodos: Se presenta un modelo experimental en ratones intoxicados con organofosforados y el interés de la lombriz de tierra (*Eisenia foetida*) como bioindicador de polución del terreno a través del estudio del daño reproductivo ocasionado por organofosforados.

Resultados: Tanto en ratones como en lombrices, el daño espermato génico se manifiesta por el descenso en el recuento espermático, alteraciones en la calidad de la cromatina y aumento de la apoptosis de las células espermato génicas. Estas alteraciones se revierten parcialmente por la adición de melatonina a los terrarios tratados con pesticidas.

Conclusiones: Las alteraciones ocasionadas por la intoxicación con organofosforados en ratón sugieren un posible deterioro de la fertilidad a mediano y largo plazo, en tanto que las observadas en la lombriz, junto con ser indicadores apropiados de la contaminación del terreno, destacan a este organismo como una eficiente especie biosentinel. Dado que la melatonina disminuye el daño, es posible postular que éste se debe fundamentalmente al aumento de especies reactivas del oxígeno ocasionado por el pesticida.

Palabras clave: Contaminación química. Agropesticidas. Daño espermato génico.

ABSTRACT

Environmental chemical contamination and spermatogenic damage

Objectives: The objective of the current review was to study the male reproductive damage caused by environmental chemical contamination, especially that due to agropesticides.

Methods: An experimental animal model in mice, intoxicated with organophosphorus compounds is presented. The Californian red earthworm (*Eisenia foetida*) was analyzed as a bioindicator of chemical contamination through evaluation of the reproductive damage produced by organophosphorates.

Results: In both mice and earthworms spermatogenic damage was evidenced by a reduced sperm count, alterations in chromatin quality, and increased apoptosis of spermatogenic cells. These changes were partially reverted by adding melatonin to the treated cultures.

Conclusions: The changes elicited by intoxication with organophosphates in mice suggest impaired fertility in the mid- and long-term. The changes verified in the earthworm were valid indicators of chemical ground pollution, thus pointing to this organism as an efficient biosentinel species. Given that melatonin decreased the damage, these alterations could mainly be due to an increase in reactive oxygen species caused by the toxic activity of the pesticide.

Key words: Chemical contamination. Agropesticides. Spermatogenic damage.

Correspondencia: Dr. E. Bustos-Obregón.
Laboratorio de Biología de la Reproducción.
Facultad de Medicina. Universidad de Chile.
Casilla 70061. Santiago 7. Chile.
Correo electrónico: ebustos@med.uchile.cl

INTRODUCCIÓN

En el actual mundo industrializado, y también en los países en desarrollo, hay una creciente preocupación por el aumento de la contaminación química ambiental y el efecto nocivo que ésta puede ocasionar en la reproducción animal y humana^{1,2}.

Nuestro interés se centra en el compromiso del factor masculino, dado que muchas de estas sustancias tienen acción como tóxicos testiculares, correspondiendo principalmente a riesgo laboral (uso de agropesticidas) o consumo de fármacos o medicamentos sin control adecuado.

Hay alrededor de 100.000 productos químicos de uso habitual, y anualmente se manufacuran del orden de 200 millones de toneladas. Algunos productos han sido designados como “contaminantes emergentes”, porque se sospecha su toxicidad, aunque aún no hay ensayos suficientes. Una parte de los contaminantes actúan como disruptores endocrinos, y su efecto deletéreo se ejerce por alteración del eje hipotálamo-hipófisis-testículo, o por acciones que modifican otros sistemas regulatorios orgánicos (inmunológico, nervioso)³.

Debido al alto número de especies químicas contaminantes, y por razones de costes, muy pocas de ellas se han analizado respecto a su toxicidad reproductiva o durante el desarrollo, como lo muestran los porcentajes presentados en la tabla 1.

Aun cuando muchos tóxicos, como por ejemplo agroquímicos del grupo de los organofosforados, han sido declarados no utilizables por el alto riesgo que representan para la salud humana y animal, su uso ilegal o no controlado sigue constituyendo un serio problema (fig. 1).

