



ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

EFFECT OF LEAD ACETATE ON *IN VITRO* HUMAN SPERM HYPERACTIVATION

EFFECTO DEL ACETATO DE PLOMO SOBRE LA HIPERACTIVACIÓN *IN VITRO* DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS

^{1,2}Anderson Oropeza C., ²Adriana Castillo C., ^{1,2}José Ávila P., ^{1,2}Mauricio Gonzáles M.

¹Laboratorio de Biotecnología y Fisiología Animal Biológicas ²Escuela Académica de Biología
Facultad de Ciencias Biológicas - Universidad Ricardo Palma (URP), Av. Benavides 5440 – Santiago de Surco, Lima, Perú.
E-mail: andersonoropezac@gmail.com

The Biologist (Lima), 12 (2), jul-dec: 305-311.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of lead acetate $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ on human sperm hyperactivation *in vitro*. In this prospective study, sperm parameters such as concentration, motility, viability and normal morphology according to WHO criteria were measured. Also, the effect of lead acetate was evaluated using three concentrations ($0.6\mu\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$; $6\mu\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$ and $66\mu\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$). The results show a decrease in vitality, with an LC_{50} for non-hyperactivated sperm equal to $5.58\mu\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$ and $196.16\mu\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$ for hyperactivated sperm. The NOEC and LOEC values for the percent motility and percent mortality for both cases were $0.6\mu\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$ and $6\mu\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$, respectively. In conclusion, these findings suggest that sperm are good bioindicators of contamination by $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ which has toxic effects on the motility and vitality of human spermatozoa.

Keywords: Human seminal analysis, lead acetate, sperm hyperactivation.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del acetato de plomo $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ sobre la hiperactivación espermática *in vitro* en espermatozoides humanos. En este estudio prospectivo, se midieron los parámetros del esperma, tales como la concentración de los espermatozoides, motilidad, viabilidad y morfología de acuerdo con los criterios de la OMS. Además de estos parámetros estándar, se observó el efecto del acetato de plomo utilizando tres concentraciones ($0.6\mu\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$; $6\mu\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$ y $66\mu\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$) sobre la hiperactivación *in vitro* de espermatozoides humanos. Los resultados muestran una disminución de la vitalidad, dando una CL_{50} para espermatozoides no hiperactivados igual a $5.58\mu\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$ y para el caso de espermatozoides hiperactivados fue de $196.16\mu\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$, dando los valores de NOEC y LOEC para el porcentaje de mortalidad y porcentaje de motilidad para ambos casos fueron de $0.6\mu\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$ y $6\mu\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$, respectivamente. En conclusión estos hallazgos sugieren que los espermatozoides son buenos bioindicadores frente a la contaminación por $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ y que este tiene efectos tóxicos sobre la motilidad y vitalidad de los espermatozoides humanos.

Palabras clave: Acetato de Plomo, análisis seminal, hiperactivación espermática, humanos.

INTRODUCCIÓN

La contaminación es un problema real y muy preocupante en nuestros tiempos. Entre los contaminantes más comunes y peligrosos se encuentra el Plomo (Pb), un metal tóxico que también encontramos en forma natural, y que por ser un elemento básico, no se puede disociar o degradar. Existe un amplio espectro de productos derivados del plomo, estos dejan a la población expuesta a sus efectos nocivos para la salud, dejando como única solución, la minimización de su empleo y el control de las emisiones de éste al medio ambiente (CISNS 1999, OIT (2001), ILMC 2006, MINAM 2011, DIGESA 2011, OMS 2014).

Astete *et al.* (2005) investigó sobre los niveles de plomo en comunidades mineras de Cerro de Pasco, encontrando una prevalencia de 84,7% en niños (1-10 años) y 61,5% en madres gestantes que sobrepasaron los 10 $\mu\text{g.dL}^{-1}$ en sangre, nivel mínimo permitido para considerar a una persona con Plumbemia según la OMS.

