

31960



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES DE POSGRADO IZTACALA

12 es.

"EFECTOS DE LA EXPOSICION CRONICA A BENCENO Y TOLUENO SOBRE LAS CARACTERISTICAS DEL SEMEN DE HUMANOS"

T E S I S

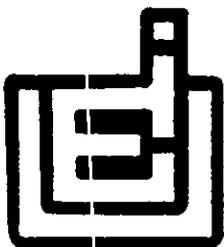
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION) PRESENTA RUTH ARACELI DE CELIS CARRILLO

DIRECTOR: DRA. EN CIENCIAS NIEVES PEDRON NUEVO

265650

LOS REYES IZTACALA, MEXICO

1998



TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAGINACIÓN

DISCONTINUA

## **DIRECTOR:**

### **Doctora en Ciencias Nieves Pedrón Nuevo.**

Investigador Titular C y Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Biología de la Reproducción, Hospital de Gineco-obstetricia "Luis Castelazo Ayala", Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

## **REVISORES:**

### **Doctor en Ciencias Alfredo Feria Velasco**

Investigador Titular C y Director de la División de Patología y Biotecnología Ambiental, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (SEP – CONACyT), Guadalajara, Jalisco.

### **Doctora en Ciencias María Cristina Revilla Monsalve**

Investigador Asociado C; Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Metabólicas, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), México, D.F.

### **Doctora en Ciencias María Eugenia Chavarria Olarte**

Investigador Asociado C; Unidad de Investigación Médica en Biología de la Reproducción, Hospital de Gineco Obstetricia No 4 "Luis Castelazo Ayala", Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), México, D.F.

### **Doctor en Ciencias Guillermo Zúñiga González**

Investigador Asociado B; División de Medicina Molecular; Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Guadalajara, Jalisco.

# **AGRADECIMIENTOS**

Fue posible realizar esta tesis y muchas más cosas GRACIAS a mis padres, José y Dulce María y a mis muy queridos hermanos y sobrinos.

GRACIAS al apoyo y aprecio de mi tutora Nieves Pedrón.

GRACIAS al apoyo, dirección e invaluable ayuda del extraordinario Alfredo Fera.

GRACIAS al apoyo de mis muy apreciados amigos y compañeros Marco y Jorge.

Esta tesis la hice para mi hermosa hija, la pequeña María José.

Quiero además dedicarla a la memoria de José De Celis, mi padre y de Carlos De Celis, mi hermano, quienes seguramente estan mas cerca de mi de lo que yo pueda imaginar.

A mis demás amigos que no son muchos pero que valen como si fueran un millón.

# INDICE

<b>1. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>2</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>2.1. BASES MORFOFISIOLÓGICAS DEL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULINO</b>	<b>3</b>
<b>2.1.1. TESTÍCULO</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2. EPIDÍDIMO</b>	<b>4</b>
<b>2.1.2.1. PROTEÍNAS</b>	<b>6</b>
<b>2.1.2.2. CARNITINA</b>	<b>6</b>
<b>2.1.2.3. LÍPIDOS</b>	<b>7</b>
<b>2.1.2.4. GLICERILFOSFORILCOLINA (GPC)</b>	<b>7</b>
<b>2.1.2.5. CARBOHIDRATOS</b>	<b>7</b>
<b>2.1.2.6. ESTEROIDES</b>	<b>7</b>
<b>2.1.3. CORDÓN ESPERMÁTICO Y CONDUCTO DEFERENTE</b>	<b>8</b>
<b>2.1.4. PRÓSTATA</b>	<b>9</b>
<b>2.1.4.1. FOSFATASA ÁCIDA</b>	<b>11</b>
<b>2.1.4.2. METALES BIVALENTES</b>	<b>11</b>
<b>2.1.4.3. CITRATO</b>	<b>12</b>
<b>2.1.4.4. POLIAMINAS</b>	<b>12</b>
<b>2.1.5. VESÍCULAS SEMINALES</b>	<b>13</b>
<b>2.1.6. ESCROTO</b>	<b>14</b>
<b>2.1.7. PENE</b>	<b>15</b>
<b>2.1.8. URETRA</b>	<b>16</b>
<b>2.1.9. GLÁNDULAS DE COWPER</b>	<b>16</b>
<b>2.2. NEUROENDOCRINOLOGÍA DEL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULINO</b>	<b>18</b>
<b>2.2.1. REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE GnRH Y GONADOTROFINAS</b>	<b>19</b>

2.2.2. FISILOGÍA Y BIOQUÍMICA DE LOS ANDRÓGENOS	20
2.2.3. TRANSPORTE DE TESTOSTERONA Y SU LIBERACIÓN EN LOS TEJIDOS	23
2.2.4. METABOLISMO DE LOS ANDRÓGENOS	24
2.2.5. ACCIÓN DE LOS ANDRÓGENOS	25
2.3. ESPERMATOGÉNESIS	27
2.3.1. FASE PROLIFERATIVA	28
2.3.2. FASE DE CRECIMIENTO	29
2.3.3. FASE DE MADURACIÓN	29
2.3.3.1. FASE MEIÓTICA	30
2.3.3.1.1. MEIOSIS I	30
2.3.3.1.2. MEIOSIS II	32
2.3.3.2. ESPERMIOGÉNESIS	33
2.3.3.2.1. FASE DE GOLGI	34
2.3.3.2.2. FASE DE COFIA	34
2.3.3.2.3. FASE ACROSOMIAL	34
2.3.3.2.4. FASE DE MADURACIÓN	35
2.3.4. ESTADIOS Y ORGANIZACIÓN DE LA ESPERMATOGÉNESIS	37
2.3.5. REGULACIÓN ENDOCRINA DE LA ESPERMATOGÉNESIS	38
2.4. INFERTILIDAD POR CAUSA DE FACTOR MASCULINO	40
3. ANTECEDENTES	44
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	51
5. HIPÓTESIS	52
6. OBJETIVOS	53
6.1. OBJETIVO GENERAL	53
6.2. OBJETIVOS PARTICULARES	53
7. MATERIAL Y MÉTODOS	54
7.1. DISEÑO DEL ESTUDIO	54
7.1.1. UNIVERSO DE TRABAJO	54
7.1.2. SELECCIÓN DE LA MUESTRA	54

7.1.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE LOS OBREROS EXPUESTOS	54
7.1.4. CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN DE LOS OBREROS EXPUESTOS	55
7.1.5. CRITERIOS DE INCLUSIÓN PARA LOS VARONES NO EXPUESTOS	55
7.2. DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS	56
7.2.1. MUESTRAS DE SEMEN	56
7.2.1.1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y pH	56
7.2.1.2. AGLUTINACIÓN ESPERMÁTICA	57
7.2.1.3. CUENTA ESPERMÁTICA	57
7.2.1.4. MOTILIDAD ESPERMÁTICA	57
7.2.1.5. MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA	58
7.2.1.6. VIABILIDAD ESPERMÁTICA	58
7.2.1.7. BACTERIAS Y DETRITUS CELULARES	58
7.2.1.8. LEUCOCITOS	59
7.2.1.9. CÉLULAS GERMINALES INMADURAS CON MICRONÚCLEOS (CGI/Mns)	59
7.2.2. MUESTRAS DE ORINA	60
7.2.2.1. ÁCIDO HIPÚRICO (AH)	61
7.2.2.2. ÁCIDO MANDÉLICO (AM)	61
7.2.3. MUESTREO DEL AIRE AMBIENTAL DE LA FÁBRICA Y OFICINAS	62
7.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	62
<b>8. RESULTADOS</b>	64
8.1. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE TRABAJO	64
8.2. DESCRIPCIÓN DE LOS GRUPOS DE VARONES ESTUDIADOS	64
8.3. PATRÓN DE EXPOSICIÓN DE LOS OBREROS	65
8.4. MUESTRAS DE SEMEN	66
8.4.1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y pH	66
8.4.1.1. VOLUMEN	66
8.4.1.2. VISCOSIDAD	68
8.4.1.3. LICUEFACCIÓN	68

8.4.2. AGLUTINACIÓN	71
8.4.3. CUENTA ESPERMÁTICA	72
8.4.4. MOTILIDAD ESPERMÁTICA	74
8.4.5. MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA	76
8.4.6. VIABILIDAD ESPERMÁTICA	78
8.4.7. CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS	79
8.4.8. LEUCOCITOS	79
8.4.9. CÉLULAS GERMINALES INMADURAS CON MICRONÚCLEOS (CGI/Mns)	80
8.5.0. DIAGNÓSTICOS DE LAS MUESTRAS DE SEMEN	85
8.5. MUESTRAS DE ORINA	87
8.5.1. ÁCIDO HIPÚRICO (AH)	87
8.5.2. ÁCIDO MANDÉLICO (AM)	88
<b>9. DISCUSIÓN</b>	<b>89</b>
<b>10. CONCLUSIONES</b>	<b>98</b>
<b>11. REFERENCIAS</b>	<b>99</b>
<b>ANEXOS</b>	

# INDICE DE TABLAS

<b>TABLA</b>	<b>CONTENIDO</b>	<b>PAG</b>
<b>1</b>	<b>Años de exposición a benceno y tolueno</b>	<b>65</b>
<b>2</b>	<b>Edad de inicio a la exposición a los hidrocarburos</b>	<b>66</b>
<b>3</b>	<b>Características del semen del grupo de obreros expuestos comparados con el grupo de varones no expuestos</b>	<b>67</b>
<b>4</b>	<b>Viscosidad y licuefacción del semen del grupo de obreros expuestos y el grupo de varones no expuestos</b>	<b>69</b>
<b>5</b>	<b>Porcentaje de los diferentes grados de viscosidad de acuerdo al tiempo de exposición a los hidrocarburos</b>	<b>69</b>
<b>6</b>	<b>Porcentaje de los diferentes grados de viscosidad de acuerdo a la edad de inicio a la exposición a los hidrocarburos</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>Capacidad de las muestras de semen para licuarse en relación al tiempo de exposición a benceno y tolueno</b>	<b>70</b>
<b>8</b>	<b>Capacidad de las muestras de semen para licuarse en relación con la edad de inicio a la exposición a los hidrocarburos</b>	<b>71</b>
<b>9</b>	<b>Normozoospermia y alteraciones encontradas en el semen del grupo de obreros expuestos y en el grupo de varones no expuestos</b>	<b>73</b>
<b>10</b>	<b>Porcentaje de CGI/Mns de acuerdo al periodo de exposición en años</b>	<b>84</b>
<b>11</b>	<b>Porcentaje de CGI/Mns de acuerdo a la edad de inicio a la exposición a hidrocarburos</b>	<b>84</b>
<b>12</b>	<b>Normozoospermia y alteraciones encontradas en el semen del grupo de obreros expuestos y en el grupo de varones no expuestos</b>	<b>85</b>
<b>13</b>	<b>Porcentaje de normozoospermia y alteraciones encontradas en el semen de acuerdo al periodo de exposición en años</b>	<b>86</b>
<b>14</b>	<b>Porcentaje de normozoospermia y alteraciones encontradas en el semen de acuerdo a la edad de inicio a la exposición en años</b>	<b>86</b>
<b>15</b>	<b>Concentración de metabolitos urinarios en el grupo de obreros expuestos y el grupo de varones no expuestos</b>	<b>88</b>

## INDICE DE GRÁFICAS

<b>GRÁFICA</b>	<b>CONTENIDO</b>	<b>PAG</b>
1	Efecto del tiempo de exposición sobre la cuenta espermática	73
2	Cuenta espermática de acuerdo a la edad de inicio a la exposición	74
3	Efecto del tiempo de exposición sobre la motilidad espermática	75
4	Motilidad espermática de acuerdo a la edad de inicio a la exposición	76
5	Efecto del tiempo de exposición sobre la morfología espermática	77
6	Morfología espermática de acuerdo a la edad de inicio a la exposición	78
7	Formación de Mns en CGI por el tiempo de exposición	83
8	Formación de Mns en CGI en función de la edad de inicio a la exposición	83

## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>	<b>CONTENIDO</b>	<b>PAG</b>
1	Síntesis de testosterona	21
2	Acción androgénica	25
3	Micronúcleos en células germinales inmaduras (CGI/Mns) en muestras de semen de obreros expuestos a disolventes orgánicos en su medio laboral (3a-3b)	81
	(3c-3f)	82

## RELACIÓN DE ABREVIATURAS

<b>ACGIH</b>	Conferencia Americana de Higienistas Industriales del Gobierno (American Conference of Governmental Industrial Hygienists).
<b>ACTH</b>	Hormona adrenocortitrófica
<b>Ad</b>	Espermatogonia A oscura (dark)
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AH / BEI</b>	Valor limite permisible de ácido hipúrico según la BEI
<b>AH</b>	Ácido hipúrico
<b>AM / BEI</b>	Valor limite permisible de ácido mandélico según la BEI
<b>AM</b>	Ácido mandélico
<b>AMPc</b>	Adenosin monofosfato ciclico
<b>Ap</b>	Espermatogonia A pálida (pale)
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>BEI</b>	Índice de exposición biológica a tóxicos
<b>°C</b>	Grado centígrado
<b>CGI / Mns</b>	Células germinales inmaduras con micronúcleos
<b>CGI</b>	Células germinales inmaduras
<b>CS<sub>2</sub></b>	Disulfuro de carbono
<b>DBCP</b>	Dibromocloropropano
<b>D-R</b>	Complejo dihidrotestosterona-receptor
<b>FSH</b>	Hormona foículo estimulante
<b>g</b>	Gravedad
<b>g/g</b>	Gramos por gramo
<b>GnRH</b>	Hormona liberadora de gonadotrofinas
<b>GPC</b>	Glicerilfosforilcolina
<b>HPLC /UV</b>	Cromatografía de líquidos de alta resolución / luz ultravioleta
<b>IC</b>	Intervalos de confianza
<b>ICSH</b>	Hormona estimulante de las células intersticiales
<b>IGF-1</b>	Factor de crecimiento insulinoide tipo 1

<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	Interleucina $\alpha$
<b>LH</b>	Hormona luteinizante
<b>mg / dl</b>	Miligramos por decilitro
<b>mg</b>	Miligramo
<b><math>\mu</math>g</b>	Microgramo
<b><math>\mu</math>l</b>	Microlitro
<b>MHS-5</b>	Proteína especie específica marcadora del semen de humano
<b>ml</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>Mns</b>	Micronúcleos
<b>mOsmol/l</b>	Miliosmoles por litro
<b>NADPH</b>	Nicotin adenin dinucleótido fosfato reducido
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>PAS</b>	Tinción del ácido peryódico de "Schiff"
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>RM</b>	Razón de momios
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>S<sub>1</sub>, S<sub>b1</sub>, S<sub>b2</sub></b>	Tipos de espermátides en diferentes etapas de diferenciación y maduración y que son morfológicamente distintas entre sí.
<b>S<sub>2</sub>, S<sub>d1</sub>, S<sub>d2</sub></b>	
<b>T<math>\beta</math>BG</b>	Globulina que se une a testosterona
<b>TiM</b>	Medio de aislamiento de células testiculares (testes isolation medium).
<b>T-R</b>	Complejo testosterona-receptor
<b>UFC / ml</b>	Unidades formadoras de colonias por ml
<b>v/v</b>	Volumen por volumen

# 1. RESUMEN

Se estudiaron dos grupos de trabajadores de una fábrica de empaques y mangueras, ubicada en Xalostoc, Estado de México. El primer grupo estuvo conformado por 32 obreros expuestos a una mezcla de hidrocarburos que contenía benceno, etilbenceno (thinner), tolueno y trementina. El segundo grupo estuvo formado por 27 trabajadores del área administrativa de la misma empresa y que no estaban expuestos a hidrocarburos. El objetivo de este trabajo fue investigar las características del semen de obreros que estuvieron expuestos a un patrón excesivo de hidrocarburos aromáticos que se confirmó por la presencia de niveles elevados de metabolitos de benceno y de tolueno en la orina. El promedio de edad de los grupos fue  $26.6 \pm 3.7$  y  $27.4 \pm 5.1$  años, respectivamente. En el grupo de obreros expuestos, 37.5% tenían entre 3 y 5 años de exposición a los hidrocarburos, 34.5% de 6 a 9 años y el restante 28%, más de 10 años de exposición. El 70% de los individuos de este grupo inició su contacto con los hidrocarburos antes de los 20 años. De acuerdo a los criterios del índice de exposición biológica a tóxicos (BEI), todos los obreros expuestos presentaron niveles elevados de ácido hipúrico (AH) ( $AH > 2.5$  g/g de creatinina), en promedio,  $9.8 \pm 1.8$  g/g de creatinina y 94% de éstos presentaron niveles elevados de ácido mandélico (AM) ( $AM > 0.8$  g/g de creatinina), en promedio,  $1.5 \pm 0.3$  g/g de creatinina. Al realizar una comparación entre el semen del grupo de obreros expuestos a hidrocarburos y el semen del grupo de varones no expuestos que trabajaban en la misma empresa, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la viscosidad del semen (RM 14.00,  $p < 0.001$ ), en la capacidad de licuefacción (RM 4.53,  $p < 0.01$ ), en la cuenta espermática ( $13.8 \pm 24.3$  vs  $43.2 \pm 44.5 \times 10^8$  espermatozoides/ml, RM 4.47,  $p < 0.01$ ), en la motilidad espermática ( $21.3 \pm 21.9$  vs  $44.5 \pm 24.7\%$  de motilidad grado III más grado II, RM 8.94,  $p < 0.001$ ), en el porcentaje de espermatozoides con morfología normal ( $28.7 \pm 13.6$  vs  $41.7 \pm 11.4\%$  de formas normales, RM 26.00,  $p < 0.001$ ), en la cantidad de espermatozoides viables ( $80.2 \pm 20.2$  vs  $86.6 \pm 6.5\%$  de espermatozoides vivos,  $p < 0.001$ ) y en la cantidad de células germinales inmaduras con micronúcleos (CGI /Mns) ( $32 \pm 15$  vs  $4 \pm 3\%$  de CGI /Mns,  $p < 0.001$ ). En el grupo de obreros expuestos, 31.3% presentaron oligoastenoteratozoospermia, 15.6% oligoastenozoospermia, 12.5% astenozoospermia, 12.5% astenoteratozoospermia, 6.3% azoospermia y 3.1% teratozoospermia. El número de individuos que presentaron eyaculados con características normales fué mayor en el grupo de varones no expuestos (59.3%) que en el grupo de obreros expuestos (18.8%) (RM 6.3,  $p < 0.001$ ). En conclusión, los obreros expuestos a mezclas de hidrocarburos que contenían benceno y tolueno, presentaron anomalías en la viscosidad y licuefacción del semen, mismas que sugieren alteración de las características fisicoquímicas del plasma seminal. El daño producido en el proceso de espermatogénesis de estos varones expuestos a hidrocarburos puede asumirse por una disminución significativa en la cuenta y en la motilidad espermática, en el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y en la cantidad de CGI /Mns encontradas, con respecto al grupo que no estuvo expuesto. Las alteraciones encontradas en el semen de los obreros expuestos tuvieron en su mayoría, una correlación estadísticamente significativa, tanto con los años de exposición, como con la edad de inicio a la exposición a los hidrocarburos; por lo tanto, los individuos más dañados fueron los que tenían más años de exposición y/o los que iniciaron esta exposición más tempranamente, antes de los 20 años de edad.

## SUMMARY

Two groups of workers at a manufacturing plant for packages and hoses, located in Xalostoc, State of Mexico (Estado de México) were studied. The first group was comprised by 32 workers exposed to a mixture of hydrocarbons containing benzene, ethylbenzene (thinner), toluene and turpentine. The second group consisted of 27 workers from the administrative area of the same company with no history of exposure to hydrocarbons. The objective of this study was to analyze semen characteristics of those workers exposed to an excessive pattern of aromatic hydrocarbons that was confirmed by the presence of high levels of benzene and toluene metabolites in urine. The average age of the groups was  $26.6 \pm 3.7$  and  $27.4 \pm 5.1$  years, respectively. In the group of exposed workers, 37.5% had been exposed to the hydrocarbons for 3 to 5 years, 34.5% between 6 and 9 years and the remaining 28%, over a 10 year exposure period. Approximately 70% of the subjects in this group had their first contact with hydrocarbons before they were 20 years old. Based on the biological exposure index (BEI) to toxic material, all exposed workers had high levels of hippuric acid (HA) ( $HA > 2.5$  g/g of creatinine) of approximately on the average  $9.8 \pm 1.8$  g/g of creatinine. About 94% of these had high levels of mandelic acid (MA) of approximately an average amount of  $1.5 \pm 0.3$  g/g of creatinine ( $MA > 0.8$  g/g of creatinine). When comparing the semen of the group of exposed workers to that of non-exposed workers of the same company, statistically significant differences were found with respect to the viscosity of the semen (RM 14.00,  $p < 0.001$ ), in the liquefaction ability (RM 4.53,  $p < 0.01$ ), in sperm count ( $13.8 \pm 24.3$  Vs  $43.2 \pm 44.5 \times 10^6$  spermatozoa /ml, RM 4.47,  $p < 0.01$ ), on sperm motility ( $21.3 \pm 21.9$  Vs  $44.5 \pm 24.7\%$  of grade III motility plus grade II, RM 8.94,  $p < 0.001$ ), in the percentage of sperm cells with normal morphology ( $28.7 \pm 13.6$  Vs  $41.7 \pm 11.4$  of normal forms, RM 26.0,  $p < 0.001$ ), in the amount of live spermatozoa ( $80.2 \pm 20.2$  Vs  $86.6 \pm 6.5\%$  of live sperm cells,  $p < 0.001$ ) and the amount of immature germ cells with micronuclei (IGC/Mns) ( $32 \pm 15$  Vs  $4 \pm 3\%$  of IGC/Mns,  $p < 0.001$ ). In the exposed group of workers, 31.3% had oligoasthenozoospermia, 15.6% oligoasthenozoospermia, 12.5% asthenozoospermia, 12.5% asthenozoospermia, 6.3% azoospermia and 3.1% teratozoospermia. The number of subjects with normally characteristic ejaculations was greater in the group of non-exposed males (59.3%) than in the group of exposed workers (18.8%) (RM 6.3,  $p < 0.001$ ). In conclusion, workers exposed to mixtures of the hydrocarbons containing benzene and toluene, had abnormalities in the viscosity and liquefaction of the semen, suggesting changes in the physical-chemical characteristics of the seminal plasma. The damage produced in the spermatogenesis process of these men exposed to hydrocarbons can be assumed to be in terms of significant decrease in the number of sperm and their motility, the percentage of morphologically normal sperm and in the amount of IGC/Mns found with respect to the non-exposed group. The changes found in the semen of workers exposed to hydrocarbons had in the majority, a statistically significant correlation with both the number of years of exposure as well as with the age when initially exposed to the hydrocarbons. Therefore, those individuals most damaged were those with a greater number of years exposed and/or those exposed at an earlier age, before 20 years old.

## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1. BASES MORFOFISIOLÓGICAS DEL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULINO**

El sistema reproductor masculino está formado por una serie de órganos que en general derivan de zonas especializadas del mesodermo durante el desarrollo embrionario y comprenden a los testículos, epidídimos, conductos deferentes, próstata y vesículas seminales como órganos sexuales internos. Además incluye al pene y al escroto, como órganos sexuales externos. A continuación se describen los datos morfofuncionales más importantes de estos órganos. Se mencionan por separado algunos datos de la uretra y de las glándulas de Cowper por poseer características especiales relacionadas con las funciones reproductivas del hombre.

#### **2.1.1. TESTÍCULO**

El testículo del adulto tiene un tamaño promedio de aproximadamente 4 x 3 x 2.5 cm. Tiene una cubierta gruesa, llamada túnica albugínea, que se invagina ligeramente en su porción posterior dentro del testículo para formar el cuerpo de Hihmore (mediastino testicular). Este mediastino fibroso envía tabiques hacia dentro para formar compartimientos testiculares (cerca de 250), donde se alojan los túbulos seminíferos (Tanagho, 1992).

El testículo está cubierto por delante y a los lados por la hoja visceral de la membrana serosa o túnica vaginal, la cual se continúa con la hoja parietal, que separa al testículo de la pared escrotal (Eroschenko, 1993 ). En el polo superior del testículo se encuentra la hidátide o apéndice testicular, que es un pequeño cuerpo pedunculado o sésil, de aspecto semejante a la hidátide del epidídimo. El testículo está estrechamente adherido posterolateralmente al epidídimo, en particular en sus polos superior e inferior.

Cada lóbulo o compartimiento testicular contiene de uno a cuatro túbulos seminíferos considerablemente flexuosos, que miden aproximadamente 60 cm de longitud cada uno. Estos convergen para formar los túbulos rectos, la rete testis y los conos eferentes hacia el cuerpo de Highmore en donde convergen para formar el epidídimo.

Cada túbulo seminífero tiene una membrana basal que da sostén a las células seminíferas que son de dos tipos: células de Sertoli y células de la línea espermatogénica. El estroma entre los túbulos seminíferos contiene tejido conjuntivo laxo en el que están incluidas las células intersticiales de Leydig, vasos sanguíneos y linfáticos y escasas fibras nerviosas (Matsumoto, 1996). El tejido conjuntivo del testículo se continúa con el tejido conjuntivo del mediastino. En este último, Los túbulos seminíferos de cada lóbulo testicular convergen para formar los túbulos rectos. Estos túbulos son cortos, estrechos y formados por epitelio cuboidal. Estos túbulos se continúan con la *rete testis*, que se localiza en el tejido conectivo del mediastino. Esta *rete testis* es irregular y sus túbulos se anastomosan con la lámina ancha, que está formada por una sola capa de epitelio cuboidal. Estos túbulos comienzan a ensancharse al acercarse a los conductos eferentes. Estos conductos, denominados conos eferentes, son mas bien rectos, pero al continuarse con la cabeza del epidídimo comienzan a ser muy contorneados (Eroschenko, 1993).

La fisiología y regulación de la función testicular se abordan en los capítulos de Neuroendocrinología y Espermatogénesis.

### 2.1.2. EPIDÍDIMO

El epidídimo está situado posterolateralmente al testículo y queda más cerca de éste en su polo superior. Su polo inferior se halla unido al testículo por tejido fibroso. El conducto deferente se localiza por detrás y por dentro del epidídimo y forma parte del cordón espermático (*vide infra*).