La acción de distintos tóxicos se ejerce a diferentes niveles del sistema reproductivo masculino (fig. 2), lo que complica el análisis del daño reproductivo.

Nuestro laboratorio presenta aquí un modelo animal (ratón)¹ de análisis del daño testicular ocasionado por organofosforados, y un ejemplo de que este daño se puede monitorizar por alteraciones similares registradas en un organismo biocentinela de contaminación ambiental del suelo, como lo es la lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*)⁴.

MÉTODOS

Modelo ratón⁵

Se utilizan ratones de la cepa CF-1 adultos jóvenes (3 meses de edad), mantenidos en bioterio con régimen de luz 12L/12D, alimentados con pellet comercial y

TABLA 1. Estudios de toxicidad reproductiva o del desarrollo

| Sustancia | Porcentaje analizado |
|-----------------------|----------------------|
| Pesticidas | 34 |
| Cosméticos | 22 |
| Medicamentos | 45 |
| Aditivos alimentarios | 20 |

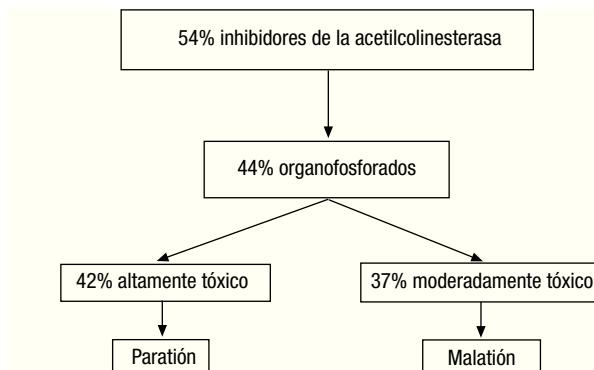


Figura 1. Intoxicaciones agudas por plaguicidas en Chile, año 2002.

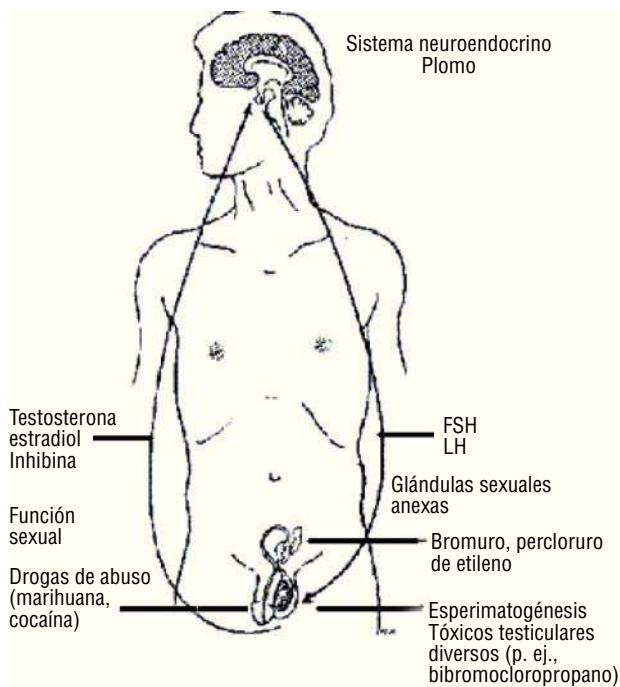


Figura 2. Esquema que indica los sitios de acción y ejemplos de compuestos químicos que a cada nivel interfieren con la función reproductiva del varón.

agua ad líbitum. Grupos de 8 animales controles y 8 inyectados intraperitonealmente con paratión puro (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA), en dosis de 1/3

DL-50, se sacrifican a intervalos de 8,3 días hasta completar 33,2 días (duración de 1 ciclo del epitelio seminífero y espermatogénesis completa). Se realiza análisis histopatológico de cortes de testículo por técnicas de rutina y de immunohistoquímica, utilizando la técnica de TUNEL para detección de apoptosis. Se estudian los espermatozoides de *cauda* epididimaria, usando anaranjado de acridina y observación en epifluorescencia.