Cabe señalar que Mendiola *et al.* (2007) encontraron 66,5 $\mu\text{g.dL}^{-1}$ de plomo en semen como valor máximo en profesionales expuestos. Estudios llevados a cabo por Yucra *et al.* (2008), revelaron que la exposición crónica al plomo en el varón incluye reducción de la libido, alteración en la espermatogénesis, dando como resultado una disminución en las tasas de fertilidad. Además Huidobro (2010), expuso las causas de la infertilidad masculina, desde una perspectiva fisiológica abarcando los aspectos toxicológicos entre los cuales encontramos al Pb como uno de los principales metales pesados causantes de este mal.

En el presente trabajo utilizaremos no el elemento plomo exclusivamente, pues su toxicidad es tal que al trabajar con semen directamente correríamos el riesgo de matar a los espermatozoides con el solo contacto de

estos con el metal, sino con una solución de Acetato de Plomo, la cual se encuentra en una variedad de productos de uso cotidiano, de forma aparentemente "inofensiva", como lo son las pinturas, tanto textiles, murales, para el cabello en la industria de la belleza, así como en los juguetes para los niños (Thénard 1830, PUJ 2006, OMS 2014).

De lo expuesto anteriormente, el presente trabajo estudiará los efectos de las diferentes concentraciones de plomo en la hiperactivación *in vitro* de espermatozoides humanos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los insumos químicos utilizados en la siguiente investigación fueron de la marca Sigma -Aldrich® y Merck®.

Material Biológico

Se utilizó un total de ocho muestras de eyaculado humano según las pautas éticas establecidas por el COIMS (2002), las que fueron obtenidas de donantes diferentes que se encontraban en un período de abstinencia sexual de cuatro días, a los que se les tomaron datos como: edad (en promedio de 24 años), actividades físicas (si realiza deporte habitualmente, ocasionalmente o no realizan deporte), entre otros (consumo de bebidas alcohólicas y/o drogas). Estas muestras fueron llevadas y analizadas en el Laboratorio de Biotecnología y Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú.

Análisis Seminal

Los parámetros seminales que se tomó en cuenta en la siguiente investigación fueron según las recomendaciones de la WHO (OMS) (2010) y Cooper *et al.* (2010).

Brevemente, 30 min luego de emitida la muestra, el volumen y la viscosidad fueron

evaluadas usando una pipeta volumétrica descartable; el pH fue evaluado usando una tira indicadora de pH entre valores de 6,5 y 10 (Merck®). La concentración espermática fue calculada en una cámara de Neubauer. Finalmente, la viabilidad de los espermatozoides fue cuantificadas con tinción de eosina al 0,5% bajo microscopio (Leyca®) y la morfología fue evaluada al día siguiente (Toro 2009).

Hiperactividad Espermática

Después del análisis de los eyaculados, se procedió a hacer un lavado, que consistió en mezclar un volumen igual de semen con el medio Sperm preparation (Medicult®). Se centrifugó a 1,500 rpm por 10 min en tubos de centrífuga de 15 ml Falcon®, este proceso se repitió por dos veces, re-suspendiendo con 2 mL de medio utilizado entre cada lavado. Al finalizar el último lavado, el pellet obtenido fue re-suspendido a una concentración de 10 mill de espermatozoides.mL⁻¹ y se pre-incubaron en 5% de CO₂ en la mezcla de aire a 37°C entre 30 y 60 min en tubos eppendorf® de 1,5 mL. Para el proceso de la hiperactivación espermática se utilizó la solución Tyrode libre de Calcio, con adición de albumina de bovino sérica (BSA).