El epidídimo está cubierto exteriormente por serosa. El conducto del epidídimo está cubierto en su interior, por epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado en toda su longitud y su pared está formada por tejido conjuntivo y fibras musculares lisas.

El epidídimo está formado por un conducto considerablemente flexuoso, que en su polo inferior (cola del epidídimo) se continúa con el conducto deferente (Eroschenko, 1993). A menudo se observa en el polo superior del epidídimo, un apéndice; éste es un cuerpo quístico que en algunos individuos es pedunculado, pero en otros es sésil, que se denomina **hidátide del epidídimo**.

Por mucho tiempo, el epidídimo fue considerado como un simple conducto en el cual los espermatozoides son almacenados por cierto tiempo y luego transitan en el momento de la eyaculación. Numerosos estudios realizados principalmente en animales y algunos en humanos, han demostrado que en el epidídimo se realizan las etapas finales del desarrollo y maduración de los espermatozoides (Amann, 1980; Hinton, 1981). Es en esta estructura donde estas células completan su maduración morfológica y adquieren la capacidad de moverse por sí solas con movimiento progresivo rápido (Shilon, 1978), aunque más recientemente se haya demostrado que la maduración en el epidídimo no es indispensable, ya que los espermatozoides que no han sido almacenados ni madurados en el epidídimo por algún periodo de tiempo, también son capaces de fecundar *in vitro* (Craft, 1995).

En la literatura son numerosas las publicaciones que han contribuido a describir los fenómenos que ocurren dentro del epidídimo, todas ellas incluyen las interacciones entre los espermatozoides, el líquido luminal, el epitelio epididimal, la sangre y los compartimientos vasculares linfáticos, en el control del proceso de maduración que experimentan los espermatozoides en su tránsito a través del epidídimo. El epitelio del epidídimo tiene todos los atributos de un epitelio muy activo metabólicamente. Dos de las funciones principales que realiza este epitelio y que han sido descritas son, la absorción y la secreción. El resultado final de esas funciones determina la composición del medio luminal. La secreción merócrina ha sido bien demostrada en el ápice de las principales células secretoras del epidídimo (Nicander, 1977). Otros autores han demostrado también secreción de tipo holócrina y apócrina (Griffin, 1992).

El epidídimo sintetiza ciertos compuestos que son secretados a la luz del canal. Estos compuestos incluyen proteínas, carnitina, lípidos, glicerilfosforilcolina (GPC), carbohidratos, esteroides y algunas otras moléculas (Hamilton, 1977). Varios de esos

compuestos son de gran importancia para los espermatozoides que se encuentran en el epidídimo.

### **2.1.2.1. PROTEÍNAS**

Las células del epitelio del epidídimo y conductos deferentes sintetizan y secretan proteínas específicas. Por medio del estudio del líquido extraído de diferentes regiones del epidídimo de rata se pudo demostrar que algunas proteínas séricas también son encontradas en el epidídimo. La cantidad de algunas proteínas varía relativamente en las diferentes regiones del epidídimo, lo cual indica secreción, absorción o alguna actividad proteolítica; también se encontró que el líquido del epidídimo contiene moléculas de naturaleza protéica de bajo peso molecular y además se pudo observar cómo una parte de las proteínas del epidídimo ya no están presentes en los conductos deferentes (Wong, 1981).

De las proteínas específicas del epidídimo se pueden mencionar a la galactosiltransferasa y la  $\alpha$ -lactalbuminasa (Hamilton, 1981), ambas juegan un papel muy importante en la glicosilación de la superficie celular cuando el espermatozoide transita a través del epidídimo.

Los aminoácidos que con más frecuencia se encuentran en forma libre en el epidídimo son glicina, ácido glutámico, alanina y serina y aunque su presencia no es clara, se postula que juegan un papel importante en el mecanismo de maduración del espermatozoide (Moule, 1995).

### **2.1.2.2. CARNITINA**

Se han encontrado altas concentraciones, tanto de carnitina, como de acetilcarnitina en el líquido epididimario (Marquiz, 1965). La carnitina no es sintetizada en el epidídimo, es absorbida del torrente circulatorio, después acumulada en las células epididimarias y posteriormente secretada a la luz del epidídimo. La carnitina está involucrada en el metabolismo de los ácidos grasos (Hilton, 1981) y dado que el espermatozoide es dependiente de este metabolismo, la carnitina juega un papel muy importante en la preservación de la viabilidad de los espermatozoides del epidídimo.

### 2.1.2.3. LÍPIDOS

Los lípidos constituyen una parte importante del sustrato que usan los espermatozoides durante su estancia en el epidídimo. El total de lípidos representa el 1.25% del peso neto del epidídimo. Estos lípidos son de tres tipos, 64% son fosfolípidos, 12% es colesterol y 24% son glicéridos (Sheriff, 1980).

### 2.1.2.4. GLICERILFOSFORILCOLINA (GPC)

Este compuesto es sintetizado por las células epiteliales del epidídimo, es secretado y acumulado en altas concentraciones en muchos animales, incluido el humano. Su papel fisiológico no es claro, pero es factible que ayude a mantener el balance de la presión osmótica en la luz del epidídimo. La GPC es secretada holócrinamente, aparentemente por control androgénico (Fourie, 1995). Se ha demostrado que más del 70% de la GPC es secretada por el epidídimo, por lo cual se ha utilizado con cierta frecuencia como un marcador de la función epididimaria (Fourie, 1995).

### 2.1.2.5. CARBOHIDRATOS

En el plasma epididimario existen pequeñas moléculas de carbohidratos como fructuosa, glucosa y ácido cítrico en concentraciones muy bajas. Sin embargo, se ha demostrado que el epitelio del epidídimo está involucrado en la síntesis de carbohidratos complejos (Fleischer, 1969). La secreción epididimaria es rica en ácido siálico, el cual es incorporado a las sialomucoproteínas y tiene efecto sobre el acrosoma de los espermatozoides que están en maduración (Prasad, 1973).

### 2.1.2.6. ESTEROIDES

Existen algunas evidencias de que el epidídimo puede sintetizar esteroides *in vitro* (Gloyna, 1969). Las enzimas involucradas en la esteroidogénesis han sido bien identificadas en el epidídimo, con lo cual se asume que esta estructura produce testosterona (T) y dihidroepiandrosterona (DHEA). Así, además del suplemento de esteroides que provee el testículo al epidídimo, este último es capaz de proveerse a sí mismo de pequeñas cantidades de andrógenos, los cuales son esenciales para mantener la actividad epididimaria.

La integridad funcional del epidídimo es claramente dependiente de las hormonas testiculares. La T y la dihidrotestosterona (DHT) son los principales andrógenos que

controlan la función epididimaria. Dentro del epidídimo se pueden apreciar distintas respuestas regionales por estímulo de los andrógenos; hay una respuesta mayor en la región caudal que en la región de la cabeza y también en los diferentes tipos de células. Para mantener su integridad funcional, las células ciliadas requieren niveles de andrógenos más bajos que las células del epitelio que realizan una actividad meramente secretora. Por otra parte, también son necesarios los andrógenos para promover y mantener la habilidad fertilizante del espermatozoide, así como, estimularlo para que desarrolle su capacidad de movimiento vigoroso y progresivo (Dyson, 1973). Además de los andrógenos, se ha demostrado que la prolactina (PRL) participa activamente en la estimulación del crecimiento epididimario, sinérgicamente con la DHT (Kreider, 1977). Otro factor que posiblemente regula la función epididimaria es la temperatura, ya que se ha observado cómo ésta acelera el tránsito de los espermatozoides por el epidídimo. Lo que no es factible de explicar, es cómo pese a que reduce significativamente la estancia de los espermatozoides en el epidídimo, al parecer, no afecta la calidad del semen (Bedford, 1978), con lo que pudiera decirse que el calor puede afectar al desarrollo y maduración del espermatozoide en otra fase del proceso de espermatogénesis (principalmente durante la espermiación), ya que los individuos expuestos a temperaturas altas tienen disminución de la cuenta espermática (De Celis, 1996).

### **2.1.3. CORDÓN ESPERMÁTICO Y CONDUCTO DEFERENTE**

Los dos cordones espermáticos se extienden desde los anillos inguinales internos, por los conductos inguinales, hasta los testículos. Cada cordón contiene conducto deferente, arterias espermáticas interna y externa, arteria del conducto, plexo venoso pampiniforme (que forma hacia arriba las venas espermáticas), vasos linfáticos y nervios. Todos los elementos mencionados están cubiertos por delgadas envolturas aponeuróticas. Algunas fibras del músculo cremáster se insertan, por un extremo, en los cordones y por el otro, en el conducto inguinal (Paz, 1993).

La aponeurosis que cubre el cordón espermático está formada por tejido conjuntivo laxo que sostiene las arterias, venas y linfáticos. El conducto deferente es un pequeño tubo de pared gruesa, compuesto por dentro, de una mucosa y submucosa rodeada por tres capas bien definidas de músculo liso encerradas en una cubierta de tejido fibroso. Por

arriba del testículo, este conducto es recto y sus 4 cm proximales tienden a ser contorneados (Eroschenko, 1993).

La luz de los conductos deferentes es irregular y estrecha con una capa delgada de mucosa, una capa muscular gruesa y una capa adventicia. La superficie irregular de la luz se debe a que posee un recubrimiento de *lamina propria*, que consiste en fibras de colágena compactadas y una fina red elástica (Eroschenko, 1993). El epitelio de los conductos deferentes es columnar pseudoestratificado, pero un poco más bajo que el epitelio del epidídimo. Este epitelio descansa sobre una membrana basal y en el ápice de sus células se pueden apreciar cilios. La capa muscular está formada por una capa longitudinal interna, una capa gruesa circular intermedia y una capa delgada longitudinal externa de músculo liso. La capa muscular está rodeada por adventicia, la cual contiene numerosos vasos sanguíneos y nervios. La adventicia se une con el resto del tejido conectivo y rodean así al cordón espermático (Eroschenko, 1993).

#### 2.1.4. PRÓSTATA

Es un órgano glandular y fibromuscular situado inmediatamente por debajo de la vejiga. Normalmente pesa alrededor de 20g y contiene en su espesor a la uretra posterior, que mide aproximadamente 2.5 cm de longitud. Está sostenida, por delante, por los ligamentos puboprostáticos y por debajo, por el diafragma urogenital. La próstata está atravesada, por detrás, por los conductos eyaculadores que se dirigen oblicuamente para abrirse en el *verumontanum* en el piso de la uretra prostática inmediatamente proximal al esfínter urinario estriado externo (Paz, 1993).

Según la clasificación de Lowsley (Tanagho, 1992), la próstata consta de cinco lóbulos: anterior, posterior, lateral derecho, lateral izquierdo y mediano. Según McNeal (1972) (Tanagho, 1992) tiene una zona periférica, una central, una zona transicional, un segmento anterior y una zona esfinteriana preprostática. El segmento de uretra que atraviesa la próstata es la uretra prostática. Está recubierta por una capa longitudinal interna de músculo (continuo con una capa semejante de la pared vesical). Incorporada dentro de la próstata está una abundante cantidad de musculatura vesical longitudinal

exterior. Esta musculatura representa al verdadero esfínter liso involuntario de la uretra posterior.

La próstata queda por detrás de la sínfisis del pubis; en estrecho contacto con su cara posterosuperior se encuentran los conductos deferentes y las vesículas seminales. Por detrás se halla separada del recto por las dos hojas de la aponeurosis de Denonvilliers, que constituye los remanentes de la serosa del fondo de saco de Douglas que en una fase de su desarrollo embriológico se extendían hasta el diafragma urogenital (Paz, 1993).

En lo profundo de la capa de fibras musculares lisas circulares que tiene la próstata (esfínter involuntario) yace el estroma prostático, constituido por tejido conjuntivo con numerosas fibras musculares lisas. En él están incluidas las glándulas prostáticas. Estas glándulas se abren a conductos excretores de mayor tamaño (aproximadamente 25) los que a su vez desembocan en el piso de la uretra prostática principalmente, entre el *verumontanum* y el cuello vesical. Inmediatamente por debajo del epitelio de transición de la uretra prostática se encuentran las glándulas periuretrales (Brandes, 1974).

La glándula prostática tiene dos funciones, sirve como esfínter y contribuye con una parte del eyaculado. El músculo liso que está orientado circularmente en el cuello de la vejiga y del esfínter preprostático, está involucrado en la liberación de la secreción prostática y quizá también pueda estar involucrado en la continencia urinaria. Por otra parte, el músculo liso y estriado de las porciones anterior y anterolateral de la próstata, el cual se fusiona con la parte externa del esfínter, está involucrado en la continencia urinaria y en la emisión del semen (Blacklock, 1976).

La próstata secreta de 0.5 a 1.5 ml de un líquido lechoso, ligeramente alcalino (pH de 7.2) que representa del 15 al 30% del volumen total del eyaculado. El líquido prostático contiene fosfatasa ácida, ácido cítrico, poliaminas y cationes bivalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ) (Mann, 1981).

La secreción de la próstata es merócrina predominantemente, por lo cual los gránulos secretorios unidos a la membrana se fusionan con la membrana celular para liberar su contenido (Blacklock, 1976). Ocasionalmente también se da la secreción apócrina, en la

cual, parte del ápice de la célula comienza a distenderse en forma de un pseudópodo. En este caso, los gránulos secretores y fragmentos de los componentes celulares en que se incluyen al citoplasma y algunos organelos, son secretados también (Brandes, 1974).

#### **2.1.4.1. FOSFATASA ÁCIDA**

La fosfatasa ácida del líquido prostático humano es una proteína dimérica que cataliza la hidrólisis de los fosfomonoésteres. La actividad de ésta enzima está localizada en el epitelio glandular y basal de la glándula prostática (Comhaire, 1989). Su síntesis y secreción es hormono-dependiente y se incrementa por estimulación androgénica. La secreción de esta enzima puede ser afectada por la edad, excitación emocional, por algunas enfermedades, procesos inflamatorios o tratamientos farmacológicos. La castración o la hipofisectomía y el tratamiento con estrógenos, pueden suprimir la secreción de fosfatasa ácida (Comhaire, 1989).

La actividad de la fosfatasa ácida puede estar asociada con la actividad metabólica del espermatozoide porque cataliza la transferencia de fosfatos, seguida de la escisión del glicerolfosfato (Ostrowski, 1980). El semen de humano normalmente contiene varios tipos de fosfatasas ácidas de diferentes orígenes. La enzima derivada de la próstata contribuye sólo con el 10 al 25 % de la actividad enzimática sérica total (Ostrowski, 1980).

#### **2.1.4.2. METALES BIVALENTES**

De estos metales, el Zinc (Zn) es el más común y la concentración que alcanza en el líquido seminal humano es entre 2.5 y 25.7 mg/dl. El papel que tiene el Zn en la reproducción no es del todo conocido, pero se ha demostrado que el espermatozoide acumula Zn proveniente del líquido prostático (Kvist, 1985) y es capaz de modular la reacción acrosomal (Delgado, 1985), la motilidad espermática (Arver, 1982) y la descondensación espermática (Huret, 1986). El Zn también está involucrado en la regulación de varias enzimas. Hasta el momento se conocen algunas zinc-metaloenzimas tales como la anhidrasa carbónica, carboxipeptidasa, alcohol deshidrogenasa, deshidrogenasa glutámica, deshidrogenasa láctica y fosfatasa alcalina (Ostrowski, 1980; Paz, 1993). Se sabe que el Zn es capaz de inhibir la actividad de la ADNasa, lo cual puede indicar que este metal está involucrado en el control de la destrucción de los espermatozoides.

### **2.1.4.3. CITRATO**

El citrato es el principal anión en el plasma seminal humano (cerca de 376 mg/dl). Su secreción es importante para mantener el equilibrio osmótico de la próstata y es un potente fijador de iones metálicos (Mann, 1981). El citrato es producido por la vía del ciclo del ácido tricarboxílico y se acumula después de su secreción si no es utilizado. La secreción de citrato se realiza por medio de la bomba de Na y bajo control androgénico (Paz, 1993).

### **2.1.4.4. POLIAMINAS**

Se ha encontrado una alta concentración de poliaminas alifáticas (espermina, espermidina y putrecina) en el tejido prostático y en el plasma seminal (Williams, 1975). La mayor parte de la espermina proviene de la próstata. Las poliaminas también son sintetizadas en el resto del organismo y provienen principalmente de la arginina por la vía de la ornitina, catalizada por la ornitina descarboxilasa, la cual es una enzima clave, controlada por la T en los órganos sexuales (Griffin, 1992). Las tres poliaminas son promotoras del crecimiento celular (Paz, 1993). Se ha demostrado que la putrecina funciona como un factor de crecimiento y es producida por los fibroblastos en condiciones de cultivo (Pohjanpelto, 1972). La espermina y espermidina son capaces de estimular la actividad del cebador en el ADN de la ARN polimerasa, y están involucradas en la fosforilación de las proteínas cromosomales no histonas (Ahmed, 1978). Se ha descrito que las poliaminas mejoran la motilidad espermática en el humano (Fair, 1972) y tienen otras acciones, tales como inhibir la conversión de la proacrosina a su forma activa, la acrosina (Parrish, 1979). También se ha demostrado que la espermina tiene propiedades bacteriostáticas y previene el crecimiento bacteriano en el plasma seminal (Comhaire, 1989).

La integridad funcional de la próstata es dependiente de las hormonas testiculares. La T y la DHT son los principales andrógenos que controlan su función. La glándula prostática y otros tejidos blanco de los andrógenos, acumulan andrógenos en altas concentraciones. La T que se acumula en la próstata es convertida rápidamente en 5- $\alpha$ -DHT por actividad de la 5- $\alpha$ -reductasa (Griffin, 1992). La alta y prolongada captación de andrógenos en la próstata es debida a la presencia de receptores específicos a andrógenos localizados en el citoplasma y núcleo de las células del epitelio prostático (Liao, 1969).

## 2.1.5. VESÍCULAS SEMINALES

Las vesículas seminales están situadas precisamente por arriba de la próstata, bajo la base de la vejiga. Miden aproximadamente 6 cm de longitud y son de consistencia blanda. Cada vesícula seminal desemboca a los lados del utrículo prostático para formar el conducto eyaculador. Los uréteres quedan por dentro de ellas y el recto se encuentra adyacente a sus caras posteriores (Eroschenko, 1993).

La mucosa tiene un epitelio pseudoestratificado. La submucosa está formada por tejido conjuntivo denso, cubierto por una capa delgada de músculo liso que a su vez está rodeada por tejido conjuntivo (Eroschenko, 1993).

La secreción de las vesículas seminales es viscosa, ligeramente amarillenta y con un pH alcalino. Cerca del 70% del eyaculado en el humano proviene de las vesículas seminales. La última fracción del eyaculado contiene principalmente secreción de las vesículas seminales. Durante la excitación sexual, las vesículas comienzan a tensarse y el músculo liso se contrae. Las vesículas experimentan contracción peristáltica, lo que hace posible que descarguen su secreción en los conductos eyaculadores y la uretra (Benson, 1994).

La fructosa es un azúcar primario que forma parte del líquido seminal, en concentración aproximada hasta de 315 mg/dl. El nivel de fructosa está bajo regulación androgénica, pero muchos factores tales como el almacenamiento, la frecuencia de eyaculaciones, niveles séricos de glucosa y estado nutricional en general, pueden afectar la concentración de fructosa en el plasma seminal (Mann, 1981). La fructosa se forma a partir de la glucosa en sangre, por medio de una vía enzimática, donde experimenta isomerización y luego desfosforilación.

El ácido ascórbico, el fósforo inorgánico, el fósforo ácido-soluble y el ácido úrico también están presentes en el líquido seminal; éste último se encuentra en altas concentraciones (Paz, 1993). Los principales cationes que posee éste líquido son el Na y K. El pH de la secreción de las vesículas seminales pudiera indicar que el citrato y el bicarbonato son los aniones más importante en este líquido. El sorbitol, el citrato de inositol, la colinesterasa y otras proteínas solubles son sintetizadas para formar parte de este líquido que incluye algunas prostaglandinas, que son importantes para estimular la contracción del músculo

liso y probablemente contribuyan al transporte del espermatozoide en el tracto reproductor femenino (Mandl, 1972).

En general, las proteínas que están presentes en este líquido son pocas en número, pueden ser insolubles en algunos pH y con frecuencia forman agregados macromoleculares (Curry, 1990) y algunas son especie-específicas, tal es el caso de la proteína MHS-5 que incluso sirve como marcador del semen humano (Evans, 1986). El semen de humano tiene además otras proteínas específicas, tanto de origen prostático, como de vesículas seminales, designadas también como antígenos seminales vesícula-específicos. Estos fueron encontrados en semen recién eyaculado pero no se encontraron presentes en esas mismas muestras después de dejarlas 30 min a temperatura ambiente, con lo que se presume, que son componentes estructurales del coágulo seminal (McGee, 1988). Las vesículas seminales secretan además un inhibidor de proteasas que estabiliza a la membrana acrosomal del espermatozoide y evita que se realice precozmente la reacción acrosomal (Curry, 1990).

El papel de los andrógenos para el desarrollo y manutención de la funcionalidad de los órganos sexuales accesorios ha sido bien establecido. La producción de T es requerida para la diferenciación de las vesículas seminales en la pubertad, así como para hacerlas funcionar en toda la vida reproductiva, de tal forma que el control de la función de estas vesículas es muy similar a la de la próstata (Markham, 1994).

El epitelio de las vesículas seminales es capaz de metabolizar andrógenos por medio de la actividad de las enzimas  $3\alpha$ ,  $3\beta$  y  $17\beta$ -deshidrogenasas (Sirigu, 1981). Al encontrar que tanto el citosol como el contenido nuclear de las células del epitelio de las vesículas seminales tienen una alta afinidad por los receptores a estrógeno, pudiera asumirse que además de los andrógenos, los estrógenos participan en la regulación fisiológica de estas vesículas (Murphy, 1980).

### **2.1.6. ESCROTO**

Por debajo de la piel arrugada del escroto se encuentra el músculo dartos, que es músculo liso. Por debajo de éste se identifican las tres capas aponeuróticas y por debajo

de ellas se encuentra la hoja parietal de la túnica vaginal. La porción más profunda del escroto está formada por tejido conjuntivo (Markham, 1994).

El escroto se halla dividido por un tabique en dos sacos de tejido conjuntivo. El escroto no sólo sostiene al testículo, sino que por medio de la relajación o contracción de su capa muscular ayuda a regular su temperatura.

### **2.1.7. PENE**

El pene está formado por dos cuerpos cavernosos y el cuerpo esponjoso que contiene a la uretra, cuyo diámetro es de 8 a 9 mm. El extremo distal de estos cuerpos está cubierto por el glande. Cada uno de ellos está encerrado en una vaina aponeurótica (albugínea) y todos se hallan rodeados por una envoltura fibrosa gruesa, conocida con el nombre de aponeurosis de Buck. Cubre a estos cuerpos una piel laxamente dispuesta y desprovista de tejido adiposo. El prepucio forma una capucha sobre el glande.

Por debajo de la piel del pene (y el escroto) está la aponeurosis de Colles, la cual se extiende desde la base del glande hasta el diafragma urogenital. Esta aponeurosis se continúa con la aponeurosis de Scarpa de la porción baja de la pared abdominal.

Los extremos proximales de los cuerpos cavernosos se insertan en los huesos pélvicos precisamente por delante de las tuberosidades isquiáticas. El cuerpo esponjoso ocupa una depresión en la línea media de la superficie ventral de los cuerpos cavernosos. En su porción proximal, el cuerpo esponjoso está conectado a la cara inferior del diafragma urogenital y a través de éste emerge la uretra membranosa. Esta porción del cuerpo esponjoso se encuentra rodeada por el músculo bulbocavernoso. Su porción distal se expande para formar el glande del pene.

El ligamento suspensorio del pene se origina en la línea alba y en la sínfisis del pubis y se inserta en la cubierta aponeurótica de los cuerpos cavernosos.

Los cuerpos cavernosos, el cuerpo esponjoso y el glande están formados por tabiques de tejido eréctil y de músculo liso que circundan las cavidades vasculares (Benson, 1994).

## 2.1.8. URETRA

La uretra está rodeada por el cuerpo vascular esponjoso y el glande del pene. La mucosa de la uretra que recorre el glande está formada por epitelio escamoso. En la vecindad inmediata la mucosa es de tipo transicional. Por debajo de la mucosa está la submucosa, la cual contiene tejidos conjuntivo y muscular liso, así como las numerosas glándulas de Littre, cuyos conductos se abren a la luz de la uretra (Tanagho, 1992).

## 2.1.9. GLÁNDULAS DE COWPER

Las glándulas de Cowper son una pareja de cuerpos de 3-5 mm de diámetro y son homólogas a las glándulas de Bartolini de la mujer. Hay una glándula a cada lado de la membrana dorsal de la uretra hasta el bulbo del pene, parcialmente incluidas en las fibras del músculo esquelético del diafragma urogenital. Las glándulas están divididas en lóbulos por tejido conjuntivo. Cada lóbulo es drenado por un conducto. Los conductos más delgados se anastomosan y forman conductos de mayor diámetro y los conductos que están dentro de cada glándula se unen para formar un solo conducto excretor. Usualmente cada conducto es rodeado por una o dos capas de músculo liso. Los conductos más pequeños presentan un epitelio columnar simple con actividad secretora, el cual ocasionalmente da origen a divertículos. Los conductos de mayor tamaño poseen un epitelio columnar estratificado o pseudoestratificado sin actividad secretora y ocasionalmente dan origen a glándulas intraepiteliales productoras de moco. Los conductos excretores tienen de 3 a 4 cm de longitud y poseen un epitelio columnar estratificado. Los conductos excretores penetran la membrana urogenital, pasan hacia dentro del cuerpo esponjoso del pene y recorren de 2 a 3 cm en la submucosa pobremente definida de la uretra bulbosa. Estos conductos se abren en el piso de la uretra por medio de dos aberturas muy pequeñas, una a cada lado de la línea media (Paz, 1993).