Modelo *Eisenia foetida*⁴

En terrarios de condición normal, con humedad controlada y adición de estiércol de equino, se crían ejemplares de *E. foetida* hasta su maduración sexual (presencia evidente de clitelo). En otros terrarios se adicionan dosis crecientes del organofosforado diazinon a intervalos de 1, 7, 10, 15 y 30 días. Mediante técnicas morfológicas se examina la morfología gonal (*E. foetida* es un organismo hermafrodita dicósmico), testicular y la calidad de la cromatina de los espermatozoides obtenidos de la vesícula seminal.

En terrarios de animales intoxicados se agregó también melatonina (en dosis de 10 mg/kg de tierra), reconocido agente neutralizador de especies reactivas del oxígeno, para analizar su efecto protector.

RESULTADOS

Ratón⁵

En la bibliografía hemos propuesto un modelo de ensayo en ratones, útil para analizar el daño tóxico del testículo frente a contaminación con agropesticidas organofosforados. Así se ha comprobado que 1 dosis única de paratióxido ocasiona disminución del recuento de espermatozoides en cola del epidídimo, lo que implica daño de las células espermatogénicas en proliferación en el testículo⁶, en observaciones hechas durante el período de espermatogénesis completo (33,2 días en el ratón)^{7,8}. Igualmente incrementa la necrospermia y teratozoospermia⁹, principalmente del flagelo, apareciendo células apoptóticas y vacuolización del epitelio seminífero, situación que no se recupera completamente aun a los 50 días postexposición¹⁰.

También hay daño de la cromatina, con espermatozoides aneuploides, que muestran viraje metacromático en epifluorescencia con la tinción de anaranjado de acridina, lo que demuestra ADN presente en forma monofilar⁷.

El metabolito paraoxón ha demostrado ser igualmente tóxico, y todavía más los preparados comerciales de paratióxido o malatióxido de uso agrícola.

*Eisenia foetida*⁴

En la figura 3 se presentan los resultados del recuento de espermatozoides de *E. foetida*, expresado en miles, para cada intervalo de tiempo en presencia de distintas dosis de organofosforados (diazinón), con o sin adición de melatonina, y su comparación con los controles. Se observa disminución del recuento con las dosis más altas de diazinón, y un efecto protector, aunque sin alcanzar los valores control, en los animales tratados con melatonina.

La viabilidad de los individuos también demuestra el efecto protector de melatonina, ya que la sobrevida de éstos se asemeja al control, registrándose alta mortalidad dependiente de la dosis en los gusanos tratados con diazinón (tabla 2).

DISCUSIÓN

Hay numerosos estudios que analizan los efectos tóxicos de los organofosforados y el testículo como órgano afectado. Dado que la espermatogénesis es un proceso complejo que comprende proliferación y diferenciación celular, el daño y los mecanismos involucrados son difíciles de establecer¹. El daño se ha establecido tanto en ratones adultos como en ratones inmaduros¹¹, en que se constata disminución del diámetro tubular y de la altura del epitelio seminífero. Este efecto puede revertirse parcialmente por la administración de un extracto acuoso de la raíz (tubérculo) de *Lepidium meyenii* (maca), una planta brassicácea que se cultiva en el Altiplano peruano. Esta propiedad ha sido reportada por Gonzales et al (2001 y 2003)^{12,13}, en que dicho extracto protege del daño espermatogénico ocasionado por hipoxia de altura y de los cambios debidos a senescencia de los animales. Nuestro grupo ha observado que el extracto de maca protege de los efectos deletérios para el testículo ocasionados por el malatióxido^{14,15}.

Respecto al uso de la lombriz de tierra como bioindicador de contaminación química del terreno, es posible afirmar que si bien las tasas de supervivencia muestran claramente el impacto de los organofosforados en este organismo, se sabe que este parámetro es menos sensible desde un punto de vista ecotoxicológico, ya que puede haber efectos subletales de importancia. Por lo tanto, crecimiento y reproducción son indicadores que pueden resultar más útiles, como se discute en la bibliografía^{16,17}. Hemos demostrado que el número de cápsulas que se producen y de lombrices que nacen en terrarios expuestos a concentraciones crecientes de paratióxido comercial decrece en relación directa con la concentración del pesticida⁴. Una situación similar se registra respecto a la pérdida de peso observada a los 5, 15 y