Determinación de las concentraciones del Pb(CH₃COO)₂

Con la finalidad de evaluar el efecto del acetato de plomo Pb(CH₃COO)₂ se utilizaron tres diferentes concentraciones, 0.6 µg.dL⁻¹; 6 µg.dL⁻¹ y 66 µg.dL⁻¹, según lo observado por Mendiola *et al.* (2007). Estas concentraciones fueron adicionadas, antes del proceso de incubación de las muestras. Los parámetros evaluados para la hiperactivación fueron motilidad lineal rápida y vitalidad. Se consideraron dos tratamientos: 1) No hiperactivados (NCP), cuando los espermatozoides se expusieron al contaminante antes de la hiperactivación; y 2) Hiperactivados (HIP), cuando los espermatozoides se expusieron al contaminante luego de la hiperactivación.

Análisis de datos

Para el cálculo de la CL₅₀ a los 30 minutos y los límites de confianza al 95% se utilizó el análisis Probit previa corrección de las mortalidades con la fórmula de Schneider-Orelli (Püntener 1981) debido a que los controles presentaron más del 10% de mortalidad. Para hallar los valores de NOEC (mayor concentración a la cual no se observan efectos) y LOEC (menor concentración a la cual se observan efectos) se utilizó las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney debido a la falta de normalidad de los datos. Todos los análisis se realizaron en el software SPSS v.21 con una confiabilidad del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El efecto de las concentraciones de acetato de plomo sobre la mortalidad corregida de los espermatozoides se muestra en la Fig. 1. El valor de la CL₅₀ para espermatozoides no hiperactivados fue de 5,58 µg.dL⁻¹, con un límite de confianza inferior de 2,96 µg.dL⁻¹ y superior de 10,32 µg.dL⁻¹. Para el caso de espermatozoides hiperactivados, la CL₅₀ fue de 196,16 µg.dL⁻¹, con límites de confianza inferior y superior de 40,16 µg.dL⁻¹ y 55 222,41 µg.dL⁻¹, respectivamente. Los valores de NOEC y LOEC para el porcentaje de mortalidad y porcentaje de motilidad para ambos casos fueron de 0,6 µg.dL⁻¹ (NCP: p=0.52 y p=0.194; HIP: p=0,82 y p=0,98) y 6 µg.dL⁻¹ (NCP: p=0,003 y p>0,001; HIP: p=0,002 y p=0,050), respectivamente.

Estos datos nos indican que si un varón se encuentra contaminado por Pb, sus espermatozoides evidenciarán esto de manera significativa, pues en espermatozoides no hiperactivados la CL₅₀ es mucho menor que en espermatozoides hiperactivados. Podemos tratar de explicar lo que hemos encontrado según señalado por Visconti *et al.* (1998),

Velázquez (2009) y Gonzales & Cornejo (2010), los cuales indican que la hiperactivación del espermatozoide se da en el oviducto de la hembra (en nuestro caso, de la mujer) en el marco del evento conocido como capacitación espermática. Así pues, mientras

no se de este proceso, los espermatozoides son más vulnerables y sensibles a los efectos del Pb en la sangre del varón, caso contrario a lo que se observa cuando los espermatozoides se encuentran hiperactivados en el oviducto femenino.