Las glándulas de Cowper tienen el arreglo típico de estroma y parénquima de todos los órganos sexuales accesorios masculinos. Los túbulos y los alvéolos están rodeados por tejido conectivo y músculo liso. Las células epiteliales escamosas son dominantes en los túbulos y alvéolos de estas glándulas. Aunque también están presentes otras formas

celulares, tales como las células columnares y cuboidales, que se encuentran, según la fase funcional, edad, estado hormonal y actividad sexual del individuo (Paz, 1993).

La secreción de estas glándulas es clara, ligeramente viscosa, de tipo mucoide, y se descarga durante la erección y posiblemente también durante la eyaculación. El epitelio glandular de los alvéolos secreta gotas de mucina, la cual probablemente colabora con la lubricación uretral. La secreción del moco, que es rico en sialoproteínas, ocurre por excitosis (Paz, 1993; Markham, 1994).

Corno todas las glándulas que forman parte del sistema reproductor masculino, estas glándulas accesorias también funcionan bajo un control androgénico muy estricto, tanto para la proliferación celular durante su crecimiento, como para su actividad secretora durante la vida reproductiva del varón (Markham, 1994).

## 2.2. NEUROENDOCRINOLOGÍA DEL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULINO

Los procesos de producción y maduración espermática son regulados por control endocrino. El hipotálamo regula al aparato reproductor por medio de la secreción intermitente de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) a una frecuencia y concentración específica (Granner, 1992). Esta hormona es un decapeptido que es sintetizado por el hipotálamo. La estimulación adrenérgica del hipotálamo genera la secreción intermitente de la GnRH en el sistema porta hipotálamo-hipofisario. La liberación de GnRH es una propiedad intrínseca del hipotálamo y es un mecanismo calcio dependiente e independiente de AMPc o de GMPc. Esta secreción también está regulada por acciones, tanto estimuladoras, como inhibitoras de factores extrahipotalámicos (neurotransmisores, progesterona y otros esteroides). Los pulsos de GnRH ejercen su principal efecto en la parte anterior de la hipófisis, donde se inicia la síntesis, el almacenamiento y la secreción de las gonadotrofinas, de la hormona luteinizante (LH) y de la foliculo estimulante (FSH). Aunque el control hipotalámico es permisivo, la conservación de las concentraciones normales de gonadotrofinas depende de la amplitud y frecuencia específicas de los pulsos de GnRH. El mecanismo por el cual la secreción de una sola hormona regula la liberación de dos hormonas diferentes, la LH y la FSH no se conoce totalmente, pero puede involucrar algunas diferencias en la frecuencia de los pulsos de la secreción de la GnRH. Las desviaciones mínimas alteran seriamente la secreción hipofisaria normal de gonadotrofinas (Bousfield, 1994). La alteración del hipotálamo o de las vías de comunicación hacia la parte anterior de la hipófisis da como resultado atrofia gonadal, ello demuestra la importancia del hipotálamo para conservar la función reproductora normal. Sobrepuesta a la secreción adrenérgica de GnRH es la inhibición de los niveles, tanto hipotalámicos como hipofisarios originados por el incremento de la concentración de T.

La LH y FSH son glicoproteínas compuestas por dos cadenas polipeptídicas denominadas  $\alpha$  y  $\beta$ . Las diferencias en sus características funcionales e inmunológicas están determinadas precisamente por sus subunidades (Granner, 1992). Ambas hormonas son secretadas por el mismo tipo de células basófilas de la hipófisis (Griffin,

1992). La LH interactúa con receptores de alta afinidad en las células de Leydig y esto incrementa la síntesis de T (Baker, 1976). La estimulación para este proceso esteroideogénico involucra la activación de enzimas intracelulares, tales como adenil-cinasa y la protein-cinasa (Bousfield, 1994).

Aunque el papel que desempeña la FSH no es completamente conocido, para que se realice el proceso de la espermatogénesis se requiere de la presencia de niveles altos de T en el medio intratesticular. La acción de la FSH se inicia cuando se une a los receptores de superficie que se encuentran en las células de Sertoli (Bousfield, 1994). Esta asociación da como resultado un incremento de la concentración de AMPc en las células de Sertoli, la activación de proteínas del tipo cinasas AMPc-dependientes y un incremento en la síntesis de ARN y de proteínas que incluye a las proteínas fijadoras de andrógenos (ABP) y de las que forman el complejo de enzimas aromatasa que convierten la T a estradiol ( $E_2$ ) (Hall, 1994). La ABP es importante para mantener los niveles de T altos en el medio intratesticular.

La FSH por sí sola no incrementa la secreción de T. La acción sinérgica de FSH y LH no está ampliamente conocida, pero es posible que involucre la interacción de las células de Leydig y de Sertoli. La función normal de estas células es muy importante para mantener la calidad y cantidad de la producción y maduración espermática (Mattison, 1990).

### **2.2.1. REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE GnRH Y GONADOTROFINAS**

La cantidad de secreción de LH es controlada por la acción de los esteroides sexuales en el hipotálamo e hipófisis. Tanto la T como el  $E_2$  pueden inhibir la secreción de LH. La T puede ser aromatizada hasta  $E_2$  en el hipotálamo y en la hipófisis, pero las dos hormonas pueden actuar independientemente (Griffin, 1992).

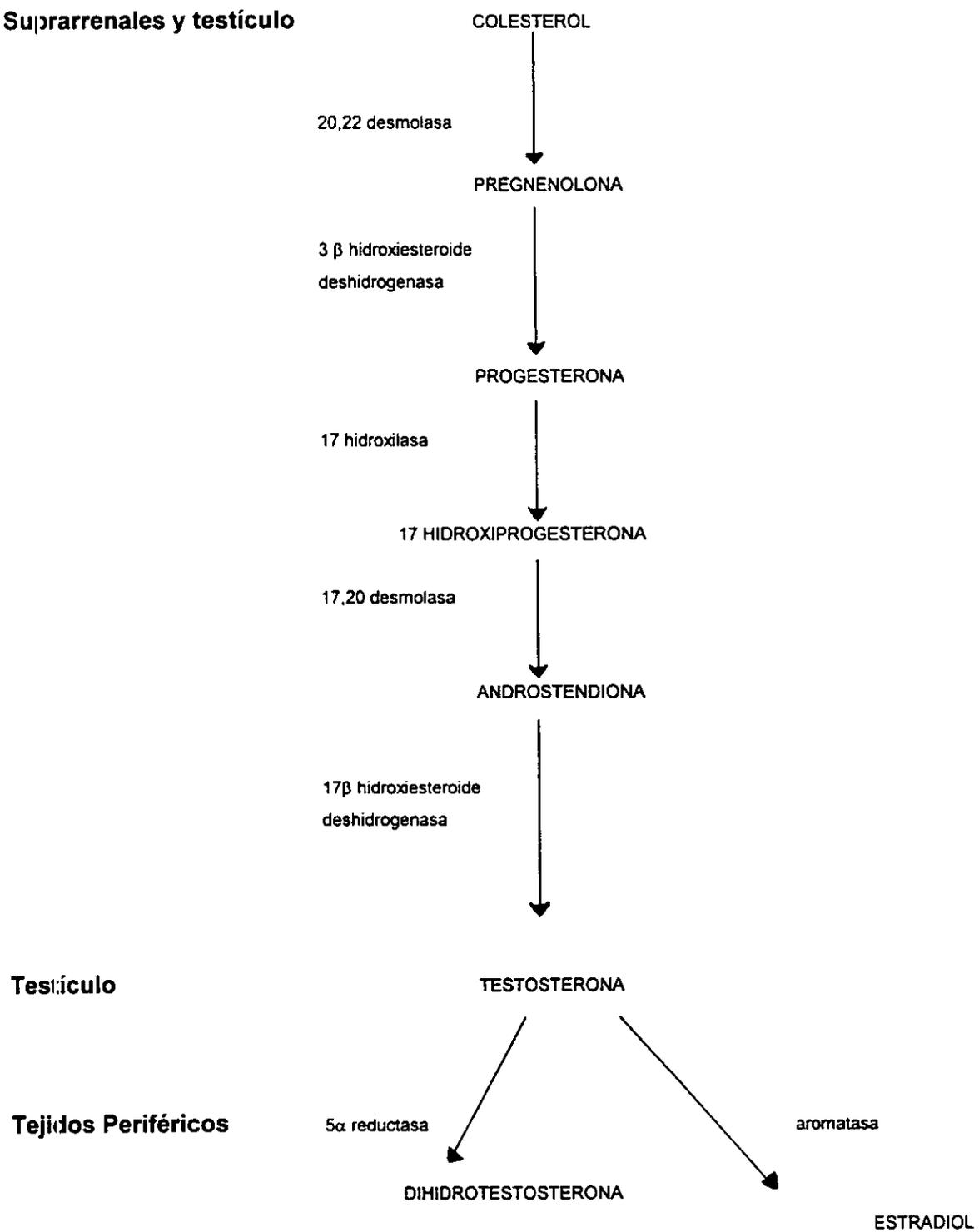
La T disminuye los niveles de LH inicialmente con la reducción de la frecuencia de los pulsos. En contraste, el  $E_2$  disminuye los niveles de LH con la reducción de la amplitud de los pulsos, sin cambios en la frecuencia de los mismos. La DHT también puede ejercer una retroalimentación negativa en la secreción de LH, que es muy similar a la que realiza la T (Hall, 1994). La T también puede ejercer una retroalimentación negativa sobre la

secreción de LH a nivel de la hipófisis, esto genera una respuesta disminuida de LH a la estimulación aguda de GnRH en presencia de niveles plasmáticos normales de  $E_2$  (Hall, 1994).

La concentración sérica de FSH incrementa selectivamente la proporción de células germinales en el testículo (Griffin, 1992; Hall, 1994). En los túbulos seminíferos se encuentra un inhibidor específico de FSH, no esteroide, la inhibina, que es capaz de regular la secreción de FSH. Sin embargo, estudios realizados en ratas castradas, indicaron que las concentraciones, tanto de FSH como de LH, fueron mantenidas dentro de los límites normales por la sola acción de la T, en ausencia de otros factores testiculares (Mattison, 1990). Adicionalmente, la presencia de  $E_2$  produce una selectiva disminución en los niveles de LH. Cuando la T está presente en concentraciones no fisiológicas, pero el  $E_2$  está en niveles fisiológicos, éste cambio en el índice T/  $E_2$  permite la elevación selectiva de los niveles de FSH con niveles normales de LH (Hall, 1994; Granner, 1992).

## **2.2.2. FISIOLÓGÍA Y BIOQUÍMICA DE LOS ANDRÓGENOS**

La vía de síntesis de T que se realiza en la glándula suprarrenal y el testículo y que comienza a partir de moléculas de colesterol y la conversión de ésta a andrógenos activos y metabolitos de estrógenos, se muestra en la figura 1.

**Suprarrenales y testículo****Figura 1. SÍNTESIS DE TESTOSTERONA**

El precursor esteroide es el colesterol, y éste puede ser sintetizado *de novo* o provenir de la poza plasmática, por un mecanismo de endocitosis mediado por receptores de partículas lipoprotéicas de baja densidad (Griffin, 1992). En la glándula suprarrenal, gran parte de este colesterol es esterificado y almacenado en vesículas citoplásmicas, para estar disponible para la síntesis de esteroides. Sin embargo, parece ser que los testículos obtienen cerca de la mitad del colesterol requerido para la formación de T, por síntesis *de novo*, en contraste con los ovarios que utilizan colesterol derivado de lipoproteínas como su principal fuente de sustrato para la formación de hormonas esteroides (Granner, 1992; Griffin, 1992).

Los pasos enzimáticos que están involucrados en la conversión de colesterol hasta T son cinco. En estos procesos participan cinco enzimas: la 20.22 desmolasa, 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, 17 $\alpha$  hidroxilasa, 17.20 desmolasa y la 17 $\beta$  hidroxiesteroide deshidrogenasa (Wilson, 1975). Bajo la estimulación de la glándula suprarrenal por la ACTH (o el AMPc), se activa una esterasa y el colesterol libre formado es transportado al interior de las mitocondrias, donde la reacción inicial en el proceso es la ruptura de la cadena lateral del colesterol por el complejo enzimático de escisión de cadena lateral citocromo P-450 (20.22 desmolasa) para formar pregnenolona (Griffin, 1992). Esta separación de la cadena lateral comprende hidroxilaciones en secuencia, primero en C<sub>22</sub> y después en C<sub>20</sub>, seguidas por la escisión de la cadena lateral (eliminación del fragmento de 6 carbonos, isocaproaldehído) para formar un esteroide de 21 carbonos. Una proteína dependiente de ACTH puede unirse y activar al colesterol o al complejo enzimático de escisión de cadena lateral citocromo P-450. La aminoglutetimida es un inhibidor muy eficiente de este complejo enzimático y de la biosíntesis de esteroides. Esta reacción inicial es un proceso limitante en la síntesis de T, donde el citocromo P-450 que participa está bajo el control regulatorio de la LH (Granner, 1992). Las otras cuatro enzimas que participan en la vía de síntesis de la T están localizadas en los microsomas (Matsumoto, 1984). La 3 $\beta$  hidroxiesteroide deshidrogenasa oxida el anillo A del esteroide a una configuración  $\Delta^4$  3 ceto (Bousfield, 1994). Evidencias recientes indican que la actividad de 17 $\alpha$  hidroxilasa y de la 17.20 desmolasa son realizadas por un mismo citocromo P-450 (Griffin, 1992).

Mientras que las primeras cuatro reacciones enzimáticas en la vía de síntesis de la T también se presentan en las glándulas suprarrenales, la actividad enzimática de la  $17\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa se encuentra solamente en el testículo (Matsumoto, 1984).

No obstante que la T es el principal producto de secreción del testículo, algunos de los precursores de la vía metabólica, así como pequeñas cantidades de DHT, androsterona, androstenediona, progesterona, 17-hidroxiprogesterona y  $E_2$ , son también secretados directamente por el testículo (Wilson, 1975; Hall, 1994). La T sirve como una prohormona para la producción de DHT y  $E_2$ . Los principales sitios de formación de estas hormonas son los tejidos blanco de los andrógenos y el tejido adiposo, respectivamente (Wilson, 1975 y Matsumoto, 1994).

Normalmente el 75% del  $E_2$  producido en el varón es derivado de la conversión de T hasta  $E_2$  (por aromatización) en los tejidos periféricos (Griffin, 1992) y solo el 25% del  $E_2$  es secretado directamente por las células de Leydig (Hall, 1994). La DHT es formada por acción de la  $5\alpha$ -reductasa en los tejidos periféricos (Wilson, 1975).

### **2.2.3. TRANSPORTE DE TESTOSTERONA Y SU LIBERACIÓN EN LOS TEJIDOS**

Aproximadamente el 44% de la T circula unida a una glicoproteína, la  $\beta$ -globulina fijadora de T (TeBG) y un 54% unida a la albúmina y a otras proteínas del plasma, sólo el 2% permanece libre. Aunque la TeBG ha sido considerada solamente como una proteína transportadora, se ha demostrado que tiene un papel importante como amortiguador de la acción de la T en los tejidos blanco de esta hormona (Duncan, 1991).

Las concentraciones de T en la linfa testicular y en sangre venosa de los testículos son similares. Sin embargo, debido a la gran magnitud de su flujo, la principal ruta de secreción de T es a través de la vena espermática. En los testículos normales se encuentran cerca de 25  $\mu$ g de T, de manera que el contenido total de la hormona debe recambiarse varios cientos de veces cada día para proveer los 5 a 10 mg de T que se secretan diariamente por testículo (Pardridge, 1986).

La cantidad de T disponible para entrar dentro de las células depende del órgano en cuestión como una función del tiempo de tránsito capilar, de la velocidad de disociación de las proteínas que se encuentran unidas y de la permeabilidad de las células endoteliales (Pardridge, 1986).

En estudios de biodisponibilidad tisular realizados *in vivo*, se ha visto que casi toda la T unida a la albúmina está disponible para ser captada por el cerebro, mientras que la T unida a la TeBG no se transporta de manera significativa al cerebro (el cerebro se utiliza como un tejido no hepático representativo) (Griffin, 1992).

Aún cuando el tiempo de tránsito capilar en el hígado es más prolongado que en el cerebro, es corto en relación con el tiempo medio de disociación de la TeBG, de manera que la T disponible para su transporte al interior de los hepatocitos es similar a aquella en cerebro, o cerca del 40-50% de T plasmática total en hombres normales (por ejemplo, la fracción libre más la fracción unida a albúmina). En contraste con esto, ya que el E<sub>2</sub> se disocia más rápidamente de la TeBG, tanto el E<sub>2</sub> unido a la albúmina, como el unido a la TeBG están disponibles para el transporte al interior de los hepatocitos (Griffin, 1992).

#### **2.2.4. METABOLISMO DE LOS ANDRÓGENOS**

La T y sus metabolitos son excretados primariamente en la orina, esta hormona secretada por la glándula suprarrenal, no es un compuesto 17-cetoesteroide, pero el hígado convierte alrededor del 50% de T a androsterona y a eticolanolona, que sí son compuestos 17-cetoesteroides; la otra mitad se recupera en forma de metabolitos polares (dioles, trioles y conjugados) (Granner, 1992). Se piensa que estos metabolitos de excreción son en general inactivos. Una pequeña fracción del metabolismo de la T da lugar inicialmente a dos tipos de metabolitos activos, los cuales a su vez median muchas acciones androgénicas (Wilson, 1975). Estos metabolitos se forman en tejidos periféricos de tal forma que la T sirve como una prohormona. La primera categoría de metabolitos activos la constituyen los esteroides 5 $\alpha$ -reducidos, principalmente la DHT, que media numerosas reacciones androgénicas en tejidos blanco. La segunda categoría de metabolitos activos de T la constituyen los estrógenos formados por la aromatización de andrógenos en diversos tejidos periféricos (Griffin, 1992).

## 2.2.5. ACCIÓN DE LOS ANDRÓGENOS

Los conceptos actuales de la acción androgénica en las células blanco se puede observar en el siguiente diagrama:

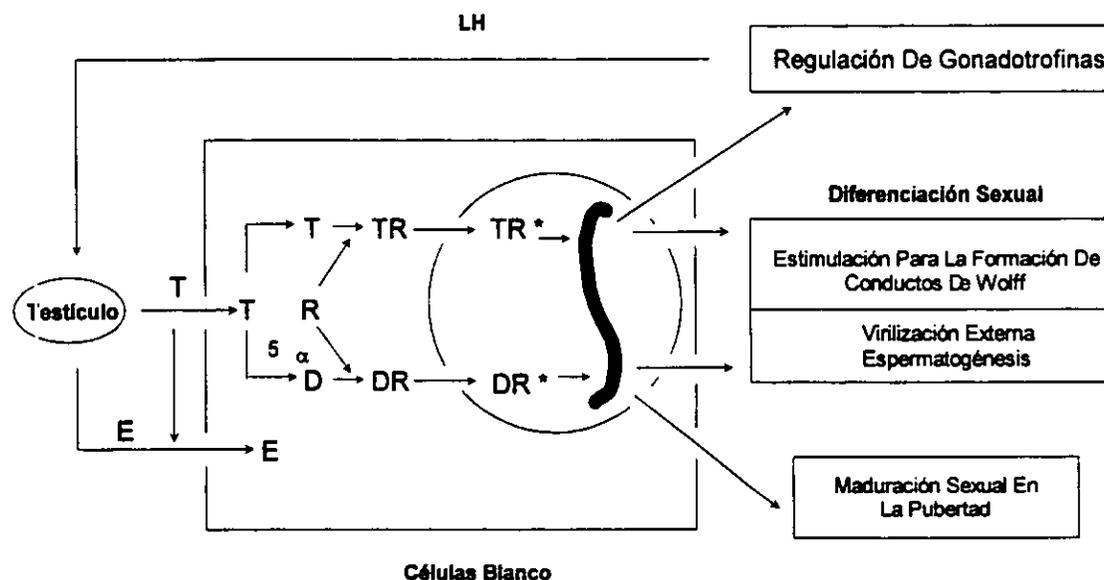


Figura 2. ACCIÓN ANDROGÉNICA

Entre las principales funciones de los andrógenos están la regulación de la secreción de gonadotrofinas por el sistema hipotálamo-hipofisario, la formación del fenotipo masculino durante la diferenciación sexual y la promoción de la maduración sexual en la pubertad (Griffin, 1992).

Dentro de la célula, la T puede ser convertida a DHT por la 5α-reductasa. Las dos hormonas se unen a la misma proteína receptor a andrógeno de alta afinidad (R). Cuando el receptor a andrógeno no está unido al esteroide, se encuentra predominantemente en el núcleo. La unión del andrógeno con el receptor para formar los complejos hormona-receptor: testosterona-receptor (TR) y dihidrotestosterona-receptor (DR) es un prerequisite necesario para la reacción de transformación en la que los complejos hormona-receptor adquieren afinidad aumentada por los componentes nucleares (TR\* y

DR\*) para interactuar con los sitios aceptores y efectuar una respuesta biológica (Bousfield, 1994). No obstante que la naturaleza y el número de sitios aceptores para los receptores de andrógenos en la cromatina no se conocen, probablemente, los complejos receptores interactúan con secuencias de ADN específicas de los genes andrógeno-regulados, para potenciar la tasa de transcripción genética y producción de ARNs mensajeros específicos (Mason, 1985).

Con base en estudios en humanos y en animales, se sabe que el complejo TR es responsable de la regulación gonadotrófica y de la virilización de los conductos de Wolff durante la diferenciación sexual, mientras que el complejo DR es responsable de la virilización externa durante la embriogénesis y de la mayoría de las características sexuales secundarias masculinas del adulto (Mason, 1985). Las concentraciones de receptor androgénico son muy elevadas en los órganos accesorios del aparato reproductor masculino que dependen de andrógenos para su desarrollo.

## 2.3. ESPERMATOGÉNESIS

La secuencia de eventos celulares que dan como resultado la formación de espermatozoides maduros a partir de las espermatogonias, se denomina espermatogénesis y ocurre dentro de los túbulos seminíferos, mismos que conforman casi el 70% del testículo. Este proceso de formación de espermatozoides puede ser dividido en tres fases distintas desde el punto de vista funcional: **la fase proliferativa**, durante la cual las espermatogonias se dividen para formar la población de células madres (población de células  $A_0$  de reserva) y las otras, llevan a cabo divisiones mitóticas para iniciar posteriormente su diferenciación y producir espermatocitos. **La fase de crecimiento**, es cuando los espermatocitos aumentan su volumen y **la fase de maduración** donde experimentan la división meiótica para dar origen a espermátidas haploides, las cuales entran a la fase de espermiogénesis, durante la cual, las espermátidas aun redondas se diferencian en espermatozoides y por un proceso de espermiación son liberados a la luz del túbulo seminífero de donde se desplazarán con motilidad independiente hacia el epidídimo (Kerr, 1992; Russell, 1993).

Cada túbulo seminífero está delimitado por una membrana basal y en su interior se encuentran las células de Sertoli, de origen somático, que colaboran muy estrechamente con el desarrollo de los espermatozoides. Las células de Sertoli tienen una forma columnar y están unidas a la membrana basal por su parte proximal y con su parte distal alcanzan la luz del túbulo seminífero (Chaturvedi, 1993). Las espermatogonias están presentes en el compartimiento basal del túbulo seminífero y están separadas de las otras células germinales en desarrollo por las uniones estrechas de tipo "Gap" de las células de Sertoli.

En el hombre existen tres tipos de espermatogonias, las cuales se caracterizan por el patrón de tinción que adquiere la cromatina en sus núcleos:

La cromatina de la espermatogonia A "oscura" (dark:  $A_d$ ), se observa muy densa e intensamente teñida, con una pequeña área central pálida y un citoplasma que está adosado a la lámina basal del túbulo seminífero. Este tipo de espermatogonias son las células madres o de reserva, debido a que su índice mitótico es bajo y son relativamente

resistentes a los agentes agresores externos (como quimioterapéuticos, otras sustancias químicas tóxicas o radiaciones) que pueden afectar la espermatogénesis (De Celis, 1996). Después de una agresión gonadotóxica, las espermatogonias  $A_4$  también llamadas  $A_0$ , comienzan a dividirse por mitosis para restablecer las poblaciones celulares afectadas. La destrucción completa de las espermatogonias de este tipo, por ejemplo, altas dosis de radiación ionizante o algún proceso con compromiso vascular, causan una pérdida irreversible de la capacidad reproductiva porque el testículo ya no es capaz de llevar a cabo el proceso de espermatogénesis (Klinefelter, 1993).

### **2.3.1. FASE PROLIFERATIVA**

Una parte de las espermatogonias madres permanecen en esa condición, con lo que constituyen una fuente permanente de células germinales a lo largo de la vida del hombre. Durante la fase proliferativa de la espermatogénesis, algunas espermatogonias  $A_4$  comienzan a dividirse por mitosis para dar origen a dos células hijas, una de las cuales permanece como célula madre y la otra se diferencia en espermatogonia A "pálida" (pale:  $A_p$ ). Estas células muestran una cromatina débilmente teñida y uno o dos nucléolos unidos estrechamente con la membrana nuclear. Posteriormente, las espermatogonias  $A_p$  se dividen varias veces por mitosis y luego se diferencian en espermatogonias B, las cuales tienen pequeñas masas de cromatina intensamente teñidas a lo largo del borde de la membrana nuclear. (Las células madres conservan un complemento diploide de cromosomas: 46 cromosomas, durante la división mitótica en la fase proliferativa). Las espermatogonias indiferenciadas (tipo A) en los primates, incluyendo al humano tienen un índice relativamente bajo de divisiones mitóticas (Matsumoto, 1996), lo cual da como resultado que el número de espermatogonias B disponibles para iniciar meiosis sean pocas, con lo que la eficiencia de la espermatogénesis se limita a su mínima condición. Adicionalmente, se ha demostrado que este tipo de espermatogonias son muy sensibles a la radiación y a los gonadotóxicos y con mucha frecuencia son afectadas por este tipo de agentes agresores externos (De Celis, 1996).

En la última de varias divisiones mitóticas, cada espermatogonia B da origen a dos células hijas; estas espermatogonias no se separan completamente unas de otras durante las divisiones mitóticas, realizan una citocinesis incompleta, lo que origina grupos de células germinales que permanecen conectadas entre ellas a través de puentes

citoplásmicos que les permiten intercambio de material y desarrollarse en forma sincrónica durante todo el proceso de espermatogénesis (Dym, 1994). Estas células inician su desplazamiento hacia la luz del túbulo seminífero y entran a la siguiente fase del proceso de espermatogénesis.