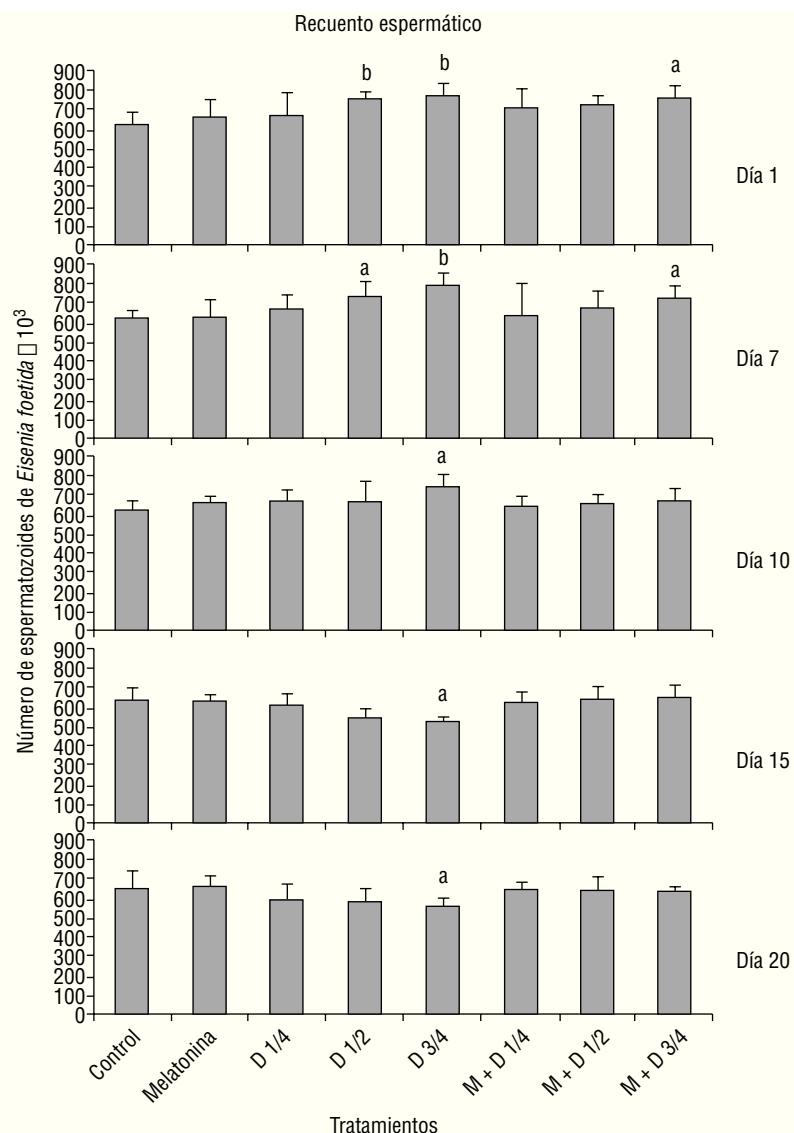


Figura 3. Recuento espermático de *Eisenia foetida* para cada intervalo de tiempo y tratamiento. D representa la aplicación de diazinón, en dosis de 1/4, 1/2 y 3/4 de la DL (dosis letal)-50, y M: melatonina (dosis: 10 mg/kg de tierra). ^ap < 0,05. ^bp < 0,01.

TABLA 2. Porcentaje de supervivencia de *Eisenia foetida*

| Tratamientos | Tiempo de exposición (en días) | | | | |
|--------------|--------------------------------|-----------|------------|------------|------------|
| | Día 1 (%) | Día 7 (%) | Día 10 (%) | Día 15 (%) | Día 30 (%) |
| Control | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Melatonina | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| D 1/4 | 100 | 100 | 93,3 | 90 | 70 |
| D 1/2 | 100 | 97,5 | 80 | 80 | 50 |
| D 3/4 | 100 | 95 | 80 | 75 | 40 |
| M + D 1/4 | 100 | 100 | 100 | 100 | 90 |
| M + D 1/2 | 100 | 100 | 100 | 95 | 80 |
| M + D 3/4 | 100 | 97,5 | 93,3 | 90 | 80 |

M: melatonina (10 mg/kg de tierra); D: diazinón (1/4, 1/2 y 3/4 de dosis letal-50).

