



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

*Exposición a cadmio en etapa puberal: su efecto oxidante y la
determinación de testosterona en la rata Wistar adulta*

T E S I S

Para obtener el grado de
Maestra en Biología de la Reproducción Animal

P R E S E N T A

Biól. Sonia Guadalupe Pérez Aguirre

Comité tutorial

Director

Dra. Marcela Arteaga-Silva

Codirector

Dr. Sergio Montes-López

Asesor

Dra. Herlinda Bonilla-Jaime

Ciudad de México, 29 de enero del 2020.

Comité de Tutorial

Director

Doctora Marcela Arteaga-Silva

Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
asm@xanum.uam.mx

Codirector

Doctor Sergio Montes-López

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
"Dr. Manuel Velasco Suarez"
montesergio@yahoo.com

Asesor

Doctora Herlinda Bonilla-Jaime

Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
bjh@xanum.uam.mx

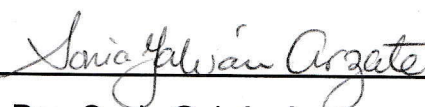
MIEMBROS DEL JURADO



Dra. Herlinda Bonilla Jaime
Profesora-Investigadora. Titular "C" T.C.
Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
bjh@xanum.uam.mx



Dr. Pablo Gustavo Damián Matsumura
Profesor-Investigador. Titular "C" T.C.
Departamento de Biología de la Reproducción
División de ciencias Biológicas de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
pdmatsumura@yahoo.com



Dra. Sonia Galván Arzate
Investigador del Laboratorio de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y
Neurocirugía "Dr. Manuel Velasco Suarez".
sonia_galvan@yahoo.com



Dra. Mirna Ruiz Ramos
Profesor de Tiempo Completo de la Carrera de QFB
Unidad de Investigación en Gerontología
Laboratorio 6 PA, UMIEZ
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM
mirna1411@yahoo.com.mx

La Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT. La alumna Sonia Guadalupe Pérez Aguirre recibió apoyo de la UAM por parte del CONACyT, Número de registro CVU: 869127.

El presente trabajo fue realizado en:

- Laboratorio de Neuroendocrinología Reproductiva, Q3-LAB. 10 de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa a cargo de la Dra. Marcela Arteaga Silva.
- Laboratorio de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Dr. Manuel Velasco Suárez”.
- Bioterio de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM Iztapalapa.

DEDICATORIA

A mis padres **Ma. Guadalupe Aguirre** y **Sotero Pérez** por tanto sacrificio, esfuerzo. Gracias por ofrecerme la oportunidad de crecer profesionalmente, le agradezco infinitamente a la vida por ser mis padres, por su amor, dedicación. Padre mío donde quieras que estés, te dedico este triunfo.

A mi hermano **Javier Pérez** por su esfuerzo y apoyo para poder lograr este sueño.

A mi maestro y por supuesto gran amigo **MBRA Joel Hernández** por todo el apoyo y aprendizaje que me has otorgado, por tu tiempo, por las vivencias y sueños logrados, gracias por ayudarme a crecer profesionalmente.

A mi compañero de vida, mi amorcito **Izaú Moreno**, gracias por toda la paciencia y amor, gracias por acompañarme en esta etapa tan maravillosa.

A ti padre hasta el cielo

AGRADECIMIENTOS

Doctora Marcela Arteaga le agradezco eternamente la oportunidad a pesar de las circunstancias, de poder desarrollar este proyecto, por su apoyo y sobre todo la paciencia. Gracias por permitirme crecer profesionalmente.

Doctor Sergio Montes por su gran enseñanza y apoyo, le agradezco infinitamente su paciencia.

Doctora Herlinda Bonilla le agradezco por el tiempo, el apoyo otorgado para el desarrollo de este proyecto.

A los miembros del jurado, por el esfuerzo y conocimiento aportado en este trabajo.

A la **Doctora Ofelia Limón** por sus conocimientos, por los momentos compartidos y las nuevas experiencias y vivencias.

A mis compañeros de laboratorio **Roció, Nancy, Sergio, Eduardo y Jessica** por su constante apoyo, por las experiencias compartidas, por el cariño otorgado gracias infinitas.

A mis grandes amigos y colegas maestros **Andrés, Itzel, Mónica, Rodrigo y Sofía**, por el apoyo, diversión, por acompañarme en esta aventura profesional. Los amo.

Gracias infinitas...