### **2.3.2. FASE DE CRECIMIENTO**

Las células que se encuentran en esta fase se llaman espermatocitos primarios o preleptoténicos. El crecimiento de estas células es en realidad muy limitado, dado que prácticamente alcanzan justo el doble del volumen de las espermatogonias que acaban de salir de una división mitótica. Sin embargo, la característica principal de estas células no es su tamaño sino su actividad, ya que es precisamente en este momento cuando entran a la siguiente fase de la espermatogénesis.

### **2.3.3. FASE DE MADURACIÓN**

Esta fase de maduración se lleva a cabo con la meiosis, que es un evento muy prolongado (aproximadamente 24 días en el humano). Estas células llegan a ser "asimiladas" dentro del compartimiento "adluminal" de los túbulos seminíferos por la formación de uniones estrechas (uniones celulares inter-Sertoli) por arriba de ellas. Todas las otras células germinales meióticas y posmeióticas residen en el compartimiento adluminal (detrás de las uniones estrechas), mientras que todas las espermatogonias residen fuera de esta barrera, en el compartimiento basal. Las células germinales en el compartimiento adluminal son entonces aisladas y no tienen acceso directo a los nutrientes, hormonas o algunas otras sustancias, provenientes del flujo sanguíneo y el líquido intersticial, por lo que son dependientes de las células de Sertoli que les proveen a todas ellas de tales requerimientos.

Los espermatocitos preleptoténicos son ligeramente más pequeños que las espermatogonias B y tienen menos masas de cromatina en los bordes de sus membranas nucleares. La síntesis activa de ADN ocurre precisamente en los espermatocitos en preleptoteno, donde el contenido de ADN de cada cromosoma es completamente duplicado, de tal forma que, teóricamente, cada espermatocito de este tipo sería diploide (2N) por tener 46 cromosomas, pero como cada cromosoma está

constituido por 2 cromátidas hermanas idénticas, en realidad el contenido total de ADN de estas células germinales es dos veces el contenido diploide (4N).

### 2.3.3.1. FASE MEIÓTICA

#### 2.3.3.1.1. MEIOSIS I

Después de completarse la síntesis de ADN y la formación de cromátidas hermanas, los espermatozoides en **preleptoteno** inician la profase de la primera división meiótica (meiosis I), la cual se caracteriza por su larga duración (Thompson, 1991). Durante la **profase I**, tanto la célula germinal como su núcleo, incrementan gradualmente su tamaño. Los cambios morfológicos nucleares que reflejan los cambios en los cromosomas de estas células, sirven de base para hacer la clasificación de los espermatozoides primarios de acuerdo a la etapa de la profase en que se encuentren (leptoteno, cigoteno, paquiteno, diploteno o diacinesis) (Russell, 1990; Bustos Obregon, 1975; Clermont, 1963).

Los espermatozoides en **leptoteno** aumentan el tamaño de su núcleo, tienen sus cromosomas más visibles, despareados, con pequeñas e irregulares condensaciones de cromatina (cromómeros) a lo largo de toda su extensión a intervalos irregulares y se observan como finos filamentos en forma de rosario dentro del núcleo. Los cromosomas leptoténicos son diferentes de los de la profase mitótica porque parecen simples aunque son dobles, se asocian a la membrana nuclear y se acumulan en un lado del núcleo. Estos cromosomas frecuentemente demuestran una configuración tipo "bouquet" (Thompson, 1991).

Los espermatozoides en **cigoteno** son ligeramente más grandes y se caracterizan porque sus cromosomas se observan como filamentos largos y condensados y es aquí donde se inicia la alineación de los cromosomas homólogos. Durante esta fase se forma el complejo sinaptonémico. Estos complejos comienzan a formar un armazón protéico que cubre a las cromátidas, estabiliza el apareamiento y facilita su recombinación. El apareamiento puede comenzar en cualquier parte de la cromátida, que ya tiene un acortamiento muy evidente, a veces comienza en un extremo y sigue hasta el otro extremo; en otras ocasiones, la fusión es simultánea en varios sitios del cromosoma (Chaturvedi, 1993).

Los espermatoцитos en **paquiteno** se caracterizan por su núcleo grande y ovoide que contiene pequeñas masas densas de cromatina y nucléolos esféricos y prominentes. La síntesis de RNA se realiza en estos espermatoцитos en paquiteno (especialmente en espermatoцитos que transitan entre el estadio medio hacia el estadio tardío (estadios III y IV) y la terminación de la meiosis (estado VI) (Matsumoto, 1996). Los cromosomas de los espermatoцитos en paquiteno completan su apareamiento, los cromosomas se contraen longitudinalmente y se acortan y permanecen así aproximadamente 2 semanas. Cada cromosoma está constituido por 2 cromátidas hermanas unidas por sus centrómeros (centrómeros hermanos), de tal forma que cada par de cromosomas homólogos está compuesto por cuatro cromátidas y se les denomina cromosomas bivalentes o tétradas, cada cromátida tiene un centrómero independiente (Matsumoto, 1996). Durante el paquiteno se realiza el entrecruzamiento cromosómico donde ocurre el intercambio de material genético entre las cromátidas internas de los cromosomas homólogos. (Esta recombinación genética sólo se realiza por los cromosomas de las células germinales, que son las que tienen una combinación única de material genético).

Los pares de cromosomas de los espermatoцитos en **diploteno** comienzan a separarse a lo largo de toda su longitud, la separación no es completa, ya que los cromosomas homólogos quedan unidos por los quiasmas, que son las regiones donde se realizó el intercambio genético (Thompson, 1991). Los quiasmas son considerados como la expresión del proceso de recombinación genética, por medio de la cual, algunos segmentos cromosómicos con ciertos bloques de genes se intercambian entre los miembros homólogos de los pares. Durante el diploteno los espermatoцитos son más grandes que cualquier tipo de célula germinal, en cualquiera de sus fases y tienen un núcleo grande y muchas áreas claras entre bandas muy prominentes de cromatina. Las cromátidas de la tétrada se vuelven visibles y desaparece el complejo sinaptonémico.

Durante la **diacinesis**, los cromosomas se acortan, alcanzan su máxima condensación, están completamente separados de la membrana nuclear y se distribuyen más homogéneamente en el núcleo, el nucleolo desaparece. Después de la prolongada profase I, los estadios subsecuentes de la meiosis I, ocurren muy rápidamente (Matsumoto, 1996).

La diacinesis es rápidamente seguida por la **prometáfase I**. En este estadio la condensación de los cromosomas alcanza su máxima expresión. La membrana nuclear

se rompe y los microtúbulos del huso meiótico se unen a los centrómeros. Cada homólogo se une a uno de los polos por medio del centrómero homólogo y las dos cromátidas se comportan como una sola.

En la **metafase I** los cromosomas se alinean ecuatorialmente y los centriolos se ubican en los polos diametralmente opuestos. Es entonces, cuando los pares de cromosomas homólogos que se hayan unidos por los extremos, se disponen a ser atraídos a los polos.

En la **anafase I** las cromátidas hermanas de cada homólogo, que siguen unidas por los centrómeros hermanos, comienzan a ser separadas y arrastradas hacia los centriolos de cada uno de los dos polos.

Durante la **telofase I**, los pares de cromátidas llegan a los polos y comienzan a agruparse en juegos de cromosomas haploides en los polos opuestos de la célula. Después de este estadio, la célula se divide para dar origen a dos espermatocitos secundarios haploides (con 23 cromosomas o con un número cromosómico N), cada uno de ellos con un par de cromátidas hermanas todavía unidas por sus centrómeros (con lo que su contenido de ADN realmente es 2N). Los espermatocitos secundarios son esféricos y más pequeños que los espermatocitos primarios. Su núcleo es redondo y la cromatina demuestra un patrón de distribución relativamente homogéneo e intensamente teñida. Este estadio tiene una duración muy corta, al rededor de 8 horas (Matsumoto, 1996).

#### **2.3.3.1.2. MEIOSIS II**

Después de la primera división meiótica, los espermatocitos secundarios entran a una segunda división meiótica, la cual es muy similar a una división mitótica, excepto porque los espermatocitos secundarios al entrar a esta división de meiosis II sólo contienen una carga cromosómica haploide.

La **profase II** es un estadio muy corto y se caracteriza básicamente por el inicio de la formación del huso acromático.

La **metafase II** se inicia cuando el huso está completamente formado. Cada uno de los 23 cromosomas de los espermatocitos secundarios posee un par de cromátidas hermanas

tocavía unidas por sus centrómeros hermanos; posteriormente, estos pares comienzan a alinearse ecuatorialmente y se disponen a dirigirse hacia los polos.

Durante la **anafase II** los centrómeros hermanos se separan y cada cromátida representa a un cromosoma. Posteriormente comienzan a migrar hacia los polos opuestos.

En la **telofase II** las cromátidas se agrupan más estrechamente. Posteriormente la célula se divide para dar origen a dos espermatidas, cada una con un número haploide y un contenido N de ADN (Thompson, 1991).

La meiosis es un periodo en el proceso de espermatogénesis donde algunas de las células germinales meióticas experimentan apoptosis. Dado que no hay divisiones mitóticas adicionales, el número de espermatidas hijas que resulta de la meiosis completa, representa el número de espermatozoides que serán eventualmente liberados de las células de Sertoli, si se considera que no hay degeneración celular subsecuente (Matsumoto, 1996).

### 2.3.3.2. ESPERMIOGÉNESIS

La espermiogénesis es el proceso por medio del cual las espermatidas se transforman en espermatozoides maduros. Este proceso involucra muchos cambios morfológicos y funcionales, sin más divisiones celulares. Los cambios más evidentes son: 1) la formación del acrosoma, el cual contiene las enzimas necesarias que le permitirán al espermatozoide atravesar las cubiertas del óvulo para fecundarlo, 2) los cambios nucleares, entre los más importantes, la supercondensación del material nuclear para formar la cabeza, 3) el desarrollo del flagelo, que le permitirá al espermatozoide desplazarse, 4) la reorganización del citoplasma y organelos celulares y 5) la espermiación, que se refiere a la disociación de las espermatidas de las células de Sertoli, para su posterior liberación en la luz del túbulo seminífero (Kretser, 1994; Kierszenbaum, 1994). Varios de esos cambios ocurren simultáneamente, pero al proceso de espermiogénesis se le ha dividido artificialmente en cuatro etapas para su estudio: en la **fase de Golgi, de cofia, acrosomial y de maduración**. Durante estas fases es posible observar seis tipos de espermatidas:  $S_a$ ,  $S_{b1}$ ,  $S_{b2}$ ,  $S_c$ ,  $S_{d1}$ ,  $S_{d2}$ , las cuales se distinguen por

diferencias en su morfología nuclear y por el desarrollo del acrosoma y flagelo (Chaturvedi, 1993).

#### **2.3.3.2.1. FASE DE GOLGI**

Durante esta fase, en el complejo de Golgi de la espermatida  $S_a$  se pueden identificar gránulos proacrosomiales que producen una vesícula acrosomal prominente, la cual mella al núcleo y comienza a extenderse lateralmente, lo que define el polo cranial de la espermatida. Posteriormente el par de centriolos se desplazan hacia el lado opuesto (polo caudal) de la espermatida. El centriolo proximal se adosa con el núcleo en la llamada fosa nuclear de implantación y el centriolo distal comienza a formar el axonema o flagelo, el cual está compuesto por un par central y nueve pares externos de microtúbulos. Las espermatidas  $S_a$  se caracterizan por poseer un núcleo esférico y central, que contiene grandes masas de cromatina y una vesícula acrosomal hemisférica aparentemente vacía, sobre la superficie del núcleo (Chaturvedi, 1993).

#### **2.3.3.2.2. FASE DE COFIA**

Durante esta fase, el gránulo acrosomal se aplana sobre el núcleo y se extiende lateralmente, para formar el capuchón o cofia. La cromatina nuclear comienza a condensarse y el complejo de Golgi migra hacia el polo caudal; es cuando comienza a ser una espermatida  $S_{b1}$ . Este tipo de espermatida tiene un núcleo central, ligeramente irregular y su contenido de cromatina es más homogéneo y posee una vesícula acrosomal o cofia. Posteriormente, la espermatida gira 180 grados hasta que la superficie acrosomal se oriente hacia la lámina basal y el polo del flagelo se extienda hacia la luz del tubo seminífero (Matsumoto, 1996; Chaturvedi, 1993).

#### **2.3.3.2.3. FASE ACROSOMIAL**

Durante esta fase, el núcleo de la espermatida se elonga y se condensa, para formar en algunas regiones, cúmulos densos y dispersos de cromatina. Las histonas que se encuentran en el ADN y que tienen un papel importante en algunos eventos de la meiosis, tales como el apareo de cromosomas, la condensación y descondensación de los cromosomas, son sustituidas por proteínas de transición testículo-específicas, durante la elongación nuclear. Posteriormente estas proteínas de transición son reemplazadas por protaminas espermatozoide-específicas, durante las últimas etapas de la espermiogénesis. Al verificarse la condensación nuclear, no existe transcripción de

genes, por lo cual durante la espermiogénesis como tal, existe síntesis de largos ARNm que se encuentran acumulados para ser utilizados posteriormente. El núcleo comienza a orientarse hacia el polo cranial, mientras que el citoplasma es desplazado hacia el polo caudal de la espermatida. En el citoplasma, comienza a observarse un arreglo longitudinal de microtúbulos que están dispuestos en forma paralela a la dirección del desarrollo del flagelo y forman una estructura cilíndrica denominada "Manchete" o "manguillo". El desarrollo del flagelo también ocurre en esta fase de la espermiogénesis y comienza cuando el cuello o la parte conectora forma y luego se fusiona con las nueve fibras externas de la pieza media, las cuales rodean y corren en forma paralela al axonema y sirven como soporte para el flagelo. Estas fibras se unen y forman una especie de cinta que se adelgaza distalmente y quedan sólo dos columnas que permanecen alrededor del axonema hasta el nivel de la pieza media, la cual también es estabilizada por una vaina de fibras. Por otra parte, las mitocondrias comienzan a organizarse en un arreglo espiral alrededor de las fibras de la pieza media, para proveer un soporte estructural adicional y para generar la energía necesaria para la motilidad espermática (Matsumoto, 1996).

Las espermatidas  $S_{b2}$  se caracterizan por un núcleo asimétrico ligeramente elongado que contiene cromatina más homogéneamente distribuida y que comienza a unirse a la membrana plasmática. En las espermatidas  $S_c$ , el núcleo se elonga aún más y se tiñe intensamente. La porción apical del núcleo es cónica y la parte caudal es globular. En esta fase, el manguillo alcanza su máxima longitud y rodea al flagelo que se encuentra claramente visible. En las espermatidas del tipo  $S_{d1}$  el núcleo comienza a condensarse y a aplanarse. En esta etapa de la espermiogénesis el flagelo está totalmente formado y visible, mientras que el manguillo comienza a ser indistinguible (Sharpe, 1994).

#### **2.3.3.2.4. FASE DE MADURACIÓN**

Esta es la última fase de la espermiogénesis, las espermatidas del tipo  $S_{d2}$ , tienen un núcleo muy similar a las del tipo  $S_{d1}$ , pero se diferencian porque en las  $S_{d2}$ , el flagelo está rodeado por granulaciones eosinofílicas (mitocondrias) que forman la pieza media. En esta fase también se observa cómo el citoplasma residual de la espermatida se separa de ésta para formar una estructura esférica, el cuerpo residual, el cual es retenido y englobado por la célula de Sertoli, incluso hasta después de que el espermatozoide es liberado en la luz del túbulo seminífero (proceso de espermiación). Posteriormente, este cuerpo residual es degradado por la participación de lisosomas de la célula de Sertoli.

Sólo una pequeña cantidad de citoplasma es retenida en la unión de la cabeza con el flagelo (equilibrador), misma que es eliminada conforme se completa la maduración del espermatozoide en el epidídimo (Chaturvedi, 1993). La espermiación es fácilmente alterada por un inadecuado medio hormonal o por influencias externas, tales como calor o exposición a sustancias tóxicas. Esto produce una reducida liberación de espermatozoides a la luz del túbulo seminífero (Russell, 1991). Se ha demostrado que la elongación del flagelo en la espermátida y la adquisición de movimiento, puede ayudar a esta célula a salir de la célula de Sertoli. Se han logrado obtener cuerpos residuales *in vitro* y al ponerlos en contacto con células de Sertoli, comienzan a observarse cambios en la célula de Sertoli, por ejemplo liberación de interleucina 1 (Kierszenbaum, 1994).

Durante el periodo en que el espermatozoide se transporta a través del tracto genital masculino, experimenta pequeños, pero significativos cambios funcionales, especialmente durante su tránsito por el epidídimo, donde adquiere su madurez morfológica y capacidad para desplazarse rápidamente hacia adelante, en línea recta. En su gran mayoría, los espermatozoides eyaculados tienen una cabeza oval, la cual está compuesta por un núcleo, donde están altamente condensados los cromosomas, las nucleoproteínas y la cofia del acrosoma, la cual cubre aproximadamente 2/3 de la región anterior de la cabeza (Kerr, 1992). Sólo la región postacrosomal de la cabeza no está cubierta por el acrosoma. El cuello es la región de implantación del flagelo en la cabeza. El flagelo es la parte móvil del espermatozoide y está constituido por un complejo axonémico, con un par central de microtúbulos, rodeados por nueve dobletes externos de microtúbulos, que a su vez están cubiertos por la membrana citoplasmática en casi 2/3 de toda la longitud del flagelo (Linck, 1979). La pieza media del espermatozoide es la parte anterior del flagelo y está compuesta por un axonema central que estabiliza los nueve pares de fibras que rodean en forma externa y que corren en forma paralela a los nueve dobletes. La pieza principal es mas o menos larga y es la parte media del flagelo. A este nivel, el axonema está rodeado y estabilizado por dos columnas longitudinales, las cuales están montadas juntas por una vaina fibrosa. La pieza terminal es la pequeña parte posterior del flagelo, la cual está compuesta por el axonema cubierto por la membrana citoplásmica pero sin la vaina de fibras (Sharpe, 1994).

## 2.3.4. ESTADIOS Y ORGANIZACIÓN DE LA ESPERMATOGÉNESIS

El proceso de espermatogénesis se realiza en forma continua, por lo que es posible observar diferentes estadios del desarrollo de las células germinales dentro de los túbulos seminíferos en un mismo periodo de tiempo (Matsumoto, 1996). En secciones transversales del túbulo seminífero, las células germinales que se encuentran en distintas fases del desarrollo mantienen una disposición ordenada y se agrupan juntas en asociación celular o estado de espermatogénesis. En el humano se reconocen seis estadios de la espermatogénesis que en conjunto constituyen un ciclo de epitelio seminífero. Cada estadio está conformado por el tipo de células que a continuación se mencionan:

Estadio I: espermátidas  $S_a$  y  $S_{d1}$

Estadio II: espermátidas  $S_a$  y  $S_{d2}$  y cuerpos residuales

Estadio III: espermátidas  $S_{b1}$  y espermatoцитos primarios en preleptotene

Estadio IV: espermátidas  $S_{b2}$  y espermatoцитos primarios en leptotene

Estadio V: espermátidas  $S_c$  y espermatoцитos primarios en paquitene

Estadio VI: espermátidas  $S_c$  en asociación con espermatoцитos primarios y secundarios

En el testículo humano las células germinales en el mismo estadio de desarrollo se organizan a lo largo de la longitud del túbulo seminífero con una disposición helicoidal, con un radio progresivamente disminuido, de tal forma que las células más inmaduras están localizadas en la parte más externa, a continuación de la membrana basal y conforme maduran, migran concéntricamente hacia la luz del túbulo seminífero (Schulze, 1984). Las últimas fases de diferenciación incluyen a los espermatoцитos, espermátidas y espermatozoides.

El ciclo de epitelio seminífero es la serie de cambios que se pueden apreciar en una área del epitelio seminífero, en el intervalo de tiempo necesario para que sucedan dos apariciones de la misma asociación celular. El periodo de tiempo necesario para que se realice un ciclo del epitelio seminífero en el humano es de  $16 \pm 1$  días (Rowley, 1970; Kreiser, 1994). La duración del proceso de espermatogénesis en forma completa, es decir, desde la formación de la espermatogonia  $A_p$  hasta la liberación de la espermátida  $S_{d2}$  es de aproximadamente  $74 \pm 4$  días (4.6 ciclos de epitelio seminífero) (Matsumoto,

1996). Como resultado de la larga duración de la espermatogénesis y el tránsito adicional de los espermatozoides por el epidídimo, de aproximadamente 12 días (Rowley, 1970), cualquier agresión gonadotóxica, que sea capaz de afectar al desarrollo de las células germinales, reduce la cantidad de espermatozoides eyaculados, meses después de haber ocurrido (Matsumoto, 1996).

### **2.3.5. REGULACIÓN ENDOCRINA DE LA ESPERMATOGÉNESIS**

El proceso de espermatogénesis se inicia y se mantiene por la LH y FSH desde la pubertad (Griffin, 1992). Esto se ha demostrado a través de numerosos estudios (Paz, 1993; Griffin, 1992; Matsumoto, 1996), pero actualmente, aun se desconoce el papel específico de cada una de estas hormonas en los diferentes estadios de maduración de las células germinales. El testículo es muy activo endocrinológicamente, desde la etapa embrionaria y posteriormente en el inicio de la pubertad, porque produce esteroides y otras hormonas en sus células de Leydig y de Sertoli (Hall, 1994; Sharpe, 1994).

Son numerosos los procesos de retroalimentación entre el testículo, la hipófisis y el sistema nervioso central, los que regulan los niveles circulantes de LH y FSH. La LH también llamada hormona estimulante de las células intersticiales (ICSH) por la acción que ejerce sobre estas células (Matsumoto, 1996), es una hormona de primordial importancia para la función testicular, dado que la deficiencia de esta hormona afecta al funcionamiento de este órgano reproductor. La FSH controla el número de células de Sertoli durante los periodos fetal y neonatal (Griffin, 1992), también se le relaciona con la regulación de la diferenciación y función de las células de Sertoli (Kierszenbaum, 1994) y junto con la T, se ha observado que la FSH incrementa el proceso de espermatogénesis (Griffin, 1992). Aunque este último también pudiera ser regulado por la transferrina e inhibina (Kierszenbaum, 1994). No obstante que los esteroides parecen ser los agentes primarios que ejercen efectos de retroalimentación en el sistema nervioso central, la FSH pudiera también tener efecto directo sobre las células germinales en el túbulo seminífero y aunque este concepto es todavía cuestionado, se pudiera reforzar con la observación de que los niveles plasmáticos de FSH se incrementan cuando los túbulos seminíferos son dañados (Sharpe, 1994).

Otras hormonas reguladoras incluyen a la PRL, la cual tiene mucha influencia sobre la esteroidogénesis y la hormona de crecimiento, que prepara la espermatogénesis porque actúa sobre las células de Leydig que han sido estimuladas previamente por la LH, su acción pudiera ser mediada por el factor de crecimiento insulinoide tipo 1 (IGF-1) sintetizado localmente (Hakovirta, 1993).

Las células de Leydig tienen una gran actividad metabólica caracterizada por su retículo endoplásmico liso, microtúbulos, mitocondrias, inclusiones lipídicas, lisosomas, cristales de Reinke y un prominente complejo de Golgi (Jégou, 1992) y en sus membranas se pueden apreciar numerosas microvellosidades. Estas células sintetizan T por el estímulo de LH y son portadoras de receptores de andrógenos, codificados por un gene ligado al cromosoma X, el cual puede ser causante de insensibilidad androgénica al sufrir una mutación genética o deleción. Las células de Leydig además pueden secretar factores parácrinos que actúan sobre las células de Sertoli para estimular la producción de interleucina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) (Griffin, 1992).

## 2.4. INFERTILIDAD POR CAUSA DE FACTOR MASCULINO

La infertilidad en el varón actualmente es un fenómeno muy común en parejas que no han podido lograr ningún embarazo. En 1990 Mosher y cols (Mosher, 1990) publicaron que el 45% de las parejas en edad reproductiva y sexualmente activas presentan periodos de infertilidad o son infértiles indefinidamente por causa del factor masculino y aunque no se cuenta con datos estadísticos más actualizados, se ha observado una tendencia hacia el incremento de esta causa de infertilidad entre las parejas jóvenes (De Ceis, 1996).

Se ha observado que esta causa de infertilidad contribuye con mucha frecuencia a que fracase el proceso de fecundación, o que ni siquiera se inicie este proceso como es el caso de: 1) individuos que tienen un alto porcentaje de espermatozoides inmóviles que son incapaces de llegar hasta el óvulo o con alteraciones morfológicas graves que les impidan desplazarse hasta el óvulo o que aunque puedan llegar hasta éste o a estar cerca de él, el reconocimiento especie-específico entre los gametos no se pueda verificar; 2) espermatozoides que tienen adecuada motilidad y son morfológicamente normales, pero que no son capaces de realizar la reacción acrosomal; 3) que las enzimas necesarias para atravesar las capas celulares (*cumulus oophorus*) y la capa de glicoproteínas (zona pelúcida) que cubren al óvulo, estén presentes en el acrosoma pero por alguna causa no funcionen adecuadamente, o que los espermatozoides no cuenten con estas enzimas por carecer de región acrosomal; 4) que en el eyaculado se encuentre un alto porcentaje de espermatozoides aparentemente normales, con adecuada motilidad, pero con anomalías genéticas, sobretodo de tipo numérico, y al descondensarse los núcleos de los gametos, etapa donde precisamente éstos ahora llamados pronúcleos se fusionan dentro del ovocito fecundado, para formar un solo núcleo; así, esta fusión no progresa hacia la segmentación en el desarrollo embrionario, por incompatibilidad numérica de cromosomas (Figa-Talamanca, 1994).