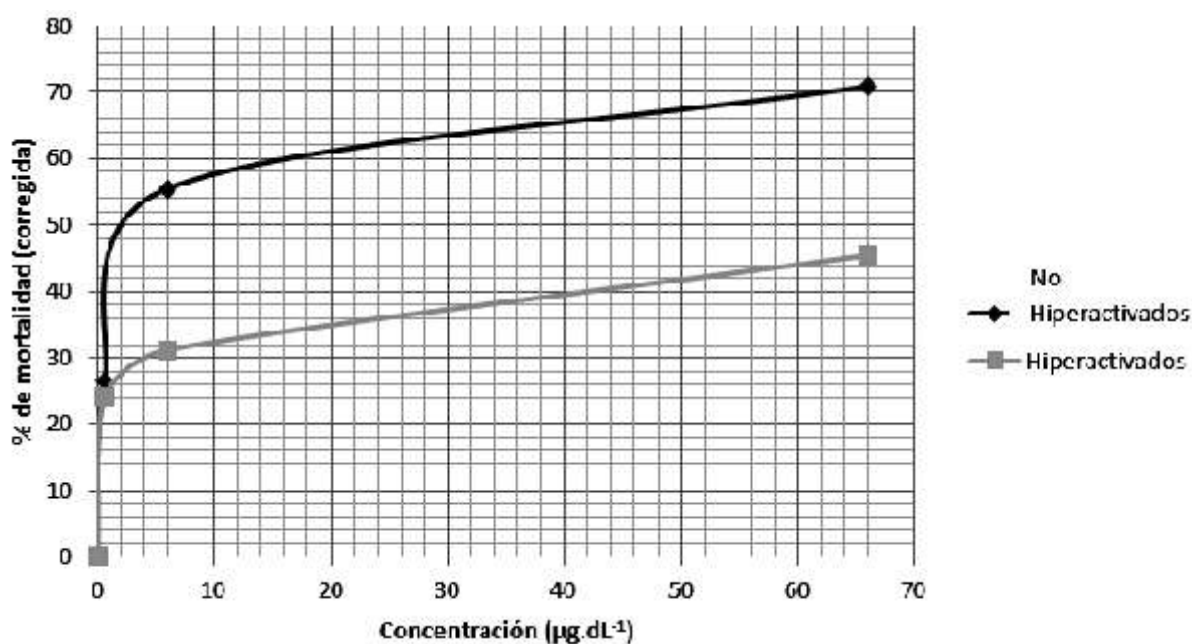


Figura 1. Porcentaje de mortalidad de espermatozoides humanos frente a acetato de plomo.

Los valores normales de la OMS establecen 58% de espermatozoides vivos en las muestras de eyaculado humano, en contraste con nuestros resultados, en los que obtuvimos como vitalidad media 69,6% ($p < 0.001$) en los espermatozoides del grupo control no capacitados, esto puede deberse a la dieta, a la actividad física que hayan realizado o diversos factores externos que no competen a los objetivos de esta investigación.

Los valores normales de la OMS establecen un rango de 3-20% de espermatozoides con motilidad lineal rápida en las muestras de eyaculado humano, en contraste con nuestros resultados, en los que obtuvimos como media 13,33% en los espermatozoides del grupo control no capacitados, lo cual indica que el

valor se encuentra dentro de un rango establecido a nivel mundial.

En el presente trabajo hemos podido calcular la CL_{50} , dándonos así límites para el cantidad de $Pb(CH_3COO)_2$ que se debe de tener en el organismo para lograr el 50% de mortalidad de los espermatozoides. Esto no se hizo en las investigaciones del MTASE (1995), Astete *et al.* (2005), Mendiola *et al.* (2007, 2011) y Yucra *et al.* (2008). Cabe indicar que los trabajos aquí citados tenían como referencia los valores de la OMS de $10 \mu g.dL^{-1}$ de Pb en sangre, que, para fines de nuestro trabajo se contrasta con lo que reporta Mendiola *et al.* (2011), pues no existen diferencias significativas entre las concentraciones de Pb en sangre de las encontradas en plasma

seminal. Astete *et al.* (2005) encontró 66 $\mu\text{g.dL}^{-1}$ en semen, es por esto que elegimos esta como nuestra concentración más alta para desarrollar nuestro trabajo.

Naha *et al.* (2005) y Mendiola *et al.* (2011) encontraron alteraciones morfológicas y motiles significativas en espermatozoides de personas expuestas a plomo, el cual podría disminuir el nivel de antioxidantes en el plasma seminal ocasionando una disminución en la calidad seminal. Awadalla *et al.* (2011) encontraron que las personas con un nivel de plomo en sangre menor a 20 $\mu\text{g.dL}^{-1}$ exhibieron una disminución significativa en el número de espermatozoides y en la condensación de la cromatina. Asimismo, Xu *et al.* (2003) encontraron que valores por Pb por encima de 1 $\mu\text{g.dL}^{-1}$ en el plasma seminal afectaron la calidad espermática de los individuos evaluados, lo cual coincide con nuestro trabajo debido a que la NOEC correspondió a la concentración de 0.6 $\mu\text{g.dL}^{-1}$.