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	1
II. ABSTRACT.....	3
III. INTRODUCCIÓN.....	5
IV. ANTECEDENTES.....	6
Principales fuentes de contaminación y exposición al cadmio.....	6
Pubertad y Regulación Hormonal.....	7
Marcadores de la pubertad en la rata Macho.....	9
Desarrollo posnatal en órganos reproductivos.....	10
Sistema antioxidante.....	11
Superóxido dismutasa (SOD).....	11
Catalasa (CAT).....	12
Glutación peroxidasa (GPx).....	12
Toxicidad del cadmio.....	13
Cadmio y estrés oxidante.....	16
Daño por estrés oxidante (Lipoperoxidación).....	17
Efectos neuroendocrinos del cadmio.....	18
Cadmio en la pubertad.....	20
V. JUSTIFICACIÓN.....	20
VI. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
VII. PREGUNTA DE INVESTIGACION.....	21
VIII. HIPOTESIS.....	21
IX. OBJETIVO GENERAL.....	21
X. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
XI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
Obtención de los animales experimentales y asignacion de grupos.....	22
Cuantificación cadmio en sangre y tejidos reproductivos.....	23
Cuantificación de la concentración de testosterona.....	24
Cuantificación del malondialdehído (MDA) en tejido.....	24
Actividad de la enzima superoxido dismutasa (SOD).....	25

Actividad de enzima catalasa (CAT).....	25
Actividad de glutatión peroxidasa (GPx).....	26
Análisis estadístico.....	26
XII. RESULTADOS.....	27
Cuantificación de Cd en tejido y sangre.....	27
Concentración de testosterona en suero sanguíneo.....	28
Cuantificación del malondialdehído (MDA) en tejido.....	29
Actividad de la enzima superoxido dismutasa (SOD).....	30
Actividad de la enzima catalasa (CAT).....	33
Actividad de glutatión peroxidasa (GPx).....	34
Relación GSH/GSSG.....	35
XIII. DISCUSIÓN.....	36
XIV. CONCLUSIÓN.....	45
XV. BIBLIOGRAFÍA.....	46