Algunas anomalías en la función reproductiva masculina pueden, por sí solas, ser insuficientes para causar infertilidad, pero cuando se combinan con problemas de la función reproductora femenina, aunque sean mínimos, pueden causar la infertilidad de

esa pareja (McMaster, 1993), como por ejemplo, cuando el moco cervical es hostil o contiene alguna sustancia tóxica que lo haga hostil, o el tracto genital femenino tenga algún proceso infeccioso; así los espermatozoides que no sean lo suficientemente aptos, no podrán llegar hasta el óvulo y fecundarlo (Skakkebaek, 1994). Es frecuente también el caso de falla ovárica o desarreglos hormonales femeninos combinados con oligoastenozoospermia (Matisson, 1990).

Tradicionalmente la infertilidad masculina es considerada como una condición patológica muy renuente al tratamiento, pero la razón principal de esta situación, es que en la mayoría de los casos se ignora la verdadera causa del problema y sin un adecuado diagnóstico no se puede ofrecer un tratamiento racional, y por lo tanto efectivo. En general, el tratamiento de la pareja infértil está a cargo del médico ginecólogo y como consecuencia, el factor masculino es poco estudiado (Jequier, 1993). Sin una historia clínica completa o una adecuada exploración física, donde se pongan de manifiesto las posibles causas de infertilidad, tales como hábitos de conducta cotidiana y sexual, estilos de vida, y actividades laborales, con consideración también del entorno más inmediato al individuo y los factores y agentes con los que tiene contacto en forma habitual o repetida, no es posible llegar a determinar la causa real de infertilidad masculina y aunque pudiera ser transitoria, por su naturaleza misma, podría hacerse permanente, dado que el agente causal no se evita (sustancias tóxicas), se reduce (agentes físicos) o se resuelve (infecciones o varicocele) (Figa-Talamanca, 1993).

Cuando se realiza un cuidadoso estudio del varón infértil, sólo en un bajo porcentaje de los individuos estudiados no se identifica la causa de infertilidad y con base en los estudios adecuadamente realizados y publicados, se ha podido conocer que la etiología de la infertilidad masculina se puede dividir en cuatro grupos: 1) la más común de las condiciones identificables es la disfunción testicular que produce una reducción en la cuenta espermática o espermatozoides funcionalmente anormales (Jequier, 1993); un enorme número de factores pueden causar esta condición, entre los que se pueden incluir el descenso tardío de los testículos, traumatismos, anormalidades genéticas, infecciones severas y algunas enfermedades en la niñez o adolescencia (Jequier, 1993); así como la exposición a sustancias tóxicas en forma crónica en la niñez o la adolescencia (De Celis, 1996); 2) la presencia de una lesión obstructiva que pueda interferir con la función de los vasos deferentes; 3) varones con problemas para lograr la erección o la eyaculación por causa de factores psicogénicos, tales como el estrés o

tratamientos con fármacos, por ejemplo, los antihipertensivos (De Celis, 1996), son problemas relativamente fáciles de resolver, aunque en la mayor parte de los casos no se resuelven. En el caso de pacientes que tienen problemas tanto de erección como de eyaculación debido a una lesión severa de la médula espinal por algún traumatismo, se observan problemas, no sólo para la eyaculación, sino también a nivel del proceso de espermatogénesis (Toledo, 1992) y 4) las enfermedades endocrinas también pueden generar infertilidad en el varón, tales como alteraciones en el eje hipotálamo-hipófisis-testículo (Reyes, 1993), enfermedad de Cushing, desórdenes tiroideos o problemas en los receptores a andrógenos (Toledo, 1992).

En muchas ocasiones, la infertilidad masculina se diagnostica y de alguna manera se trata con base solamente en el diagnóstico que resulta de la apariencia de las muestras de semen y de la aparente capacidad funcional de los espermatozoides que se observan en estas muestras, con lo cual es difícil establecer si efectivamente hay potencial para la reproducción o si los espermatozoides del paciente en evaluación son incapaces de fecundar por los mecanismos naturales (Calamera, 1988). Es difícil aun ahora encontrar estudios bien controlados e integrales de la infertilidad masculina (De Celis, 1996). Actualmente los pacientes varones con infertilidad ya sea primaria o secundaria, acuden a clínicas de reproducción asistida donde al examinar sus muestras de semen, sólo se puede seleccionar alguna de las estrategias ya establecidas para la capacitación de la muestra de semen *in vitro* y con ello prepararla para realizar alguna maniobra para conseguir el embarazo. Como por ejemplo, realizar una inseminación intrauterina, fertilización *in vitro*, o algún otro tipo de manejo de gametos que actualmente se realizan en centros de reproducción asistida de países desarrollados (Berg, 1997). En algunos países en vías de desarrollo tales como México, ahora ya se comienza a coleccionar las muestras de semen de pacientes infértiles y se intenta capacitarlas *in vitro*, pero en su gran mayoría son pacientes que previamente no han sido estrictamente estudiados y de los cuales, con mucha frecuencia podrían tenerse mas alternativas para lograr el embarazo sin manipulación de los gametos (Jequier, 1993). Una de las más importantes causas de infertilidad en México, al igual que en muchos países con alta actividad industrial, es la contaminación ambiental por tóxicos en el área de actividades laborales, lo cual es poco considerado como problema fundamental de la infertilidad y cuando es considerado, en muchas ocasiones no es fácil de resolver debido a la situación misma del

obrero (De Celis, 1996). Es entonces cuando el manejo de la pareja infértil por causa del factor masculino toma en consideración la posible participación de un donador de semen.

Es claro que las deficiencias de la motilidad espermática (Yovich, 1990) o las deficiencias para experimentar reacción acrosomal (Cummins, 1991) y la excesiva formación de especies reactivas del oxígeno (Rosselli, 1995) son alteraciones observadas en pacientes infértiles, pero poco se conoce acerca de la etiología de las mismas y sin conocer las causas que pudieran originar estas alteraciones, poco se puede hacer para prevenirlas o resolverlas. Actualmente, es más común observar alta tecnología en técnicas de reproducción asistida que han hecho posible la inyección de espermatozoides con defectos numéricos o funcionales a la subzona del ovocito (Sakka, 1992) o incluso dentro del citoplasma del ovocito (Palermo, 1992). En ninguna de esas publicaciones se menciona que hayan realizado una historia clínica detallada del paciente o el estudio de las posibles causas de la infertilidad.

En el futuro, el empleo de esas novedosas tecnologías en reproducción asistida traerán problemas de salud con implicaciones genéticas de consideración. Incluso hoy mismo ya es posible observar cómo pacientes con fibrosis quística que son infértiles por causa de ausencia congénita de conductos deferentes, a los cuales se les extrajeron espermatozoides de epidídimo, tuvieron hijos con fibrosis quística, sin la utilización de estas técnicas; esos pacientes no hubieran podido tener hijos por sí solos y de esta forma se evitaría el nacimiento de niños con deficiencias de salud (Patrizio, 1988; Olar, 1990; Rigot, 1991).

Es por todo esto que es necesario subrayar que el estudio de la infertilidad masculina no debe circunscribirse al análisis de las muestras de semen; es necesario indagar más acerca de la conducta sexual del paciente, de sus antecedentes clínicos, de su estilo de vida, de sus actividades domésticas y laborales y de su entorno inmediato, para de esa forma, tener una idea integral de las condiciones que pueden generar infertilidad en el paciente y si es posible, poder ofrecerle más alternativas de solución a su infertilidad, antes de manipular artificialmente sus gametos.

### 3. ANTECEDENTES

Actualmente se ha dado a conocer, a través de algunas comunicaciones, que del 10 al 15% de las parejas en el continente americano presentan periodos de infertilidad o son infértiles indefinidamente (Mosher, 1990). En poco menos de la mitad de los casos es por causa del factor masculino, a pesar de que la libido y funciones sexuales se conserven aparentemente normales (Jequier, 1983; Calamera, 1988; Matison, 1990). Los estudios realizados en esta área han sugerido que la exposición a ciertos tóxicos como sustancias químicas o agentes físicos que están presentes en el medio ambiente externo, doméstico o laboral, potencialmente pueden ejercer un efecto adverso sobre la fertilidad masculina (Lancranjan, 1975; Whorton, 1977; Braunstein, 1978; Whorton, 1979; Whorton, 1981; Wyrobek, 1983; Silbergeld, 1983; Foster, 1984; Assennato, 1987; Welch, 1988; Stachel, 1989; Winder, 1989; Ratcliffe, 1989; Paul, 1989; Daniels, 1990; Feichtinger, 1992; Scala, 1992; Bonde, 1993; Skakkebaek, 1994; De Celis, 1996), debido a que varios casos de infertilidad se han podido asociar con la exposición cotidiana a algunos tóxicos (Zenick, 1994). Este efecto tóxico en ciertos casos puede alterar el comportamiento sexual, con la disminución de la libido o la potencia sexual (Figa-Talamanca, 1994) y por consecuencia la fecundidad, por acción directa sobre las células germinales inmaduras durante la espermatogénesis y en la calidad del semen (Klinefelter, 1993), o actuar de manera adversa sobre el sistema nervioso central o periférico, sobre el sistema endocrino o sobre los órganos reproductores (MacMaster, 1993). En el sistema nervioso o endocrino, por ejemplo, cuando se modifica el balance hormonal en cuanto a los niveles séricos de T, de FSH o de LH (Baker, 1976) y en los órganos reproductores, cuando se ven afectadas las funciones epididimarias o testiculares (Aman, 1980), que por sí solas o en su conjunto, afectan la producción de gametos, su ciclicidad, transporte (MacMaster, 1993), capacidad fertilizante o la integridad de su genoma antes de la fecundación (Cummins, 1991).

En general, las características macro y microscópicas del semen reflejan la función testicular y en individuos expuestos a agentes tóxicos ambientales, se observan alteraciones en el proceso de espermatogénesis. Esto implica una baja eficiencia para la

reproducción por los mecanismos naturales ya que estos tóxicos, de alguna manera, bloquean este proceso en cualquiera de sus etapas (Kolmodin, 1989; Indulski, 1990).

El epitelio germinal es uno de los tejidos que tiene más riesgo genético, debido a que constituye una población celular que está en continua proliferación, por lo que es capaz de acumular los daños genéticos inducidos a través de toda la vida reproductiva del varón (Shelby, 1993) y reacciona con particular sensibilidad a los cambios que puedan ocasionarle algunos tóxicos que modifican su equilibrio biológico (Feichtinger, 1991) y que temporalmente sean capaces de alterar el proceso de la espermatogénesis. No obstante, cabe mencionar que todos los estadios de las células germinales, tales como espermatogonias en diferenciación, espermatocitos, espermatidas y espermatozoides, son estadios de corta duración, con lo que los daños genéticos acumulados tienen vigencia por un periodo de tiempo relativamente corto (Shelby, 1993).

Durante su desarrollo o al inicio de la pubertad, todo el sistema reproductor masculino es especialmente vulnerable al efecto nocivo de diversos factores ya sean químicos, físicos o biológicos, que puedan causarle daños irreversibles. Sin embargo, se sabe que el testículo humano de un individuo adulto puede funcionar en el umbral de la patología (Amann, 1980) y que su epitelio germinal es relativamente resistente a la toxicidad, ya que se ha demostrado que posee un tipo de espermatogonias denominadas A cero (o de reserva), que son capaces de dividirse bajo condiciones de niveles moderados de toxicidad para restaurar la población celular, con lo cual el proceso de espermatogénesis puede continuar en forma normal en la mayoría de los casos (Klinefelter, 1993). Las espermatogonias que están en maduración y que quizá son las más susceptibles al daño xenobiótico, están protegidas por la barrera hemato testicular, que de alguna manera regula el paso de ciertos agentes tóxicos que pudieran encontrarse en la circulación general. La penetración de algunos de ellos parece darse por difusión simple, de manera que las moléculas pequeñas o las liposolubles son las que con mayor frecuencia atraviesan esta barrera (Figa-Talamanca, 1994).

Desde hace por lo menos 20 años, a través de los estudios que se han realizado para describir los daños provocados por la exposición a agentes ambientales tóxicos, se ha comunicado que de aproximadamente cien compuestos de los que ha sido evaluado su efecto tóxico en el proceso reproductivo, muchos de ellos mostraron toxicidad en el varón

(Damstra, 1993), y las investigaciones han aportado sólidas evidencias de que algunos de estos tóxicos están presentes en el ambiente laboral (Skakkebaek, 1994).

Entre los agentes que provocan efectos adversos sobre el proceso de espermatogénesis, figuran los hidrocarburos aromáticos (Fredricsson, 1993), los hidrocarburos halogenados, tales como algunos nematocidas, por ejemplo el dibromocloropropano (DBCP) (Whorton, 1977; Egnatz, 1980; Levine, 1981; Lantz, 1981; Whorton, 1983; Potashnik, 1987; Olsen, 1990; Pease, 1991) u otros pesticidas como kepon (Whorton, 1977; Cannon, 1978), carbaril (Ratcliffe, 1987), dibromuro de etileno (Ter-Haar, 1981; Ratcliffe, 1987; Schrader, 1988) y algunos éteres de glicol, utilizados en la fabricación de pinturas, tintas o adhesivos (Welch, 1988). Otros disolventes como el disulfuro de carbono ( $CS_2$ ) (WHO, 1979; Vanhoorne, 1994) y ciertos metales pesados y no metales como plomo (Lancranjan, 1975; Braunstein, 1978; Wildt, 1983; Assennato, 1987; Winder, 1989), cadmio, boro (Smith, 1960; Krasovskii, 1976; Gennart, 1992), manganeso, mercurio (Lauwerys, 1985) talio, cobre (Holland, 1988) y la mayoría de todos los compuestos químicos o mezclas que son utilizadas para teñir, pintar o para sellar (Scala, 1992; Skakkebaek, 1994). Entre los tóxicos que se ha demostrado que son capaces de atravesar la barrera hemato testicular, figuran los hidrocarburos aromáticos o halogenados, algunos disolventes y el plomo (Figa-Talamanca, 1994).

Es probable que la exposición a estos agentes tóxicos con los que por lo general se tiene contacto por actividad laboral, sea cuando menos una de las causas del deterioro gradual de la calidad del semen que se ha observado en el transcurso de casi seis décadas (James, 1980) y que ésto contribuya a que la infertilidad por causa del "factor masculino" se haya incrementado actualmente. Las modificaciones en la calidad del semen que se han observado a través del tiempo han hecho necesarios ciertos ajustes en los parámetros de normalidad, es decir, mientras que en los años 40's un individuo era considerado normal si tenía 100 millones de espermatozoides o más por ml y del 70 al 80% de espermatozoides morfológicamente normales (Carlsen, 1992), entre las décadas de los 50's y 60's se redujo esta cantidad a un promedio de  $60 \times 10^8$  células por ml, con un porcentaje de 50% o más de formas normales (Schirren, 1961). Actualmente, de acuerdo con los criterios vigentes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), sólo requiere de 20 millones de espermatozoides, de los cuales sólo el 30% o más con morfología normal, para ser considerado como un individuo potencialmente fértil (WHO, 1995). Posiblemente entre las causas que han deteriorado la calidad del semen se

encuentra el aumento de factores ambientales tóxicos (Figa-Talamanca, 1994) o el incremento de los efectos adversos de estos factores por un fenómeno de potenciación debido a la exposición combinada de alguno de ellos, o por el contacto múltiple simultáneo, o simplemente por una exposición muy prolongada a estos tóxicos. Actualmente ya se ha comenzado a considerar también como posibles agentes causales los estilos de vida tales como fumar tabaco, marihuana y/o el consumo de otras drogas o alcohol o simplemente por estar sometido a continuo estrés (Vanhoorne, 1993).

La mayoría de las investigaciones realizadas para valorar el efecto tóxico de algunas de las sustancias que ya se han mencionado, han demostrado que en los individuos que están expuestos a estos agentes en forma crónica (por más de seis meses), primero se observa una disminución de la motilidad de los espermatozoides y si se continúa la exposición, se observa una reducción del número de espermatozoides en el eyaculado (Matison, 1990). Este hallazgo en el semen es denominado oligoastenozoospermia (WHO, 1995). Esta es una de las patologías que se presentan con mayor frecuencia en los individuos infértiles (Ohashi, 1992) y se define como aquella alteración en que la concentración espermática es menor a 20 millones de espermatozoides por ml y la motilidad rápida y progresiva o lineal progresiva lenta está disminuida o es nula, y aún cuando la morfología celular sea normal, la calidad de ese semen no es adecuada para la fecundación por los mecanismos naturales (Marchini, 1991). Esta entidad patológica de oligoastenozoospermia que afecta al proceso de reproducción, tiene en algunos casos, un origen desconocido. Se le ha tratado de asociar con ciertos eventos, como desequilibrios hormonales, anomalías genéticas, alteraciones congénitas, infecciones o sustancias tóxicas en el plasma seminal (Feichtinger, 1991; Indulski, 1990).

Prácticamente todas las actividades en la industria involucran la exposición a ciertos materiales tóxicos. Los disolventes orgánicos empleados en la fabricación de numerosos productos, son generalmente mezclas de tetracloruro de carbono, benceno, trementina, lacas, "thinner", xileno, tolueno, n-hexano, cloruro de metileno y dicloruro de etileno (Sato, 1987). De todos éstos, los que siempre están presentes en las mezclas son el benceno y el tolueno (Grimmer, 1983), ambos hidrocarburos de la serie aromática.

Al tolueno se le ha clasificado como un disolvente tóxico que puede ser tolerado por los trabajadores en concentraciones menores a 100 ppm en el aire ambiental por períodos cortos de tiempo (menores a seis horas continuas). En dosis más altas es capaz de

causar la muerte por afección cardíaca y a dosis bajas pero crónicas, puede afectar al sistema nervioso central y además resultar como un agente nefro y/o hepatotóxico (Landers, 1991).

El benceno es considerado como un disolvente tóxico que es capaz de afectar al sistema nervioso central. La exposición a altas dosis de benceno (mas de 10 ppm en el aire ambiental), puede causar alteración cardíaca y respiratoria, mismas que pueden conducir a la muerte del individuo que esté en este caso (Yardley-Jones, 1991). La exposición a benceno en dosis bajas o moderadas, pero crónicas puede causar leucemia (Kuiper-Goodman, 1977). Incluso se han publicado investigaciones clínicas que demuestran que un individuo puede desarrollar leucemia varios años después de que la exposición a este disolvente se ha suspendido (Mason, 1985).

Se ha publicado que obreros expuestos crónicamente a hidrocarburos aromáticos, entre ellos, benceno y tolueno, por periodos mayores a seis meses, han desarrollado enfermedades que alteran el índice de la proliferación celular, porque son agentes potencialmente carcinogénicos, y afectan especialmente a la piel, pulmón, hígado y vejiga (Buchet, 1995), así como también inducen el intercambio de cromátidas hermanas y la formación de micronúcleos (Mns) en diferentes linajes celulares (Tafazoli, 1995; Chorazy, 1994).

La ruptura de cromosomas y el funcionamiento defectuoso del huso acromático durante la división celular, inducidos por los hidrocarburos aromáticos, causa pérdida de cromosomas o de fragmentos de cromosomas durante la anafase. Durante la telofase, este material rezagado es rodeado por una envoltura nuclear, lo que da origen a uno o varios núcleos secundarios en las células hijas. Estos Mns son mas pequeños que el núcleo principal y en ocasiones están separados de éste, lo que facilita observarlos; o se encuentran en cercanía, sobrepuestos al núcleo principal, como sucede en los espermatozoides de ratón, tratados con agentes quelantes o radiación ionizante (Russo, 1992; Tate, 1992).

Las características tóxicas de los hidrocarburos están determinadas por sus propiedades fisicoquímicas (Sato, 1987) y en particular por las que a continuación se describen:

La presión de vapor de estos disolventes determina su volatilidad, misma que los hace capaces de tener una gran dispersión en el medio ambiente de trabajo, con lo cual se facilita su ingreso al organismo por medio de la vía respiratoria y la piel, alguna fracción es excretada por las mismas rutas (Lauwerys, 1983). Después de su inhalación, a través de los alvéolos pulmonares, se difunden a la sangre y son transportados por todo el organismo por el sistema circulatorio, para su distribución en los diversos tejidos del organismo (Lauwerys, 1985).

Los coeficientes de partición específicos de estos disolventes que expresan su distribución en diferentes fases, tales como agua/sangre y agua/lípido, se han correlacionado con su mayor facilidad de adsorción en el aparato respiratorio y en la piel, con una biodistribución y bioacumulación en órganos con alto contenido de lípido y aún con su efecto depresor o narcótico en el sistema nervioso central (Sato, 1987; Bergman, 1973).

Las alteraciones en la salud que resultan por la exposición a disolventes orgánicos varían considerablemente, de acuerdo con el patrón de exposición en cuanto a su duración y a la concentración ambiental en el sitio de trabajo (Bergman, 1979). Pero en general, se distinguen efectos tóxicos por exposición aguda o crónica; ésta última, según lo establecido por Angerer (Angerer, 1985), se refiere a las alteraciones que se producen en los trabajadores, que por lo menos tienen tres meses de exposición cotidiana o repetida, a concentraciones relativamente bajas o moderadas.

El mismo autor refiere que en ese patrón de exposición, la toxicidad crónica está determinada fundamentalmente por la adición de los efectos nocivos, debidos a la acción continua del disolvente orgánico, en su composición original o de sus metabolitos, ya que por el análisis de la cinética de estas sustancias, se ha demostrado que una fracción importante de sus metabolitos es rápidamente excretada por vía urinaria y otra fracción es retenida por mucho tiempo en el organismo (Angerer, 1985; Lauwerys, 1983).

Los índices de exposición a tóxicos y sus valores límite, de acuerdo al tipo de compuesto químico de que se trate, más comúnmente aceptados en los Estados Unidos de Norteamérica son los TLV (Threshold limit value) y los BEI (Biological exposure indices) y fueron propuestos en la "American conference governmental industrial hygienists" en 1994 (ACGIH, 1994).

Los TLVs representan, con ciertas excepciones, el promedio de la concentración tiempo-peso (TWAs) de las sustancias volátiles asociadas al ambiente de las actividades de un área industrial, es el indicador de la composición del aire ambiental externo que rodea al obrero. Estas guías fueron diseñadas para conservar la salud de trabajadores que se exponen crónicamente durante 7 a 8 h diarias o 40 h a la semana y no sólo durante su vida como obrero sino hasta después de su jubilación (ACGIH, 1994).

Los BEI representan los niveles de un químico específico o agente tóxico o de sus metabolitos en un tejido, fluido o aire de exhalación, en los cuales sea factible prevenir la respuesta biológica adversa para la salud de los obreros expuestos a estos tóxicos, sin considerar el momento en que el tóxico fue inhalado, ingerido o absorbido por la piel (ACGIH, 1994).

Los TLV contenidos en los BEI, establecen que los compuestos que tienen en su estructura, un anillo de carbonos con un hidrógeno por carbono unido por energía que puede dar origen a diferentes formas por resonancia, tales como el benceno, tolueno y xileno, no deben de estar en concentraciones mayores a 10, 100 y 100 ppm, respectivamente (ACGIH, 1994).

## 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad, muchos estudios epidemiológicos se han realizado para investigar si algunos tóxicos con los que se tiene contacto por exposición laboral, tienen alguna participación en la etiología de la infertilidad masculina. Esto ha sido motivado porque de 1965 a la fecha, se ha observado un inexplicable incremento de la frecuencia de infertilidad en parejas muy jóvenes (de entre 15 y 24 años) (Mosher, 1990; Matison, 1990) y al considerar que el sistema reproductor de un individuo joven es especialmente vulnerable, los daños que pueda sufrir en este caso podrían resultar irreversibles. Cabe mencionar que puede existir la participación de algunos estilos de vida en el incremento de la infertilidad de los individuos jóvenes; tales estilos de vida se refieren a la dieta, el ejercicio, el tipo de ropa, estar sometido a estrés continuo, el fumar tabaco, marihuana y/o la adicción a otras drogas o al alcohol (Skakkebaek, 1994). Mucho se ha documentado sobre las alteraciones que provocan estos hábitos, sobre todo en el sistema endocrino y en el reproductor. Por otra parte, estos estilos de vida pueden ser factores que deterioran en gran medida la salud de los individuos y de esta forma facilitan que algunos tóxicos del ambiente laboral repercutan de manera más agresiva sobre la capacidad reproductiva, esta interrogante aún permanece por dilucidar.

En estudios realizados en poblaciones de obreras en Estados Unidos de Norteamérica y en algunas poblaciones de Europa, se ha encontrado que tanto el benceno como el tolueno son capaces de deteriorar la capacidad reproductiva femenina, porque pueden inducir ciclos anovulatorios, bloquear la implantación o provocar abortos, entre otras alteraciones (Figa-Talamanca, 1994). Sin embargo, no hay información que contenga datos concluyentes acerca de los efectos que estos disolventes pueden ejercer sobre la calidad del semen o sobre el potencial de fertilidad masculina en población mexicana, con los estilos de vida actuales que esta población presenta.

Con base en lo anterior, el interés de la presente investigación fué estudiar cual es la contribución de las actividades laborales, especialmente la exposición cotidiana a benceno y tolueno, en la frecuencia de alteraciones en el semen de una población de obreros mexicanos, expuestos cotidianamente a estos disolventes orgánicos en una fábrica de empaques y mangueras de plástico.

## **5. HIPÓTESIS**

Los varones que están expuestos en forma cotidiana a mezclas de disolventes orgánicos que contienen benceno o tolueno o ambos, presentan alteraciones en el proceso de espermatogénesis.

## **6. O B J E T I V O S**

### **6.1. OBJETIVO GENERAL**

Conocer las características del semen de una población de obreros, que manejan cotidianamente benceno y tolueno, que laboran en una fábrica de empaques y mangueras de plástico ubicada en Xalostoc, Estado de México.

### **6.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

**6.2.1.** Conocer las características del semen de esta población de obreros estudiada.

**6.2.2.** Determinar la correlación entre la presencia de micronúcleos (Mns) en las células germinales inmaduras del semen eyaculado de estos obreros y el tiempo que han estado expuestos a benceno y tolueno.

**6.2.3.** Determinar la asociación entre las características del semen y las concentraciones de metabolitos de benceno y tolueno en la orina en estos obreros.

## **7. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **7.1. DISEÑO DEL ESTUDIO**

#### **7.1.1. UNIVERSO DE TRABAJO**

Varones de 18 a 45 años de edad, trabajadores de una fábrica de empaques y mangueras de plástico, ubicada en Xalostoc, Estado de México.