Se puede extrapolar en el caso en el cual un individuo expuesto a este tipo de contaminación por $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, dependiendo de la concentración de este tóxico en su organismo, y específicamente en el eyaculado que este produzca, disminuirá considerablemente la vitalidad de sus espermatozoides si oscila esta entre los valores que hemos calculado, y la motilidad de estos de manera análoga.

Como este es un estudio *in vitro*, no podemos afirmar tajantemente que se desarrolle de igual manera en el oviducto femenino, que es en donde se desarrolla la hiperactivación espermática *in vivo*, pero podemos sugerir que es probable que se produzca de manera similar, si se reúnen las condiciones que hemos simulado en el laboratorio.

Por lo expuesto anteriormente podemos decir que los valores encontrados en el presente trabajo pueden servir como base para el

establecimiento de una legislación que abarque todos los aspectos de la salud reproductiva en lo referente a los niveles permitidos de Pb en el medio y por extensión en el organismo a nivel de gónadas pues el problema de infertilidad en el hombre es un problema multifactorial de vital importancia que no se puede dejar sin un estudio completo en que se establezcan límites para las cantidades tóxicas en el organismo, pues se han encontrado límites muy superiores a los permitidos por la OMS, como señalan García-Algar (2003), Astete *et al.* (2005), Rodríguez & Espinal (2008) y Awadalla *et al.* (2011) que encontraron 12,7 $\mu\text{g.dL}^{-1}$, 10 $\mu\text{g.dL}^{-1}$, 16,5 $\mu\text{g.dL}^{-1}$ y 20,08 $\mu\text{g.dL}^{-1}$ como media entre los individuos que estudiaron, asunto que preocupa en la actualidad, a sabiendas que la OMS ha disminuido el límite de Pb en sangre a menos de 5 $\mu\text{g.dL}^{-1}$ de sangre como figura en la última nota descriptiva N°379 de octubre del 2014 en su página web.

En conclusión el $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, es tóxico para los espermatozoides humanos, afectando la hiperactivación espermática, y además que los espermatozoides humanos son buenos bioindicadores frente a la contaminación por $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ siendo el presente trabajo el primero en demostrar este modelo para tales fines.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Awadalla, J., El-Helaly, M., Gouida, M., Mandour, R., Mansour, M. 2011. Sperm chromatin structure, semen quality and lead in blood and seminal fluid of infertile men. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 2: 27-36.
- Astete, J.; Caceres, W.; Gaztañaga, M.; Lucero, M.; Sabastizagal, I.; Oblitas, T.; Pari, J. & Rodríguez, F. 2005. *Determinación de plomo en sangre y factores asociados en niños y mujeres*