30 días después de la exposición, lo que se acompaña de apoptosis detectada por el ensayo de cometa en los núcleos de células germinales de *E. foetida*. El recuento espermático parece ser uno de los marcadores más sensibles, así como la tasa de apoptosis secundaria a la intoxicación, denotando acción genotóxica del pesticida.

En resumen, los parámetros reproductivos de la lombriz son bioindicadores útiles, que denotan contaminación del terreno.

En consecuencia, *E. foetida* resulta ser una especie biocentinela adecuada, en la cual el estudio de parámetros reproductivos refleja fielmente la polución química de su ambiente.

Bibliografía

1. Bustos-Obregón E. Adverse effects of exposure to agropesticides on male reproduction. APMIS. 2001;109 Suppl 103: S233-42.
2. Toppari J. Environmental pollution and testicular function. Int J Androl. 2000;23:8-17.
3. Kelce WR, Gray LE, Wilson EM. Antiandrogens as environmental endocrine disruptors. Reprod Fertil Dev. 1998;10:105-11.
4. Bustos-Obregón E, Iziga R. Pesticide soil contamination mainly affects earthworm male reproductive parameters. Asian J Androl. 2002;4:195-9.
5. Bustos-Obregón E, Valenzuela-Estrada M, Rojas M. Agropesticides and testicular damage. En: Martínez-García F, Regadera J, editors. Male reproduction. A Multidisciplinary overview. Madrid: Churchill Communications; 1998. p. 257-64.
6. Rodríguez H, Bustos-Obregón E. An in vitro model to evaluate the effect of an organophosphoric agropesticide on cell proliferation in mouse seminiferous tubules. Andrologia. 2000;32:1-5.
7. Bustos-Obregón E, González-Hormazabal P. Mice testicular damage elicited by Malathion. Int J Morphol. 2003;21:155-9.
8. Oakberg E. Duration of spermatogenesis in the mouse and the timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. Am J Anat. 1958;99:507-18.
9. Bustos-Obregón E, Díaz O. Ultrastructure of mouse teratozoospermia induced by Parathion. Asian J Androl. 1999;1:79-80.
10. Contreras H, Bustos-Obregón E. Morphological alterations in mouse testis by a single dose of Malathion. J Exp Zool. 1999; 284:355-9.
11. Sobarzo C, Bustos-Obregón E. Acute effect of Parathion on the seminiferous epithelium of immature mice. Rev Chil Anat. 2000;18:1-9.
12. Gonzales GF, Gasco M, Cordova A, Chungkin A, Rubio J, Villegas L. Effect of *Lepidium meyenii* (Maca) roots on spermatogenesis of male rats. Asian J Androl. 2001;3:231-3.
13. Gonzales GF, Rubio J, Chung A, Gasco M, Villegas L. Effect of alcoholic extract of *Lepidium meyenii* (Maca) on testicular function in male rats. Asian J Androl. 2003;5:349-52.
14. Bustos-Obregón E, Costa del Río F, Sarabia L. Morphometric analysis of mice testicular tubules after administration of Malathion and Maca. Int J Morphol. 2007;25:245-8.
15. Bustos-Obregón E, Yucra S, González G. *Lepidium meyenii* (Maca) reduces spermatogenic damage induced by a single dose of Malathion in mice. Asian J Androl. 2005;7:71-6.
16. Paoletti M. The role of earthworm for assessment of sustainability and as bioindicators. Agricult Ecosist Environ. 1999;74: 137-55.
17. Van Gestel C, Dirven-van Breemen M, Baerselman R, Emans H, Janssen J, Postuma R, et al. Comparison of sublethal and lethal criteria for nine different chemicals in standarized toxicity test using the earthworm *Eisenia andrei*. Ecotoxicol Environ Saf. 1992;23:206-20.