**7.1.1.1. GRUPO DE VARONES EXPUESTOS:** obreros del área de producción de la fábrica estudiada, expuestos a benceno y tolueno, por tres meses o más.

**7.1.1.2. GRUPO DE VARONES NO EXPUESTOS:** empleados del área administrativa de la misma fábrica y que no estaban expuestos a benceno ni a tolueno.

#### **7.1.2. SELECCIÓN DE LA MUESTRA**

**7.1.2.1. TAMAÑO DE LA MUESTRA:** Se estudiaron 32 obreros expuestos y 27 varones no expuestos.

#### **7.1.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE LOS OBREROS EXPUESTOS**

Edad de 18 a 45 años.

Normalidad de las funciones sexuales.

Fertilidad comprobada por haber procreado hijos previamente al estudio.

Sin patologías asociadas.

Sin hábitos de ingesta frecuente de fármacos, alcohol o tabaquismo positivo (de más de cinco cigarrillos diarios).

Con exposición crónica a benceno y tolueno por tres meses o más.

Sin antecedentes de exposición a material radioactivo.

Sin antecedentes de terapia con antineoplásicos.

Que sean habitantes de la Ciudad de México o del Estado de México.

#### **7.1.4. CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN DE LOS OBREROS EXPUESTOS**

No se incluyeron al estudio los individuos que presentaron infertilidad secundaria previa a la fecha de inicio de la exposición a disolventes orgánicos.

#### **7.1.5. CRITERIOS DE INCLUSIÓN PARA LOS VARONES NO EXPUESTOS**

Edad de 18 a 45 años.

Normalidad de las funciones sexuales.

Fertilidad comprobada por haber procreado hijos previamente al estudio.

Sin patologías asociadas.

Sin hábitos de ingesta frecuente de fármacos, alcohol o tabaquismo positivo (de más de cinco cigarrillos diarios).

Sin exposición a benceno o tolueno.

Sin antecedentes de exposición a material radioactivo.

Sin antecedentes de terapia con antineoplásicos.

Que sean habitantes de la Ciudad de México o del Estado de México.

## **7.2. DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS**

A todos los participantes se les elaboró una historia clínica, examen físico completo y se les aplicó un cuestionario dirigido para conocer su entorno inmediato y descartar posibles interacciones con otros agentes tóxicos del medio externo o doméstico, que hubieran podido interferir con los resultados del estudio. Se anexa al presente el cuestionario que fue aplicado.

Se informó a todos los participantes sobre las características y objetivos del estudio y se aclararon todas sus dudas al respecto, antes de firmar su carta de consentimiento informado (formato en anexo) para su participación en el proyecto. A cada participante se le dió a conocer los resultados de las espermato BIOSCOPIAS realizadas y los reportes correspondientes fueron anexados a los expedientes del Departamento Médico de la Empresa.

### **7.2.1. MUESTRAS DE SEMEN**

Cada participante fue evaluado por medio de tres espermato BIOSCOPIAS, realizadas en el transcurso de dos meses para considerar valores promedio (WHO, 1995). Las muestras fueron obtenidas por masturbación después de tres días de abstinencia de eyaculación y en el día quinto de la semana laboral, con lo que fue posible evaluar a las muestras de semen en el día en que la concentración de los disolventes y de sus metabolitos era mas alta en el organismo, porque se acumularon en toda una semana laboral, de acuerdo a lo establecido por Angerer (Angerer, 1985). Las muestras de semen fueron procesadas en el Laboratorio de análisis clínicos de la unidad de medicina familiar "La Villa" del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), que se encuentra ubicada aproximadamente a 300 metros de la fábrica.

#### **7.2.1.1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y pH**

Cada muestra se colectó en un recipiente de vidrio y se mantuvo a 37° C durante 60 min para facilitar y evaluar su licuefacción, misma que se calificó como completa o

incompleta. La viscosidad se clasificó como normal o densa en grado 1, 2 o 3, según fuera el caso. La apariencia, como homogénea o heterogénea. El pH se midió con tiras reactivas con un rango de 7.5 a 14. El volumen total del eyaculado se midió en tubos cónicos y graduados de vidrio.

#### **7.2.1.2. AGLUTINACIÓN ESPERMÁTICA**

Para determinar el tipo y porcentaje de la aglutinación de los espermatozoides de las muestras de semen, se revisaron diez campos microscópicos con objetivo 40x y se cuantificó el porcentaje de espermatozoides aglutinados y el tipo de asociación que tenían, ya fuera cabeza-cabeza, flagelo-cabeza, flagelo-flagelo o asociación mixta.

#### **7.2.1.3. CUENTA ESPERMÁTICA**

El número de células espermáticas por ml se determinó por medio de una cámara de Neubauer, donde el semen se tomó con una pipeta para cuenta de leucocitos o de "sali" y se diluyó con una solución salina fisiológica que contenía 3.7% de formaldehído, hasta lograr una dilución de 1:20 y se mezcló perfectamente. El líquido del tallo de la pipeta fué descartado y por un proceso de capilaridad se prepararon las cámaras de Neubauer, mismas que se depositaron en cámara húmeda por 10 min y después se observaron por microscopía óptica en contraste de fases con objetivo 40x (Zukerman 1977, WHO, 1995).

#### **7.2.1.4. MOTILIDAD ESPERMÁTICA**

De cada muestra se tomó un volumen de 10  $\mu$ l y se depositó en un portaobjetos, se cubrió con un cubreobjetos de 22 x 22 mm, y se observó la motilidad de los espermatozoides por medio de microscopía óptica en contraste de fases a 40x para identificar las siguientes categorías: grado III, progresión rápida y lineal; grado II, progresión lenta o moderada pero lineal; grado I, motilidad *in situ*, no progresiva; grado 0, células inmóviles (Bartoov, 1991; Mathieu, 1992; WHO, 1995). Se realizó una sumatoria de los porcentajes de motilidad grado III más grado II, el resultado que se obtuvo fué el porcentaje considerado para establecer normalidad o astenozoospermia en las muestras de semen. De acuerdo a los criterios de la OMS 1995, se consideraron normales las muestras que tuvieran una sumatoria de grado III más grado II igual o superior a 50%, o que el porcentaje de motilidad grado III fuese igual o superior al 25%, o que el porcentaje de motilidad grado II fuese igual o superior a 50%.

### **7.2.1.5. MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA**

La morfología de los espermatozoides fue evaluada por medio de tinción de Papanicolaou modificada para espermatozoides (WHO, 1995) y microscopía óptica con el objetivo de inmersión en aceite y con base en los criterios de la OMS, se registraron las formas normales, defectos en cabeza, pieza media y flagelo (WHO, 1995; Menkveld, 1991).

### **7.2.1.6. VIABILIDAD ESPERMÁTICA**

La viabilidad espermática se valoró por medio de tinción con azul de tripano, donde 100µl de semen se depositaron en tubos de vidrio y se incubaron con 100µl de una solución de azul de tripano al 1%, en solución salina, por 10 min a una temperatura de 37°C; después se observaron por microscopía óptica en contraste de fases con objetivo 40x (Cook, 1990).

### **7.2.1.7. BACTERIAS Y DETRITOS CELULARES**

La presencia de bacterias y detritos celulares se cuantificó en esta preparación en fresco y se realizaron estimaciones gruesas. Posteriormente, la concentración de bacterias por ml se calculó con el empleo de la técnica de "inmersión del portaobjeto", para la cual se depositó 50 µl de semen con una aguja hipodérmica estéril (21G; 12.5µl) en un portaobjeto, se extendió uniformemente y se dejó de 48 a 72 h a temperatura ambiente. La cantidad de bacterias por ml se calculó por la multiplicación de la cantidad de colonias que se encontró en el portaobjeto por un factor de 80 (WHO, 1995). La concentración de bacterias se clasificó en grados desde grado uno hasta grado seis, de acuerdo al siguiente patrón:

Grado I para una concentración de cero hasta  $1 \times 10^3$  Unidades formadoras de colonias (UFC) por ml.

Grado II para una concentración de  $1.1 \times 10^3$  hasta  $2 \times 10^3$  UFC / ml.

Grado III para una concentración de  $2.1 \times 10^3$  hasta  $3 \times 10^3$  UFC / ml.

Grado IV para una concentración de  $3.1 \times 10^3$  hasta  $4 \times 10^3$  UFC / ml.

Grado V para una concentración de  $4.1 \times 10^3$  hasta  $5 \times 10^3$  UFC / ml.

Grado VI para una concentración de  $5.1 \times 10^3$  hasta  $6 \times 10^3$  UFC / ml.

### 7.2.1.8. LEUCOCITOS

Se registró también el porcentaje de células positivas a peroxidasa (leucocitos) y células negativas a peroxidasa (células germinales inmaduras), por tinción para peroxidasa con azul de orto-toluidina, para la cual se mezcló 0.1 ml de semen con una solución compuesta por 1 ml de una solución saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (25g/100 ml); 1 ml de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  al 5% (v/v) en amortiguador de fosfatos 0.1M, pH 6.0; 9 ml de orto-toluidina al 0.025% (v/v), mas 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% (v/v) en agua destilada. La mezcla del semen con el reactivo se agitó por espacio de 2 min, después se dejó en reposo durante 20-30 min a temperatura ambiente y se volvió a agitar. Se tomó un volumen de 10 $\mu\text{l}$  y se colocó en portaobjetos, el cual se cubrió con un cubreobjetos de 22 x 22 mm y se observó por medio de microscopía óptica con objetivo 40x. Se hizo una estimación del porcentaje de células peroxidasa-positivas y negativas en los preparados en fresco (Nahoum, 1980). La concentración de células germinales inmaduras y leucocitos se calculó al multiplicar el número de estas células por cada 100 espermatozoides, por la densidad espermática por ml y dividido entre 100 (WHO, 1995).

### 7.2.1.9. CÉLULAS GERMINALES INMADURAS CON MICRONÚCLEOS (C3I/Mns)

Posteriormente al análisis inicial, cada muestra fue centrifugada 15 min a 400g, el sobrenadante fue descartado y el paquete celular fue resuspendido en 5 ml de "Testes Isolation Medium" (TIM) (Dietrich, 1983), la mezcla fue centrifugada 15 min a 400g y el sobrenadante fue descartado nuevamente; este lavado de células fue repetido dos veces.

**COMPOSICIÓN DEL TIM** (Dietrich, 1983 ) Cada 10 L de TIM contienen: NaCl (60.5g), KCl (33.9g),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (1.8g),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (3g),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (8.5g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.9g), Glucosa (10g) y de 8 a 20 ml de solución de rojo fenol al 5%. La osmolaridad debe ser de 300 mOsmol / L y el pH de 7.2-7.3.

Se tomaron 100 $\mu\text{l}$  de suspensión celular y se depositaron sobre un portaobjetos, se dejaron sedimentar por espacio de 15 min. A las preparaciones se les añadió 50 $\mu\text{l}$  de fijador de Helly (Conn, 1960) y se mezclaron suavemente con las gotas de suspensión celular. Después de una hora de fijación, las laminillas fueron sumergidas en etanol al 70%, donde se mantuvieron hasta el momento de su tinción.

Las preparaciones fueron teñidas con el método de PAS (Conn, 1960) y posteriormente teñidas con hematoxilina de Mayer (Sigma) al 15% por 20 min. Se lavaron bajo una corriente suave de agua común y fueron deshidratadas en una serie creciente de etanol (70 80 y 96%) por espacio de 3 min en cada cambio, las preparaciones fueron aclaradas con mezclas de alcohol-xileno (1:1), después se sumergieron en xileno, dos veces, en dos recipientes distintos, por espacio de 5 min en cada recipiente, posteriormente fueron montadas con bálsamo de Canadá.

Con este procedimiento de tinción fue posible observar los acrosomas rosados o rojos, el citoplasma de color violeta a azulado, los núcleos y micronúcleos (Mns) de color azul (Tates, 1983). En las laminillas preparadas fueron revisados todos los campos microscópicos posibles, por un movimiento de zig zag con el objetivo de inmersión en aceite, donde se buscó la presencia de Mns en el citoplasma de las células germinales inmaduras en las 5 preparaciones (Tates, 1983; Russo, 1992). El porcentaje de células germinales inmaduras con micronúcleos (CGI/Mns) se calculó por medio de la división del número de CGI/Mns entre el número de células germinales inmaduras (CGI) encontradas en las 15 laminillas de cada paciente (que equivalen a cinco laminillas por cada muestra) y el resultado se multiplicó por cien (Tates, 1983; Russo, 1992; Tates, 1992).

## **7.2.2. MUESTRAS DE ORINA**

A todos los integrantes de ambos grupos se les realizaron determinaciones de metabolitos urinarios de benceno y tolueno por medio de la técnica de Ogata y cols (Ogata, 1988) por cromatografía de líquidos de alta resolución HPLC-UV (Sistema Shimadzu LC-6A). La presencia de estos metabolitos fue considerada como indicador biológico de la exposición a estos disolventes (Sollenberg, 1977; Ogata, 1988).

El mismo día de obtención de la tercera muestra de semen (quinto día de la semana laboral) se recolectaron tres muestras de orina, una por la mañana, antes de la jornada, otra aproximadamente a la mitad y otra al final de su jornada. La primera recolección se realizó en casa, la segunda y tercera en el área de trabajo. Las tres muestras fueron depositadas en recipientes de vidrio que contenían algunos cristales de timol, para evitar la proliferación de bacterias y se mantuvieron en refrigeración (entre 4 - 8 °C) hasta su procesamiento. Se mezclaron las tres muestras de cada participante en un solo recipiente

de vidrio para realizar una sola determinación de toda la orina colectada en la jornada laboral del quinto día.

#### 7.2.2.1. ÁCIDO HIPÚRICO (AH)

Se realizó la determinación de ácido hipúrico (AH) como indicador biológico de la exposición a tolueno por HPLC-UV. Se hizo una determinación de creatinina en una alícuota de orina según la técnica de Tietz (Tietz, 1976). Se tomó un volumen de 1 ml de la muestra de orina, perfectamente mezclada y se colocó en un tubo cónico de 15 ml para centrifugar, se le añadió 40  $\mu$ l de HCl concentrado, se mezcló y se le añadió 0.3 g de NaCl y 4 ml de acetato de etilo, se agitó por 2 min. Se centrifugó a 100 g por 5 min y se transfirieron 200  $\mu$ l de la capa orgánica a un tubo donde se evaporó a sequedad con el empleo de un baño de María y una suave corriente de nitrógeno. Se redisolvió el residuo en 200  $\mu$ l de agua destilada.

Se prepararon los estándares según las instrucciones del fabricante y se analizaron simultáneamente estándares, muestras problema, controles y blancos. Se tomaron 5  $\mu$ l de la muestra para HPLC-UV, se monitorearon a una longitud de onda de 254 nm. La fase móvil empleada fue una solución mixta de [agua/acetonitrilo/ácido acético glacial (90/10/0.2% v/v)] 3 ml / min (Lauwerys, 1983; Sollenberg, 1977; Matsui, 1978).

#### 7.2.2.2. ÁCIDO MANDÉLICO (AM)

Para el monitoreo biológico del benceno, se empleó el método de hidrólisis enzimática del contenido de ácido mandélico (AM) urinario por cromatografía de gases, (Ogata, 1988; Dimikis, 1974); éste método se empleó como pretratamiento para la HPLC-UV.

El jugo de *Helix pomatia* (que contiene  $\beta$  glucoronidasa y sulfatasa) se diluyó cinco veces en amortiguador de acetato de sodio 0.2M pH 5.0; de esta dilución se tomaron 100  $\mu$ l que se añadieron a una mezcla de 100  $\mu$ l de orina y 800  $\mu$ l de amortiguador de acetato de sodio 0.2 M, pH 5.0.

La mezcla final se incubó 6 h a 37°C, posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por 5 min. Del sobrenadante se tomaron 10  $\mu$ l para la HPLC-UV. La fracción del ácido mandélico se monitoreó a una longitud de onda de 210 nm. La fase móvil fue una solución mixta de

[20]mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 3.3) que contenía sodio 1-decano sulfonato 1mM/ $\text{CH}_3\text{CN}$  (85/15) (Cgata, 1988).

Los resultados de los metabolitos urinarios fueron expresados, después de la corrección de la concentración de creatinina y fueron comparados con el índice de exposición biológica a tóxicos (BEI), donde se propuso un límite de AH normal en individuos expuestos a tolueno, de 1.5 g/g de creatinina. Lauwerys y cols. proponen un tentativo valor permisible máximo de 2.5 g/g de creatinina (Lauwerys, 1983). Para los individuos expuestos a benceno (etilbenceno y estireno), el BEI propone un límite de AM máximo de 0.8 g/g de creatinina.

La exposición a la mezcla de disolventes fué considerada como elevada cuando la suma de los cocientes de los niveles obtenidos entre el nivel normal propuesto por la BEI de los diferentes metabolitos fue mayor a uno. La fórmula utilizada para calcular la exposición a las mezclas fue la siguiente:

$$\text{AH} / \text{BEI de AH} + \text{AM} / \text{BEI de AM} = 1$$

Donde: BEI de AH o de AM es el valor establecido como normal de exposición.

### **7.2.3. MUESTREO DEL AIRE AMBIENTAL DE LA FÁBRICA Y OFICINAS**

El método de muestreo utilizado para evaluar la concentración de los solventes en el ambiente interior de la fábrica fué por medio de cilindros de carbón activado que captaron muestras de aire ambiental en forma continua durante 8 h y posteriormente fueron enviados a análisis al laboratorio para determinar el tipo de disolvente y su concentración. En las oficinas administrativas se utilizó el mismo método de muestreo para confirmar que en el aire ambiental de esas áreas no había hidrocarburos.

## **7.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para buscar diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la edad entre ambos grupos estudiados se utilizó análisis de varianza. Para expresar los resultados de las

muestras de semen, se calcularon medias geométricas y sus desviaciones estándar, dado que los valores obtenidos no presentaron distribución normal. Para el análisis estadístico de los resultados de las muestras de semen y de orina se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney [Minitab para Windows, versión 10. MINITAB Inc. PA, (USA), 1994].

Se calculó el coeficiente de correlación de Spearman para la evaluación de la significancia estadística entre las alteraciones encontradas en el semen y los metabolitos urinarios cuantificados [Number Cruncher Statistical System, versión 4.21. Utah (USA), 1986].

Fue realizada una prueba de Chi cuadrada para comparar las diferentes características del grupo de obreros expuestos y el grupo de varones no expuestos. En los casos de que alguna de las categorías registró cinco individuos o menos, se realizó la prueba exacta de Fisher para realizar el análisis [Minitab para Windows, versión 10. MINITAB Inc. PA, (USA), 1994].

#### **8.4.1.2. VISCOSIDAD**

La viscosidad del semen fue clasificada como acuosa, normal o densa (en 1°, 2° o 3° grado) y en el grupo de obreros expuestos se observó que sólo el 12.5% (cuatro obreros) presentó viscosidad normal; los demás (28 obreros) presentaron viscosidad densa en 1°, 2° y 3° grado en 21.9%, 31.3% y 34.4%, respectivamente. Ningún obrero presentó viscosidad acuosa. En el grupo de varones no expuestos, el 66.7% (18 varones) presentó viscosidad normal, sólo 33.3% (nueve varones) presentaron viscosidad anormal, con 14.8%, 11.1% y 7.4% para densidad de 1°, 2° y 3° grado, respectivamente. En este grupo tampoco se encontró ningún eyaculado con viscosidad acuosa. Al comparar la viscosidad de las muestras de semen de ambos grupos se encontró que el grupo de obreros expuestos presentó eyaculados de mayor viscosidad que el grupo de varones no expuestos a hidrocarburos (RM de 14.00,  $p < 0.001$ ) (Tabla 4). Al relacionar el tiempo de exposición a los tóxicos en los obreros expuestos, con la viscosidad de sus eyaculados, se encontró cierta tendencia a incrementarse la viscosidad conforme mayor era el tiempo de exposición. También se observó que los individuos que comenzaron su exposición a los tóxicos más jóvenes, presentaron viscosidad más densa y los que comenzaron su exposición más tardíamente, en general, presentaron viscosidad normal (Tablas 5 y 6).

#### **8.4.1.3. LICUEFACCIÓN**

Debido a la densidad de las muestras de los obreros expuestos, se observó que sólo el 34.4% (11 obreros) completó su licuefacción, en el restante 65.6% (21 obreros) no se observó licuefacción o se presentó licuefacción incompleta, con persistencia de coágulos de moco. En el grupo de varones no expuestos, el 70.4% (19 varones) presentó licuefacción completa y sólo el 29.6% (ocho varones) presentó licuefacción incompleta. Cuando se realizó la comparación de ambos grupos, se observó que los eyaculados de los varones no expuestos presentaron mayor capacidad para licuarse, que los eyaculados del grupo de obreros expuestos (RM 4.53,  $p < 0.01$ ) (Tabla 4). Se encontró también cierta tendencia a conseguir la licuefacción conforme era menor el tiempo de exposición a los disolventes y más tardío el inicio a la exposición a estos tóxicos (Tablas 7 y 8).

Tabla 4 Viscosidad y licuefacción del semen del grupo de obreros expuestos y el grupo de varones no expuestos.

VARIABLES	Expuestos n=32	No Expuestos n=27	RM	IC 95%	P
Viscosidad normal	4	18			
anormal	28	9	14.00	3.27-68.51	p < 0.001
Licuefacción completa	11	19			
incompleta	21	8	4.53	1.33-15.89	p < 0.01

Tabla 5 Porcentaje de los diferentes grados de viscosidad de acuerdo al tiempo de exposición a los hidrocarburos.

Tiempo de Exposición	Viscosidad normal	Viscosidad grado I	Viscosidad grado II	Viscosidad grado III
3 a 5 años n = 12	16.6 %	33.3 %	33.3 %	16.6 %
6 a 9 años n = 11	9.2 %	18.2 %	36.3 %	36.3%
10 a 15 años n = 9	11.2 %	11.3 %	22.3 %	55.2 %

Tabla 6 Porcentaje de los diferentes grados de viscosidad de acuerdo a la edad de inicio a la exposición a los hidrocarburos.

Edad de inicio a la exposición	Viscosidad normal	Viscosidad grado I	Viscosidad grado II	Viscosidad grado III
15 a 20 años n = 22	4.5 %	13.6 %	36.4 %	45.5 %
21 a 25 años n = 6	17.0 %	33.2 %	33.2 %	16.6%
26 a 30 años n = 4	50.0 %	50.0 %	0 %	0 %

Tabla 7 Capacidad de las muestras para licuarse en relación al tiempo de exposición a benceno y tolueno.

Años de exposición	Licuefacción completa	Licuefacción incompleta
3 a 5 años n = 12	50 %	50 %
6 a 9 años n = 11	36 %	64 %
10 a 15 años n = 9	22 %	78 %

Tabla 8 Capacidad de las muestras de semen para licuarse en relación con la edad de inicio a la exposición a los hidrocarburos

Edad de inicio a la exposición	Licuefacción completa	Licuefacción incompleta
15 a 20 años n = 22	18 %	82 %
21 a 25 años n = 6	67 %	33 %
26 a 30 años n = 4	75 %	25 %

#### 8.4.2. AGLUTINACIÓN

En cuatro de los obreros expuestos (que representa el 13.4%, dado que se tuvieron que excluir a dos obreros que presentaron azoospermia), no se encontró ningún tipo de aglutinación entre los espermatozoides, el restante 86.6% (26 obreros) presentó algún tipo de asociación entre los espermatozoides, ya fuera cabeza-cabeza, flagelo-cabeza, flagelo-flagelo o asociación mixta. Esta última fue la más frecuentemente observada y se encontró aglutinación de este tipo desde 5% hasta 60% en las muestras. Los porcentajes de aglutinación más frecuentes fueron entre 5 y 10%, y los presentaron el 43.8% de los obreros. El promedio de aglutinación de este grupo fue  $14.8 \pm 18.2\%$ . En el grupo de varones no expuestos también se encontraron tres varones (11.1%) sin ninguna asociación entre sus espermatozoides. En este grupo, el porcentaje de aglutinación mínimo observado fue 5% y el máximo, 80% (en sólo un varón). El porcentaje de aglutinación más frecuente fue 10% (que fue observado en diez varones, que representan el 37% de este grupo), donde la asociación más comúnmente observada fue también la mixta. En este grupo, el promedio de aglutinación fue  $15.7 \pm 21.3\%$ . Al comparar ambos

grupos, no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa (Tabla 3). El porcentaje de aglutinación no tuvo ninguna asociación con la viscosidad de las muestras, ni con la licuefacción incompleta en ninguno de los dos grupos estudiados. Por otra parte, se encontró una correlación no significativa entre el porcentaje de aglutinación y la edad de inicio a la exposición a los tóxicos ( $r = 0.31$ ), es decir que se observó mayor porcentaje de aglutinación en los individuos que iniciaron mas jóvenes la exposición a los disolventes. Sin embargo, no se encontró ninguna correlación entre el incremento del porcentaje de aglutinación y el tiempo de exposición.

### 8.4.3. CUENTA ESPERMÁTICA

En el grupo de obreros expuestos, se encontró que la cuenta espermática varió de cero (en dos obreros, que representan el 6.3%) hasta  $120 \times 10^6$  espermatozoides por ml (en un solo varón del grupo, que representa el 3.1%). El valor mas frecuente fue  $20 \times 10^6$  espermatozoides por ml, que se observó en 12.5% de esta población. El 53.1% de estos obreros presentaron oligozoospermia severa o moderada con cuentas espermáticas desde 2 hasta  $18 \times 10^6$  espermatozoides por ml. El promedio de este grupo fue  $13.8 \pm 24.3 \times 10^6$  espermatozoides por ml. En el grupo de varones no expuestos no se encontró azoospermia, la cuenta espermática mínima fue 8 y la máxima fue  $180 \times 10^6$  espermatozoides por ml; el promedio fue  $43.2 \pm 44.5 \times 10^6$  espermatozoides por ml. La cuenta mas frecuentemente encontrada en este grupo fue  $18 \times 10^6$  espermatozoides por ml. Al comparar el grupo de expuestos con el grupo de no expuestos se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ) (Tabla 3). Se observó que el grupo de obreros expuestos presentaron cuentas espermáticas mas bajas que el grupo de no expuestos (RM 4.47,  $p < 0.01$ ) (Tabla 9). En el grupo de obreros expuestos se observó que los que tenían mas años de exposición o que iniciaron esta exposición a edad mas temprana, presentaron cuentas espermáticas mas bajas y al relacionar estas variables, se encontraron correlaciones altamente significativas de 0.74 y de 0.57, respectivamente (Gráficas 1 y 2).