- gestantes de las poblaciones Quiulacocha y Champamarca Cerro de Pasco*. Ministerio de Salud, Centro de Información y Documentación Científica. Serie Informes Técnicos N°30. 16 pp.
- Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS) y la Organización Mundial de la Salud (OMS). 2002. *Pautas éticas internacionales para la investigación biomédica en seres humanos*.
- Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud (CISNS). 1999. *Plomo. Protocolos de Vigilancia Sanitaria Específica*. Ministerio de Sanidad y Consumo, España.
- Cooper, T.; Noonan, E.; Eckardstein, S.; Auger, J.; Baker, H.; Behre, H.; Haugen, T.; Kruger, T.; Wang, C.; Mbizvo, M. & Vogelsong, K. 2010. *World Health Organization reference values for human semen characteristics*. Human Reproduction Update, 16: 231–245.
- Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA). 2011. *Política Nacional de Salud Ambiental 2011 – 2020*. Ministerio de Salud, Perú.
- García-Algar, O.; Elizari, M.; Carné, E.; Valero, S. & Vall, A. 2003. Niveles sanguíneos de plomo en niños de un barrio de Barcelona. *Anales de Pediatría*, 59: 500-502.
- Gonzales, H. & Cornejo, D. 2010. Bases celulares y moleculares de la capacitación espermática. *Revista Scientia*, 12: 73-80.
- Huidobro, C. 2010. Infertilidad Masculina. *Revista Médica, Clínica Las Condes*, 21: 368-375.
- Mendiola, J.; Ten, J.; Araico, F.; Martín-Ondarza, C.; Torres-Cantero, A.; Moreno-Graud, J.; Moreno-Graud, S. & Bernabeu, R. 2007. Metales pesados y calidad seminal en humano. *Revista Internacional de Andrología*, 5:173-80.
- Mendiola, J.; Moreno, J.; Roca, M.; Vergara-Juárez, N.; Martínez-García, M.; García-Saánchez, A.; Elvira-Rendueles, B.; Moreno-Grau, S.; López-Espín, J.; Ten, J.; Bernabeu, R. & Torres-Cantero, A. 2011. Relationships between heavy metal concentrations in three different body fluids and male reproductive parameters: a polit study. *Environmental Health*, 10:6.
- Naha, N.; Bhar, B.; Mukherjee, A. & Chowdhury, R. 2005. Structural alteration of spermatozoa in the persons employed in lead acid battery factory. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 49: 153-162.
- International Lead Management Center (ILMC). 2006. *Manual para el Manejo Ambientalmente Responsable del Plomo*. Industrias Peñoles, S.A. de C.V. México.
- Ministerio del Ambiente. (MINAM) 2011. *Compendio de la Legislación Ambiental Peruana*. Ministerio del Ambiente. Perú.
- Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales de España (MTASE). 1995. NTP 441: *Tóxicos para la reproducción masculina*. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.
- Organización Internacional del Trabajo (OIT). 2001. *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo*. Tercera edición. Capítulo 9. pp. 4-9.
- OMS. 2014. *Nota descriptiva N° 379*. Disponible on-line en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs379/es/>. Fecha de accedido: 26 de noviembre 2014.
- Pontificia Universidad Javeriana (PUJ). 2006. *Acetato de Plomo*. Fichas de seguridad. pp. 1-6.
- Rodríguez, A. & Espinal, G. 2008. Niveles de Plomo en sangre y factores de riesgo asociados en niños de 2 a 10 años en el barrio villa francisca, santo domingo, república dominicana. *Ciencia y Sociedad*, 33: 594-608.
- Thénard, L. 1830. *Tratado completo de*

- química teórica y práctica, 4.* Imprenta de Busseuil y Compañía. pp. 65.
- Toro, A. 2009. Espermograma. *Medicina & Laboratorio*, 15: 145-169.
- Velázquez, G. 2009. Fisiología de la reproducción humana. *Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción*, 1: 120-121.
- Visconti, P.; Galantino-Homer, H.; Moore, G.; Bailey, J.; Ning, X.; Fornes, M.; Kopf, G. 1998. The molecular basis of sperm capacitation. *Journal of Andrology*, 19: 242-248.
- World Health Organization (WHO). 2010. *WHO laboratory manual for examination and processing of human semen*. WHO Library, 5 ed. Switzerland.
- Yucra, S.; Gasco, M.; Rubio, J. & Gonzales, G. 2008. Exposición ocupacional a plomo y pesticidas organofosforados: efecto sobre la salud reproductiva masculina. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 25: 394-402.
- Xu D-X.; Shen H-M.; Zhu Q-X.; Chua L.; Wang Q-N.; Chia S-E. & Ong, C-N. 2003. The associations among semen quality, oxidative DNA damage in human spermatozoa and concentrations of cadmium, lead and selenium in seminal plasma. *Mutation Research*, 534: 155-163.

Received October 30, 2014.
Accepted November 27, 2014.