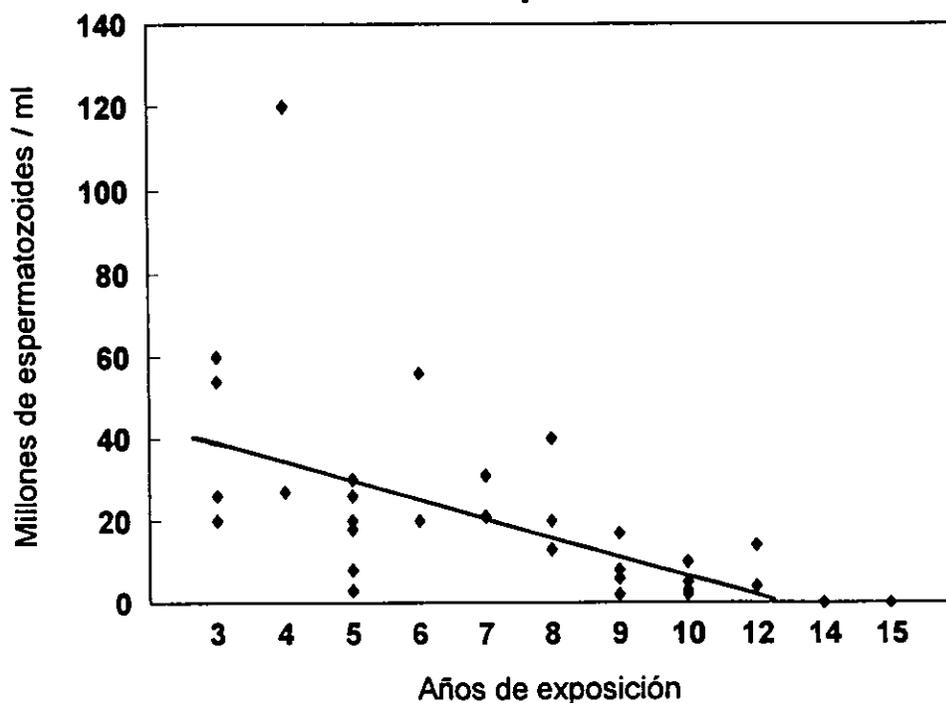
Tabla 9 Normozoospermia y alteraciones encontradas en el semen del grupo de obreros expuestos y en el grupo de varones no expuestos

DIAGNÓSTICOS	Expuestos n=32	No Expuestos n=27	RM	IC 95%	P
Normozoospermia	6	16	6.3	1.71-24.56	p<0.001*
Oligozoospermia	14	4	4.47	1.12-21.39	p < 0.01*
Astenozoospermia	23	6	8.94	2.39-35.41	p < 0.001*
Teratozoospermia	16	1	26.0	--	p < 0.001*
Azoospermia	2	0	--	--	p = 0.1+
C/GcMNs	32	5	--	--	p = 0.01*+

\* Estadísticamente diferentes por Chi cuadrada.

+ Análisis realizado por la prueba de exacta de Fisher, dado que algunas variables presentaron grupos menores de cinco individuos, razón por la cual no fue posible calcular las razones de momios (RM), ni los límites de confianza (IC 95%).

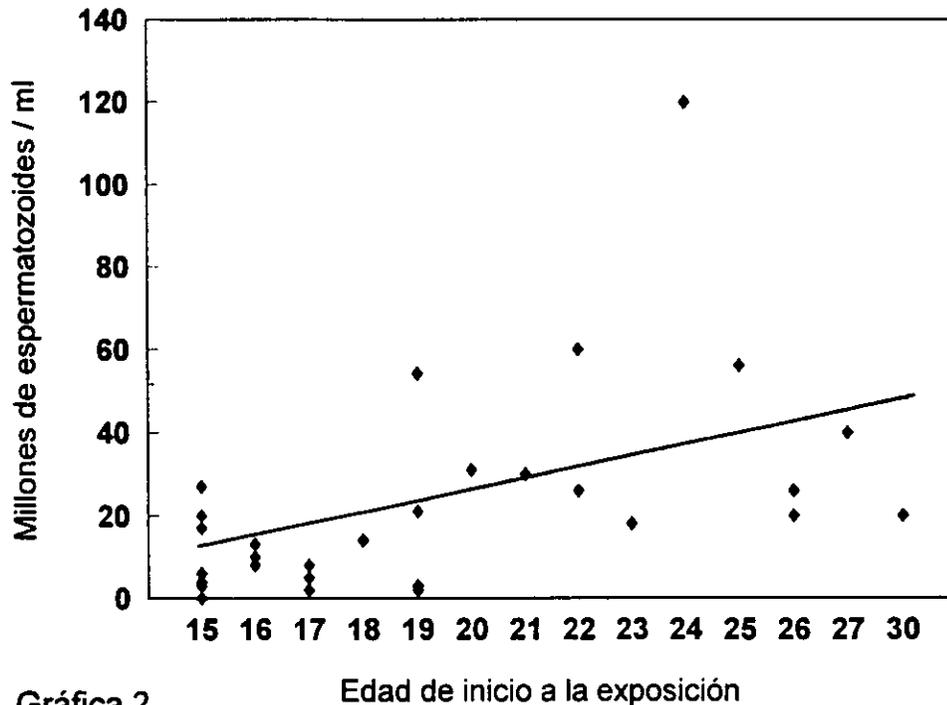
### Efecto del tiempo de exposición sobre la cuenta espermática



Gráfica 1

r=0.74

## Cuenta espermática de acuerdo a la edad de inicio a la exposición



Gráfica 2

Edad de inicio a la exposición

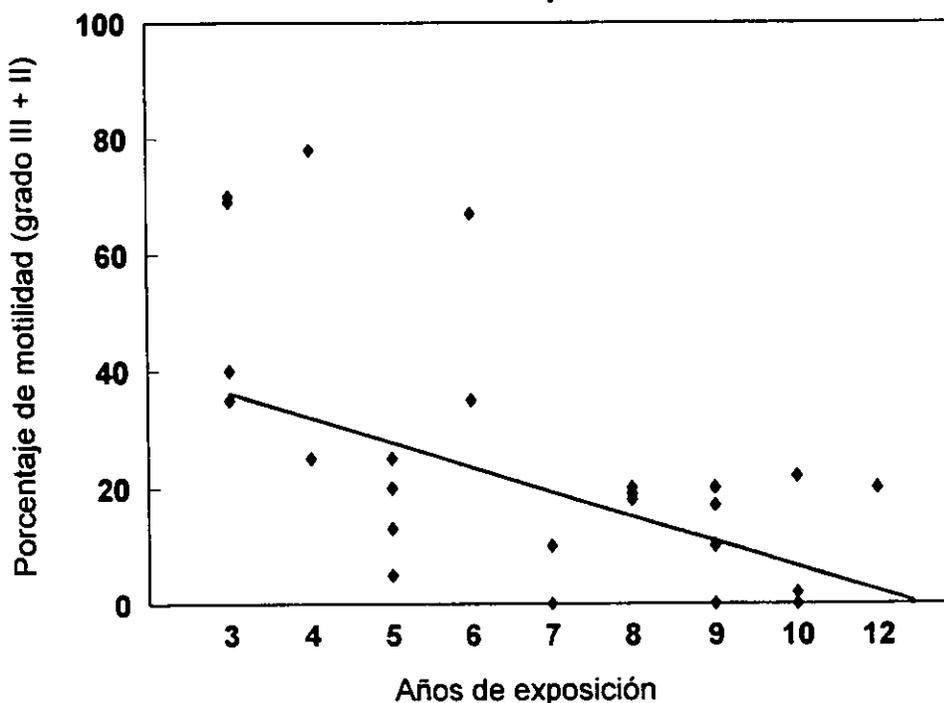
 $r = 0.57$ 

### 8.4.4. MOTILIDAD ESPERMÁTICA

La motilidad grado III más la motilidad grado II de los espermatozoides de las muestras del grupo de obreros expuestos, estuvo disminuida en 26 individuos (de 30 considerados, dado que los otros dos obreros de este grupo eran azoospermicos). Esto significa que el 86.6% presentó astenozoospermia únicamente o en combinación con alguna otra alteración. En los eyaculados de cinco obreros (16.6%) no se observó ningún tipo de motilidad. El porcentaje más frecuentemente encontrado en los eyaculados fue de 20% de motilidad. El porcentaje más alto encontrado fue de 78% y solo lo presentó un individuo. El promedio de este grupo fue de  $21.3 \pm 21.9\%$ . En el grupo de varones no expuestos, prácticamente todos los eyaculados presentaron algún grado de motilidad; el valor de motilidad grado III más grado II mínimo observado fue 10% (en el 3.7%) y el máximo fue 87% (también en el 3.7%). El promedio de este grupo fue  $44.5 \pm 24.7\%$ . Al comparar ambos grupos se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre

el porcentaje de motilidad grado III más grado II ( $p < 0.001$ ) (Tabla 3). Además al comparar al grupo de obreros expuestos contra el grupo de varones no expuestos a estos tóxicos, se encontró que la exposición a los hidrocarburos sí afectó a la motilidad de los espermatozoides, dado que la motilidad de los espermatozoides del grupo de obreros expuestos fue menor que la del grupo de varones no expuestos (RM de 8.94,  $p < 0.001$ ) (Tabla 9). Se observó también, que el porcentaje de motilidad grado III y II estuvo disminuido en individuos que tenían más años de exposición a los disolventes y en los que iniciaron su exposición más jóvenes, se encontraron correlaciones significativas de 0.67 y 0.52, respectivamente (Gráficas 3 y 4). La motilidad también estuvo afectada por la viscosidad y la aglutinación; se encontraron correlaciones significativas entre estas variables y la motilidad, 0.56 y 0.53, respectivamente. La disminución del porcentaje de motilidad no fue debida al porcentaje de espermatozoides no viables en las muestras de semen, pues la asociación entre ambas variables no fue significativa ( $r = 0.27$ ).

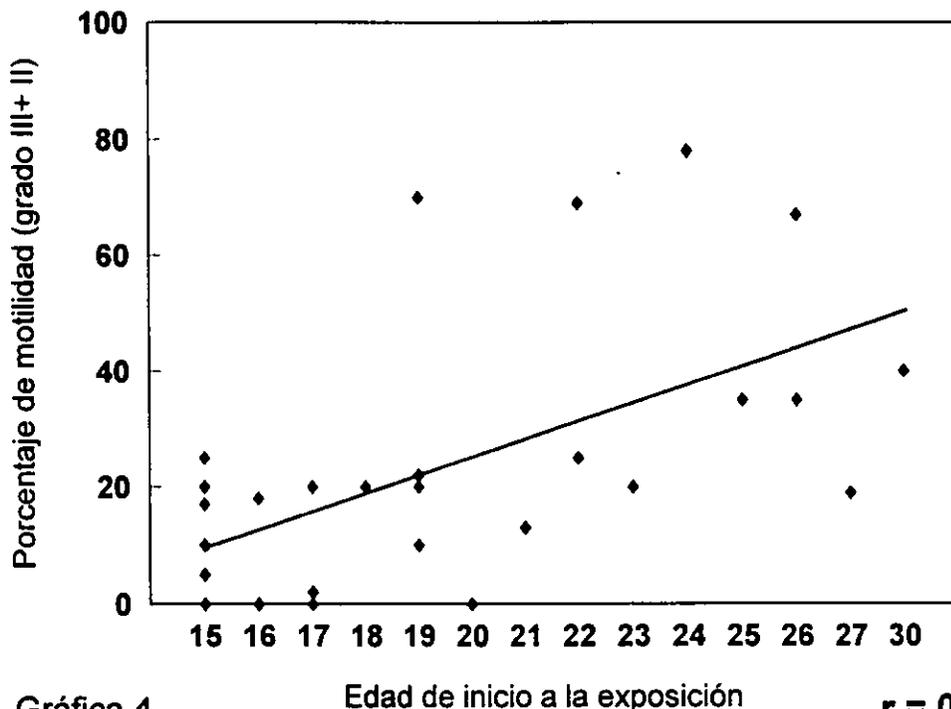
### Efecto del tiempo de exposición sobre la motilidad espermática



Gráfica 3

$r = 0.67$

## Motilidad espermática de acuerdo a la edad de inicio a la exposición



Gráfica 4

Edad de inicio a la exposición

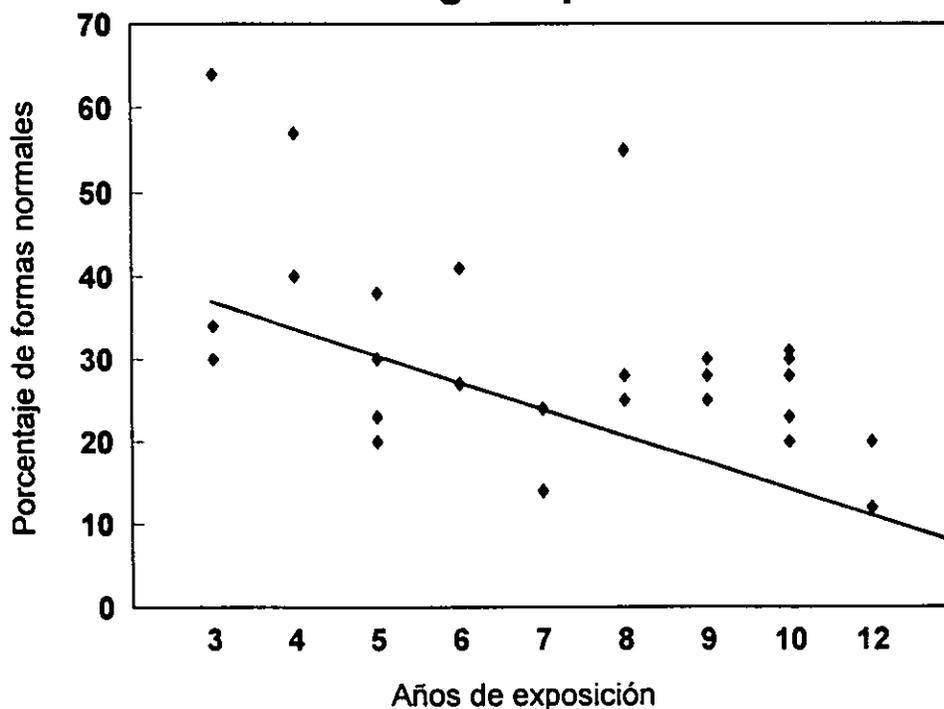
 $r = 0.52$ 

### 8.4.5. MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA

La cantidad de espermatozoides con morfología normal estuvo disminuida en el grupo de obreros expuestos. Se encontró teratozoospermia sola o en combinación con otra alteración en 16 obreros (que representan 53.3%, aquí también se consideraron sólo 30 obreros, al excluir a los dos obreros azoospermicos). El porcentaje de formas normales mínimo encontrado fue 12% y el máximo fue 64%. El promedio de este grupo de obreros fue  $28.7 \pm 13.6\%$ . En el grupo de varones no expuestos, el porcentaje de formas normales mínimo observado fue 28% y el máximo fue 67%, con lo que sólo se encontró teratozoospermia en un individuo (que representa el 3.7%). El promedio del grupo de varones no expuestos fue  $41.7 \pm 11.4\%$ . Se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon ambos grupos ( $p < 0.001$ ) (Tabla 3). Se encontró también que la cantidad de espermatozoides morfológicamente anormales fué mucho mayor en el grupo de expuestos que en el grupo de no expuestos (RM de 26.0,  $p < 0.001$ ) (Tabla 9). Por otra parte, los individuos que tenían mas tiempo en contacto con los

disolventes orgánicos, presentaron mayor cantidad de espermatozoides morfológicamente anormales. La correlación entre ambas variables fue de 0.61. También se encontró cierta tendencia no significativa de presentar mas espermatozoides anormales en aquellos individuos que iniciaron mas jóvenes el contacto con los disolventes orgánicos ( $r = 0.31$ ) (Gráficas 5 y 6).

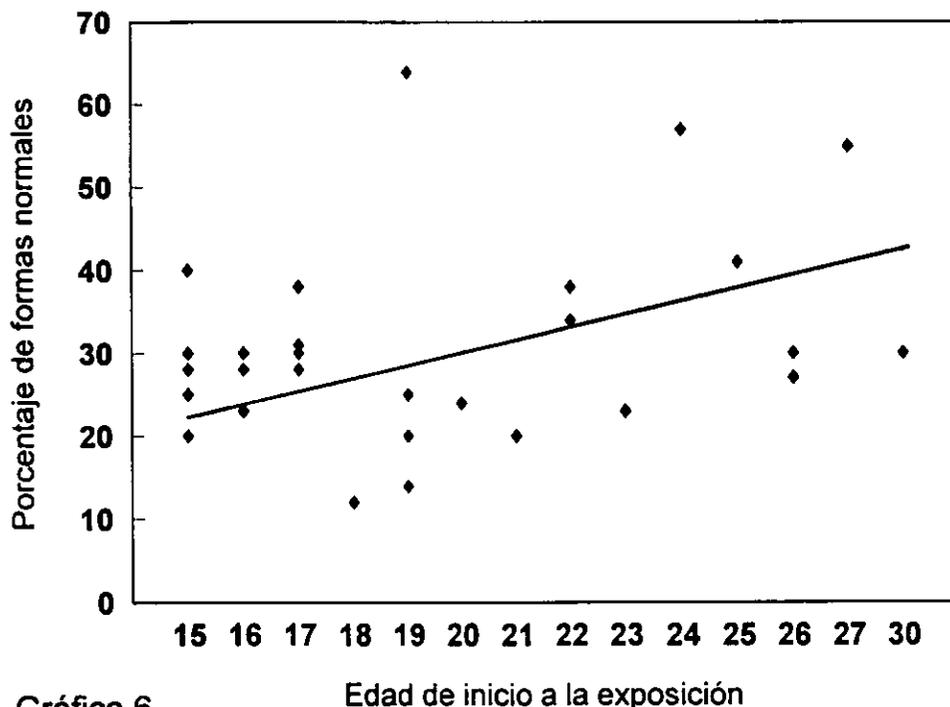
### Efecto del tiempo de exposición sobre la morfología espermática



Gráfica 5

$r = 0.61$

### Morfología espermática de acuerdo a la edad de inicio a la exposición



Gráfica 6

Edad de inicio a la exposición

 $r = 0.31$ 

#### 8.4.6. VIABILIDAD ESPERMÁTICA

Al evaluar la viabilidad espermática en las muestras de semen de los obreros se encontró que: el porcentaje mínimo de espermatozoides vivos fue 70% y el porcentaje máximo fue 87%, el porcentaje más frecuente fue 80%, que lo presentó el 40% (12 obreros, aquí también se tuvieron que considerar sólo 30 obreros, dado que los otros dos fueron los azcospérmicos). El promedio de este grupo fue  $80.2 \pm 20.2\%$  de espermatozoides viables. En el grupo de varones no expuestos también se encontró que el porcentaje mínimo de espermatozoides vivos fue 70% y el porcentaje máximo encontrado fue 98%; en este grupo el porcentaje más frecuente fue 90%. En este grupo no expuesto a hidrocarburos, el promedio fue  $86.6 \pm 6.5\%$ . Cuando se compararon ambos grupos se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ) (Tabla 3). No se encontró ninguna asociación entre el porcentaje de espermatozoides no viables y el tiempo de exposición, o con la edad de inicio a la exposición a los tóxicos o con alguna otra variable.

#### 8.4.7. CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS

En cuanto a la concentración de bacterias en los eyaculados del grupo de los obreros expuestos, el 56.3% de los eyaculados presentaron una concentración grado II (una concentración de  $1.1 \times 10^3$  hasta  $2 \times 10^3$  Unidades formadoras de colonias (UFC) / ml), que en este grupo fue la concentración mínima encontrada y la más frecuente también. La máxima concentración fue de grado V (concentración de  $4.1 \times 10^3$  hasta  $5 \times 10^3$  UFC / ml) y la presentaron dos individuos (que representan el 6.3%). El promedio de este grupo fue  $2.7 \pm 0.9$ , concentración que corresponde al grado III: de  $2.1 \times 10^3$  hasta  $3 \times 10^3$  UFC / ml. En el grupo de varones no expuestos, la concentración de bacterias mínima y también la más frecuente fue la de grado I (concentración de  $1.1 \times 10^3$  hasta  $2 \times 10^3$  UFC / ml) y la máxima concentración fue de grado VI (concentración de  $5.1 \times 10^3$  hasta  $6 \times 10^3$  UFC / ml), que la presentaron tres individuos (que representan el 11.1% de este grupo). El promedio de este grupo fue  $2.2 \pm 1.6$ , concentración que corresponde al grado II: de  $1.1 \times 10^3$  hasta  $2 \times 10^3$  UFC / ml. Al realizar una comparación entre la concentración de bacterias observada en ambos grupos, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) (Tabla 3). No se encontró ninguna correlación entre la concentración de bacterias en los eyaculados de ambos grupos y alguna otra variable.

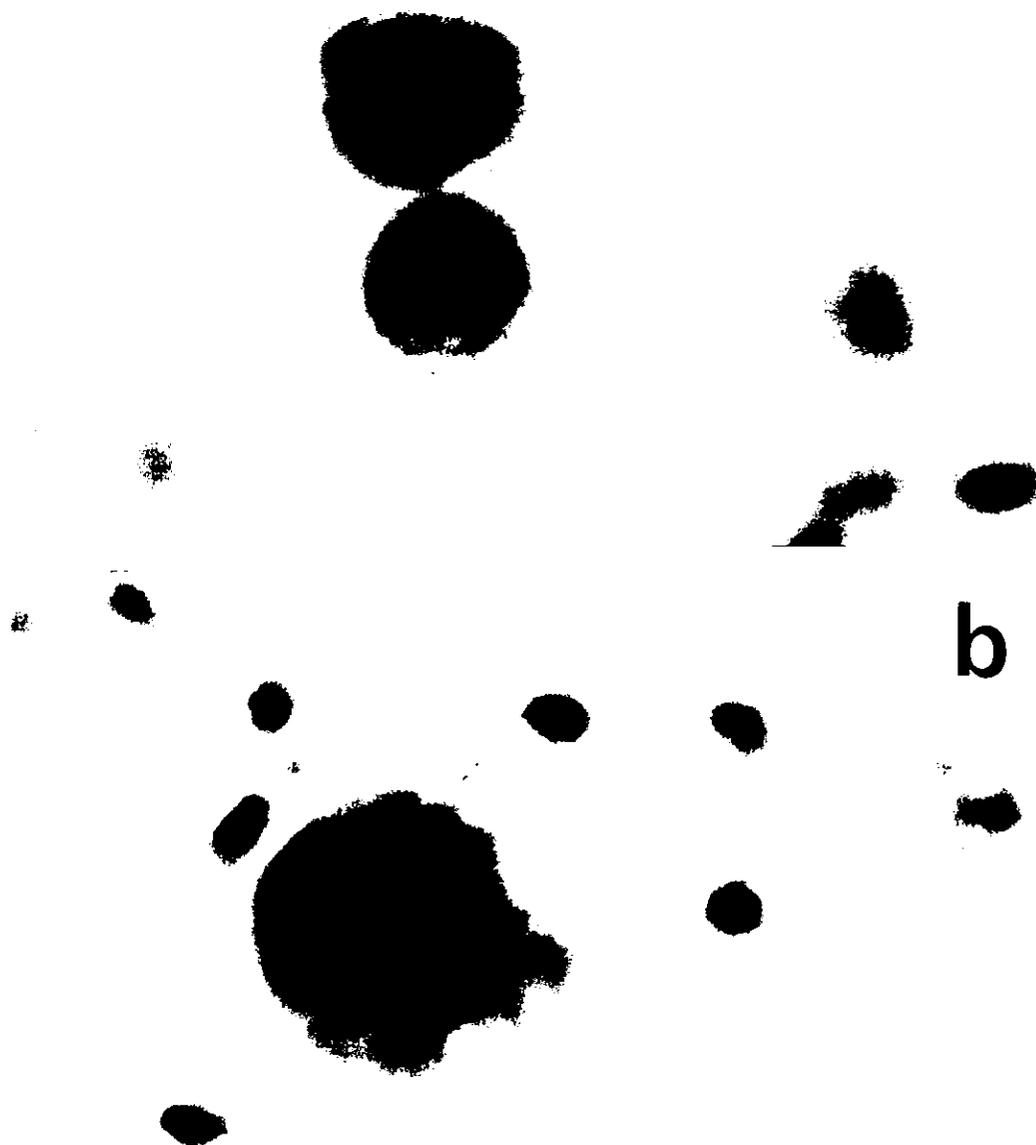
#### 8.4.8. LEUCOCITOS

La cantidad de leucocitos en los eyaculados de los obreros expuestos varió de  $1 \times 10^6$  leucocitos por ml (en el 12.5% del grupo) a  $20 \times 10^6$  leucocitos por ml (en el 3.1% del grupo). La cantidad de leucocitos más frecuentemente encontrada fue  $2 \times 10^6$  leucocitos por ml. El promedio encontrado fue  $4.5 \pm 4.1 \times 10^6$  leucocitos por ml. En el grupo de varones no expuestos, la cantidad mínima de leucocitos fue  $1 \times 10^6$  por ml y la máxima fue  $15 \times 10^6$  leucocitos por ml. La cantidad de leucocitos más frecuentemente encontrada fue  $2 \times 10^6$  leucocitos por ml y el promedio fue  $3.4 \pm 2.8 \times 10^6$  leucocitos por ml. Al comparar ambos grupos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 3). No se encontró ninguna asociación entre la cantidad de leucocitos encontrados en las muestras de semen de alguno de los grupos y otra variable.

#### **8.4.9. CÉLULAS GERMINALES INMADURAS CON MICRONÚCLEOS (CGI/Mns)**

En todas las muestras de semen del grupo de obreros expuestos se observaron CGI/Mns. La cantidad mínima de CGI/Mns encontrada fué 12% (en el 9.4% del grupo) y la máxima fué 59% (en el 3.1% del grupo). La cantidad de CGI/Mns mas frecuentemente observada fue 12%. Se observaron células inmaduras con un solo Mn grande o células con hasta dos Mns (Fig 3-6). El promedio de este grupo fue  $32 \pm 15\%$  de CGI/Mns. En el grupo de varones no expuestos, la cantidad mínima de CGI/Mns fue 1% (en el 11.1% de este grupo) y la máxima fue 12% (que la presentó un solo varón y que representa el 3.7%). En este grupo, predominaron los varones sin CGI/Mns, que en este caso fueron cinco individuos (que representan el 18.5% de este grupo). El promedio de este grupo fue  $4 \pm 3\%$ . Cuando se comparó la cantidad de CGI/Mns de ambos grupos, se pudo observar que la tendencia a formar estas estructuras intracelulares fue mas alta en los obreros expuestos, que los varones no expuestos, dado que en el grupo de expuestos, el 100% presentó CGI/Mns y en el grupo de no expuestos, solo el 80% presentaron cuando menos un Mn en sus células germinales inmaduras. Al comparar la cantidad de CGI/Mns que presentó cada grupo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ) (Tabla 3). En el grupo de obreros expuestos se observó que los individuos que tenían mayor tiempo de exposición presentaron mayor número de CGI/Mns (Tabla 10). Se encontró una correlación altamente significativa ( $r = 0.72, p < 0.001$ ) (Gráfica 7). También se observó que mientras mas jóvenes iniciaron su contacto con los disolventes, mayor cantidad de CGI/Mns contenían sus eyaculados (Tabla 11). Los datos obtenidos mostraron una correlación de 0.48 entre ambas variables ( $p < 0.001$ ) (Gráfica 8). Igualmente se observó que conforme mayor era el porcentaje de espermatozoides con morfología anormal, mayor fue la cantidad de CGI/Mns. Se encontró una correlación significativa de 0.50 ( $p < 0.001$ ).

a



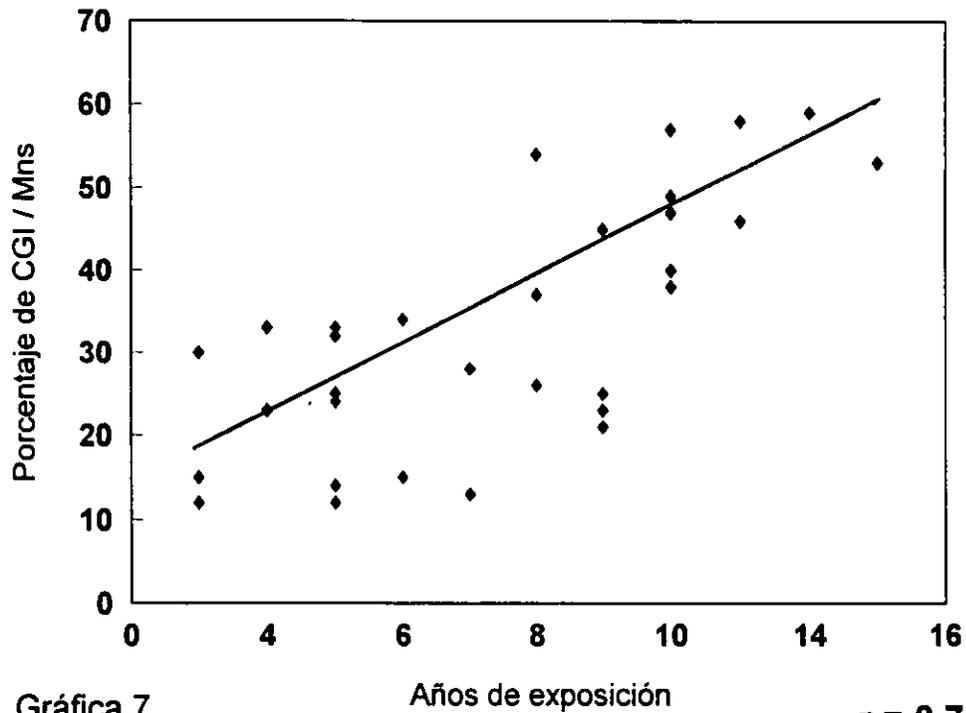
b

Fig 3a-3f. Micronúcleos en células germinales inmaduras (CGI /Mns) en muestras de semen de obreros expuestos a disolventes orgánicos en su medio laboral. Se identifican claramente los Mns (flechas) como pequeñas estructuras esféricas basófilas en el citoplasma de las células, cerca del núcleo o en la región subyacente a la membrana plasmática . E= espermatozoides. [Tinción de PAS contrateñida con hematoxilina (Conn, 60; Tates 92) ].



Fig 3c - 3f.

### Formación de Mns en CGI por el tiempo de exposición

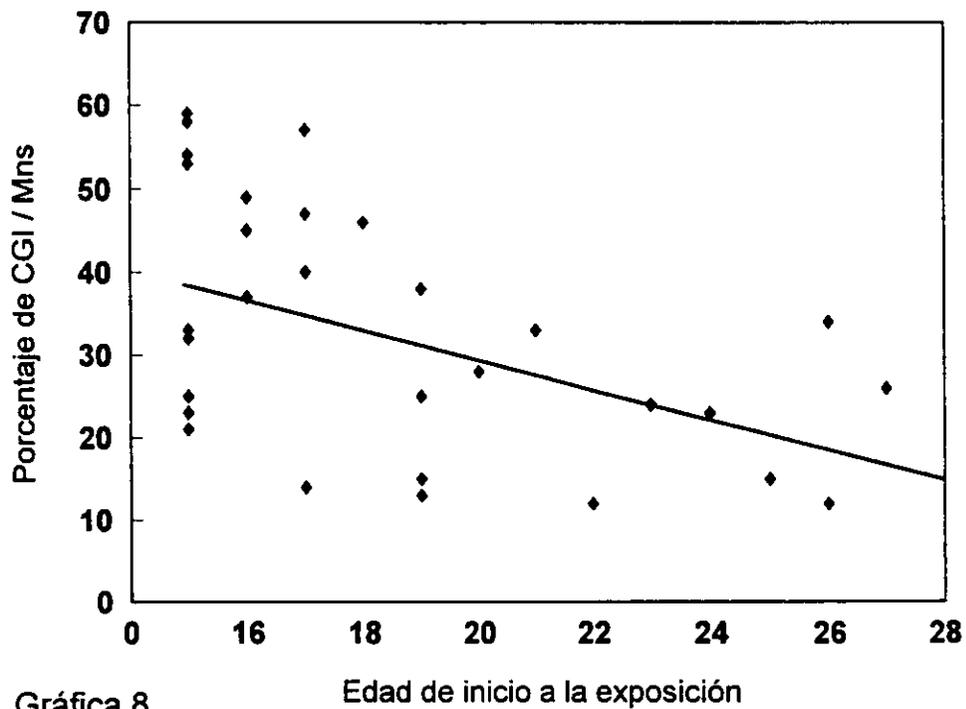


Gráfica 7

Años de exposición

 $r = 0.72$ 

### Formación de Mns en CGI en función de la edad de inicio a la exposición



Gráfica 8

Edad de inicio a la exposición

 $r = 0.48$

Tabla 10 Porcentaje de CGI/Mns de acuerdo al periodo de exposición en años

Tiempo de Exposición	Porcentaje de CGI/Mns
3 a 5 años n = 12	( 12 - 33 ) 22 ± 9 %
6 a 9 años n = 11	( 13 - 54 ) 29 ± 12 %
10 a 15 años n = 9	( 38 - 59 ) 50 ± 8 %

Tabla 11 Porcentaje de CGI/Mns de acuerdo a la edad de inicio a la exposición a hidrocarburos

Edad de inicio a la exposición	Porcentaje de CGI/Mns
15 a 20 años n = 22	( 13 -59 ) 37 ± 15 %
21 a 25 años n = 6	( 12 - 33 ) 23 ± 8 %
26 a 30 años n = 4	( 26 - 34 ) 25 ± 9 %

### 8.4.10. DIAGNÓSTICOS DE LAS MUESTRAS DE SEMEN

Al considerar todas las características de las muestras de semen de los obreros expuestos, se encontró que el 31.3% (diez obreros) fueron oligoastenoteratozoospermicos, el 18.8% (seis obreros) fueron normozoospermicos, el 15.6% (cinco obreros) presentaron oligoastenozoospermia, el 12.5% (cuatro obreros) presentaron astenozoospermia, otro 12.5% presentó astenoteratozoospermia, un 6.3% (dos obreros) presentó azoospermia y un 3.1% restante (un obrero) presentó teratozoospermia. En el grupo de individuos no expuestos, el 59.3% del grupo (16 varones) fueron normozoospermicos, el 22.2% (seis varones) presentó astenozoospermia, el 11.1% (tres individuos) presentó oligozoospermia y los restantes dos individuos (que representaron el 7.4% del grupo) presentaron oligoastenozoospermia y oligoteratozoospermia, respectivamente. (Tabla 12). El número de individuos que presentaron un eyaculado con características normales fué mayor en el grupo de no expuestos que en el grupo de obreros expuestos (con un RM de 6.3,  $p < 0.001$ ) (Tabla 9).

Tabla 12 Normozoospermia y alteraciones encontradas en el semen del grupo de obreros expuestos y en el grupo de varones no expuestos

Diagnóstico del semen	Expuestos	No expuestos
Normozoospermia	18.8%	59.3%
Oligozoospermia		11.1%
Astenozoospermia	12.5%	22.2%
Teratozoospermia	3.1%	
Oligoastenozoospermia	15.6%	3.7%
Oligoteratozoospermia		3.7%
Astenoteratozoospermia	12.5%	
Oligoastenoteratozoospermia	31.3%	
Azoospermia	6.3%	

El porcentaje de normozoospermia y de las alteraciones encontradas en el semen de los obreros expuestos, de acuerdo al tiempo de exposición y a la edad de inicio a la exposición a los hidrocarburos, se pueden observar en las tablas 13 y 14.

Tabla 13 Porcentaje de normozoospermia y de alteraciones encontradas en el semen de acuerdo al periodo de exposición en años

Diagnóstico del semen	Tiempo de exposición en años		
	3 a 5	6 a 9	10 a 15
Normozoospermia	31.4 %	5 %	0 %
Oligozoospermia	18.7 %	15 %	34.6 %
Astenozoospermia	31.2 %	40 %	34.6 %
Teratozoospermia	12.5 %	40 %	27 %
Azcospermia	6.2 %	0 %	3.8 %

Tabla 14 Porcentaje de normozoospermia y de alteraciones encontradas en el semen de acuerdo a la edad de inicio a la exposición en años

Diagnóstico del semen	Edad de inicio a la exposición en años		
	15 a 20	21 a 25	26 a 30
Normozoospermia	17 %	50 %	33 %
Oligozoospermia	100 %	0 %	0 %
Astenozoospermia	82 %	14 %	4 %
Teratozoospermia	80 %	13 %	7 %
Azcospermia	100 %	0 %	0 %

## 8.5. MUESTRAS DE ORINA

### 8.5.1. ÁCIDO HIPÚRICO (AH)

En cuanto a la concentración de metabolitos urinarios en el grupo de obreros expuestos, se encontró que la concentración mínima de ácido hipúrico (AH) fue 2.7 y la máxima fue 29.2 g/g de creatinina, la concentración más frecuentemente encontrada fue 7 g/g de creatinina (en el 6.3% de los obreros); el promedio del grupo fue  $9.8 \pm 6.4$  g/g de creatinina (Tabla 15). En este grupo de obreros expuestos, todos los individuos presentaron niveles elevados de AH según lo establecido por el índice de exposición biológica a tóxicos (BEI) ( $AH > 2.5$  g/g de creatinina). En el grupo de varones no expuestos, la concentración mínima de AH fue 0.2 y la máxima fue 1.8 g/g de creatinina, con un promedio de  $0.5 \pm 0.4$  g/g de creatinina (Tabla 15); la concentración más frecuente fue 0.2 g/g de creatinina, que se encontró en el 25.9% de este grupo de varones y en ninguno de ellos se encontraron niveles elevados de AH. Al comparar la concentración de metabolitos urinarios presentada en ambos grupos, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ) (Tabla 15). Se observó que los individuos que tenían más tiempo de exposición presentaron cierta tendencia no significativa ( $r = 0.35$ ) a excretar más cantidad de metabolitos de tolueno en la orina (AH). Por el contrario, no se encontró ninguna correlación entre la edad de inicio a la exposición con los disolventes y la cantidad de AH excretado. En el grupo de obreros expuestos se encontró una correlación de 0.48 entre la concentración de AH cuantificado en la orina y la cuenta espermática, lo que significa que a mayor cantidad de AH encontrado en la orina, fue menor la cuenta espermática. La motilidad y la cantidad de espermatozoides morfológicamente normales también mostraron cierta tendencia a disminuir, aunque no significativamente, conforme los niveles de AH estuvieron altos; esto se puso de manifiesto con correlaciones de 0.34 y 0.30, respectivamente. El porcentaje de CGI/Mns también presentó una correlación de 0.48 con los niveles altos de AH en el grupo de obreros, lo que demostró una clara tendencia de estas células germinales a formar Mns por la presencia de disolvente en el organismo. La concentración de AH encontrado en la orina de los individuos estudiados no presentó ninguna correlación con alguna otra variable.

### 8.5.2. ÁCIDO MANDÉLICO (AM)

La concentración mínima de ácido mandélico (AM) en el grupo de obreros fue 0.8 y la máxima fue 1.96 g/g de creatinina, con un promedio de  $1.5 \pm 0.3$  g/g de creatinina (Tabla 15). Todas las concentraciones fueron distintas entre sí. El 94% de los obreros expuestos presentaron niveles elevados de AM, de acuerdo a los criterios del BEI ( $AM > 0.8$  g/g de creatinina). En el grupo de varones no expuestos, la concentración de AM mínima y la más frecuentemente encontrada fue cero y la máxima fue 0.9 g/g de creatinina. El promedio de este grupo fue  $0.09 \pm 0.04$  g/g de creatinina (Tabla 15) y sólo el 25% de este grupo presentó niveles elevados de AM. Al comparar la concentración de AM presentado por ambos grupos se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ) (Tabla 15). Contrariamente a lo encontrado con respecto a los niveles de AH excretados en la orina, la concentración de AM en la orina no presentó ninguna correlación con alguna de las variables consideradas.

Tabla 15 Concentración de metabolitos urinarios en el grupo de obreros expuestos y el grupo de varones no expuestos

Acido Hipúrico					
	Media $\pm$ Sd	Mediana	Mínimo	Máximo	P
Expuestos	$9.8 \pm 6.4$	10.6	2.7	29.2	$p < 0.001^*$
No expuestos	$0.5 \pm 0.4$	0.6	0.2	1.8	
Acido Mandélico					
Expuestos	$1.5 \pm 0.3$	1.5	0.8	1.96	$p < 0.001^*$
No expuestos	$0.09 \pm 0.04$	0.07	0	0.9	

Los valores límite permisibles según lo establecido por el BEI son para AH  $> 2.5$  g/g de creatinina y AM  $> 0.8$  g/g de creatinina.

## 9. DISCUSIÓN

El presente trabajo es una investigación para determinar la frecuencia de trabajadores que están expuestos a un patrón excesivo de hidrocarburos aromáticos (que se pudo poner en evidencia por medio de la presencia de niveles elevados de metabolitos urinarios de benceno y de tolueno) y que presentan alteraciones en el proceso de espermatogénesis. Se estudió una población de obreros de una empresa fabricante de empaques y mangueras, ubicada en Xalostoc, Estado de México. Se estudió también a un grupo de varones que trabajaban en la misma empresa pero que no tenían contacto con estos tóxicos para conformar un grupo de comparación.

En esta población los obreros estaban expuestos a una mezcla de diferentes hidrocarburos entre los que se encontraban benceno, etilbenceno (thinner), tolueno y trementina. Todos los obreros expuestos estudiados presentaron niveles urinarios elevados de ácido hipúrico (AH>2.5g/g de creatinina), que es un indicador biológico de la exposición a tolueno y un porcentaje considerable (94%) presentaron niveles urinarios elevados de ácido mandélico (AM>0.8g/g de creatinina), que es un indicador biológico de la exposición a benceno y a etilbenceno. Esto fue tomado en cuenta para considerar los efectos adversos aditivos que pudiera ejercer esta mezcla sobre el proceso de espermatogénesis de los obreros expuestos a la misma.

En cuanto a las características del semen de los obreros expuestos, se encontraron ciertas modificaciones que sugieren alteración en el proceso de espermatogénesis, de la presencia de sustancias extrañas y posiblemente tóxicas en el eyaculado. Una de las características encontradas en el semen de los obreros estudiados, es el incremento del volumen total del eyaculado. Esta característica ha sido encontrada también en poblaciones de varones expuestos a tóxicos o grandes fumadores, donde se han encontrado incluso residuos de estas sustancias tóxicas en la orina o en el plasma seminal (Chia, 1994). En esta población se observó cierta tendencia no significativa al incremento del volumen del semen de los obreros expuestos,  $2.7 \pm 1.4$  vs  $2.5 \pm 1.1$ . Otro ejemplo muy claro fue la viscosidad de las muestras de semen, dado que sólo cuatro

obreros presentaron viscosidad normal, el resto presentó viscosidad anormal (grados 1°, 2° o 3°). Hubiera sido importante realizar estudios pertinentes para descartar o confirmar la presencia de sustancias extrañas en el plasma seminal con técnicas analíticas, como electroforesis o HPLC-UV, pero las condiciones de trabajo en que se estudiaron las muestras de semen (tales como su estudio en un laboratorio aledaño a la fábrica, con muchas limitaciones de equipo y reactivos, donde se desarrollo la mayor parte de este estudio), impidieron darles el tratamiento adecuado de conservación para poder realizar alguno de esos métodos para búsqueda de sustancias extrañas al plasma seminal. Sin embargo, podría considerarse como un dato indicador de la presencia de algunos tóxicos en el plasma seminal el hecho de que los dos varones expuestos que resultaron azoospermicos presentaron viscosidad anormal (grado III), cuando generalmente los eyaculados desprovistos de células espermáticas, por lo general presentan una viscosidad acuosa o normal (Barrat, 1988). Se encontró también que la viscosidad anormal (densa en grado 1°, 2° o 3°) impidió que estas completaran su licuefacción; además se observó cierta tendencia a perder esta capacidad de licuefacción conforme era mayor el tiempo de exposición y/o la exposición se había iniciado en edad temprana, lo que podría sugerir también la presencia de sustancias tóxicas en el plasma seminal o un daño a otro nivel del sistema reproductor masculino por efecto de una exposición crónica y en dosis suficientes a estas sustancias.

Con respecto al porcentaje de aglutinación de los espermatozoides podría decirse que se esperaba que hubiera una diferencia significativa entre el grupo de expuestos y el grupo de no expuestos, dado que la presencia de sustancias tóxicas o extrañas en el plasma seminal genera una aglutinación inespecífica (de tipo mixta) entre los espermatozoides (Fredricsson, 1993). Sin embargo, los promedios de aglutinación fueron muy similares entre el grupo de individuos expuestos y el grupo de no expuestos ( $14.8 \pm 18.2\%$  vs  $15.7 \pm 21.3\%$ ), por lo que podría pensarse que de ser cierto que había hidrocarburos en el plasma seminal, quizá este tipo de sustancias provocan otro tipo de alteraciones, tales como una viscosidad anormal, pero no generan una asociación entre los espermatozoides, e incluso es posible que provoquen que los espermatozoides no se adhieran entre ellos, dado que se observó que el porcentaje de aglutinación entre los espermatozoides de los individuos no expuestos fue en promedio ligeramente mayor y coincide mas con lo observado en otros grupos de varones normales, fértiles y no expuestos de la población abierta de la ciudad de México que han sido voluntarios para

participar en otros estudios (datos no publicados del Laboratorio de la Unidad de Investigación Médica de Biología de la Reproducción).

Otro posible indicador del daño al proceso de espermatogénesis por efecto de la exposición a sustancias tóxicas fue la frecuencia de oligozoospermia en el grupo de obreros expuestos (53.1%), de hecho, los individuos que tenían mas años de exposición o que iniciaron muy jóvenes (menores de 20 años) su contacto con estos hidrocarburos presentaron cuentas espermáticas mas bajas. Esto se ha observado en otras poblaciones de varones que han tenido contacto con tóxicos (Gennart, 1992), incluso, se ha postulado que estos varones se mantienen con cuentas espermáticas bajas mientras continúen su contacto con los tóxicos (Whorton, 1977). Se han realizado estudios prospectivos longitudinales en obreros expuestos a diferentes tipos de tóxicos (entre los que se encontraban hidrocarburos aromáticos) y se demostró que después de suspender el contacto con estas sustancias, en algunos de ellos se observó una recuperación discreta de la función testicular, generalmente en aquellos que no habían sido severamente afectados. Los que habían desarrollado azoospermia por causa de la toxicidad de los hidrocarburos, permanecieron azoospermicos mucho tiempo después de suspender el manejo de estos tóxicos (en promedio 8 años después fueron evaluados) y se postula que en estos individuos el daño es irreversible (Whorton, 1981).

El testículo de un individuo adulto puede funcionar en condiciones adversas (Amann, 1980), contrariamente a lo que sucede durante su desarrollo o al inicio de la pubertad, donde el sistema reproductor masculino es especialmente vulnerable al efecto nocivo que pudieran causarle diversos factores (Feichtinger, 1991). Es decir, que cuando un hombre que rebasa los 20 años tiene una exposición a un tóxico en forma aguda, se puede observar una discreta y transitoria declinación de la espermatogénesis. La exposición moderada pero crónica a estos tóxicos pudiera originar quizá una alteración de mayor magnitud, aunque también sea transitoria en la mayor parte de los casos (De Celis, 1996). En el varón, el epitelio germinal es un tejido que tiene un alto índice de proliferación, pero reacciona con sensibilidad a la toxicidad que puedan causarle algunos factores químicos o físicos. Por tal motivo podría pensarse que fue frecuente el hallazgo de oligozoospermia en esta población de obreros estudiados, dado que además de que manejan sustancias tóxicas que son capaces de atravesar la barrera hemato-testicular que protege a las células germinales, desde que iniciaron su contacto con estos tóxicos, han seguido en contacto con ellos hasta el momento en que fueron evaluados.

En este estudio la mayor parte de los obreros expuestos estudiados (22 de los 32, que representa el 70%) estaban en el grupo de edad de inicio a la exposición de 15 a 20 años, y el resto (10 de 32 que representa el 30%) comenzaron después de los 20 años. Esto significa que aunque se demostró que el inicio a la exposición a tóxicos tuvo un efecto adverso, estadísticamente significativo ( $r=0.57$ ), hubiera sido ideal tener grupos homogéneos de comparación en cuanto a la edad de inicio a la exposición, es decir, que hubiera sido interesante tener mas obreros con una edad de inicio de mas de 20 años. Sin embargo, no fue posible conjuntar un grupo mas grande con esta característica, dado que: en México, debido a la situación económica general del País, desde hace muchos años, este tipo de personas se ven obligadas a trabajar desde el inicio de su adolescencia (en promedio 13 años). Existen algunas publicaciones que se refieren a este respecto, que demuestran que los varones jóvenes que inician tempranamente su contacto con disolventes tienen mas probabilidades de ser oligozoospermicos e incluso azoospermicos por efecto del contacto crónico con hidrocarburos que aquellos varones que inician su contacto con estas sustancias en una edad madura, mayores de 25 años (Egnatz, 1980; Fredricsson, 1983; Foster, 1984). Por otra parte, se ha demostrado que el calor extremo puede provocar una disminución en la cuenta espermática (Bedford, 1978) de hecho, la cuenta espermática puede variar considerablemente en las diferentes estaciones del año, así tiende a bajar en la primavera y se incrementa en el invierno (Chia, 1994). En el presente estudio se trato de minimizar el efecto del calor de la primavera y se estudiaron a los individuos en el otoño, donde las condiciones climáticas son mas favorables. Sin embargo, debe considerarse la temperatura del ambiente laboral, que aunque estaba mas baja que en primavera, pudiera ser un factor que contribuyera a disminuir la cuenta espermática; aunque la ventaja de estudiar varones no expuestos que trabajan en la misma empresa y que su cercanía hace que la temperatura sea similar, de alguna manera iguala el potencial adverso de la temperatura sobre la cuenta espermática en ambos grupos.

Con respecto a la motilidad de los espermatozoides se han publicado algunos trabajos donde se demuestra que la presencia de sustancias tóxicas en el plasma seminal, afecta la motilidad de las células espermáticas (Fredricsson, 1993). Incluso, se ha observado en estudios *in vitro* cómo disminuyó la motilidad espermática cuando los espermatozoides se pusieron a interactuar con moco cervical humano enriquecido con hidrocarburos aromáticos (Skakkebaek, 1994). De hecho, se ha encontrado con mucha frecuencia no

Por otra parte, en varias de las historias clínicas realizadas a los participantes de este estudio, se pudo observar que la mayoría de los obreros expuestos que están muy cerca de la normalidad o que son normales de acuerdo a los criterios de la OMS, sus padres y/o sus abuelos también fueron obreros expuestos a una gran cantidad de tóxicos, lo que podría sugerir, que ésto se deba a una resistencia adquirida heredada, dado que aunque no se ha demostrado contundentemente, ya existen algunos estudios poblacionales que tratan de este fenómeno de heredabilidad de la resistencia adquirida a través de varias generaciones, sobretodo con respecto a la respuesta hacia los agentes agresores del medio ambiente (Figa-Talamanca, 1994). En este estudio, no fue posible realizar un análisis estadístico acerca de esta observación dado que algunos obreros no conocieron a sus padres o abuelos.

Una de las contribuciones importantes de este trabajo es que el patrón de exposición que se encontró (en la población mexicana) no se había estudiado y que está en el término medio, dado que en Estados Unidos se cumple la norma internacional (HA>2.5 y MA>0.8  $\mu\text{g/g}$  de creatinina) y en muchas poblaciones de Sudamérica y en Filipinas los obreros están expuestos a concentraciones muy altas de hidrocarburos (HA en promedio de 43 y MA en promedio 2  $\mu\text{g/g}$  de creatinina) (Cucueco, 1993).