Abreviaturas

°C, grados Celsius

μL, microlitros

3β-HSD, 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa

17β-HSD, 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa

ACTH, hormona adrenocorticotrópica

AG, acicalamiento genital

BHE, barrera hematoencefálica

CAT, catalasa

Cd, cadmio

CdCl₂, cloruro de cadmio

Cu²⁺, cobre

EROs, especies reactivas de oxígeno

E₂, 17β-estradiol

EPE, erecciones penianas espontaneas

FSH, hormona folículo estimulante

GH, hormona del crecimiento

GnRH, hormona liberadora de gonadotropinas

GPx, glutatión peroxidasa

GSR, glutatión reductasa

GSSG, glutatión oxidasa

HHT, eje hipotálamo-hipófisis-testículo

HHG, eje hipotálamo-hipófisis-gónada

IP, vía intraperitoneal

Kg, kilogramo

L, litro

LH, hormona luteinizante

LPO, lipoperoxidación

MDA, malondialdehído

mg, miligramo

Mn²⁺, manganeso

mL, mililitros

mM, milimolar

ng, nanogramo

NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

nm, nanómetros

O_2^- , radical superóxido

*OH, radical hidroxilo

OMS, organización mundial de la salud

PBS, solución de buffer fosfatos

pH, potencial hidrógeno

PRL, prolactina

SNC, sistema nervioso central

SOD, superóxido dismutasa

SP, separación prepucial

-SH, grupos sulfhidrilo

T, testosterona

TSH, tirotropina

Zn^{2+} , zinc

μg , microgramo

μm , micrómetros

I. RESUMEN

El Cadmio (Cd) es un metal pesado que es considerado como uno de los mayores agentes tóxicos asociados a la contaminación industrial y ambiental. La principal fuente de exposición es por el consumo de alimentos contaminados y por el humo del cigarro. La toxicidad del Cd se ha asociado con daños severos en varios órganos, entre ellos los del aparato reproductor masculino, siendo los testículos unos de los principales órganos afectados junto con los epidídimos. En el testículo, se lleva a cabo la producción de espermatozoides y la síntesis de testosterona (T), mientras que en el epidídimo se lleva a cabo la maduración espermática. La producción y maduración de espermatozoides, así como un incremento en la T, coincide con el desarrollo puberal de la rata Wistar (42 y 49 días de vida posnatal). El Cd se puede concentrar dentro del testículo y en el epidídimo, desde etapas muy tempranas del desarrollo y ejercer efectos negativos, dependiendo de la dosis y periodo de la exposición, se pueden presentar efectos a nivel celular. Se ha propuesto que el estrés oxidante generado por este metal puede estar implicado en la etiología de la morfología anormal de espermatozoides, lo que puede contribuir a la infertilidad masculina. Es por lo que resulta importante estudiar la exposición al Cd en relación con el desarrollo reproductivo, específicamente sobre la espermatogénesis y los mecanismos de daño asociados. Especialmente los efectos oxidantes que pueden afectar la generación de espermatozoides y su maduración epididimaria. Para ello, se utilizaron ratas crías Wistar macho, las cuales fueron destetadas a los 21 días y asignadas a cuatro grupos. Grupo 1) ratas macho administrados con solución salina vía i.p. del día 21 al día 49 de vida; Grupo 2) ratas macho administrados con 1mg/kg de CdCl₂ por vía i.p. del día 21 al día 49 de vida; Grupo 3) ratas macho tratados del día 21 al día 49 de vida con solución salina por vía i.p. y Grupo 4) ratas macho del 21 al día 49 de vida administrados con 1mg/kg de CdCl₂ por vía i.p. Los grupos 3 y 4, se dejaron en condiciones de bioterio y se utilizaron hasta el día 90 de vida. En las diferentes edades de estudio, se realizó eutanasia por decapitación para la obtención de sangre y tejido del testículo y epidídimo regionalizado en cabeza y cola para cuantificación de Cd y la medición de la actividad de enzimas antioxidantes. En los animales tratados con Cd, se muestra una mayor concentración de Cd en sangre, testículo y en ambas regiones

del epidídimo. Se observó que el Cd disminuye la concentración de la T en suero en ambos grupos, en comparación con los grupos controles, así como un aumento de malondialdehído (MDA) en testículo y epidídimo. El Cd induce alteraciones en la actividad de SOD, CAT y GPx que incide en la relación GSH/GSSG. Nuestros resultados, muestran que el Cd administrado en edades tempranas repercute en la fertilidad masculina durante la edad adulta a través de la inducción de estrés oxidante.

II. ABSTRACT

Cadmium (Cd) is a heavy metal that is considered one of the main toxic agents associated with industrial and environmental pollution. The main source of exposure is the consumption of contaminated food and cigarette smoke. The toxicity of Cd has been associated with severe damage to several organs, including those of the male reproductive system, being the testicles one of the main organs affected along with the epididymis. Sperm production and testosterone (T) synthesis are carried out in the testicle, while sperm maturation is performed in the epididymis. The production and maturation of sperm, as well as an increase in T, matches the pubertal development in Wistar rat (42 and 49 days of postnatal life, respectively). Cd can be concentrated within the testis and the epididymis, from very early development stages and exert negative effects, effects at cellular level can be presented depending on the dose and period of exposure. It has been proposed that oxidative stress generated by this metal may be involved in the etiology of abnormal sperm morphology, which may contribute to male infertility. It is therefore important to study the exposure to Cd related to reproductive development, in particular on spermatogenesis and associated damage mechanisms, especially the oxidizing effects that can affect sperm generation and epididymal maturation. For this, male Wistar young rats were used, which were weaned at 21 days and assigned to four groups. Group 1) male rats administered with saline solution via i.p. from day 21 to day 49; Group 2) male rats administered with 1 mg/kg of CdCl₂ via i.p. from day 21 to day 49; Group 3) male rats treated from day 21 to day 49 with saline solution via i.p. and Group 4) male rats from 21 to 49 days administered with 1mg/kg of CdCl₂ via i.p. Groups 3 and 4 were left at vivarium conditions and were used from their 90th day of life. Euthanasia was performed at different ages of study by decapitation to obtain blood and tissue from the testis and regionalized epididymis in head and tail for quantification of Cd and the measurement of antioxidant enzyme activity. In animals treated with Cd, a higher concentration of Cd is shown in blood, testis and in both regions of the epididymis. It was observed that Cd decreases the concentration of serum testosterone in both groups, compared to the control groups, as well as an increase in malondialdehyde (MDA) in the testis and epididymis. The Cd induces alterations in the activity of SOD, CAT and GPx that affects the GSH/GSSG

ratio. Our results show that Cd administered at an early age affects male fertility during adulthood through the induction of oxidative stress.

III. INTRODUCCIÓN

El cadmio (Cd) es un metal pesado con actividad fisiológica negativa, es considerado uno de los mayores agentes tóxicos asociados a contaminación ambiental e industrial (Ramírez, 2002). Ejerce múltiples efectos en la salud y está clasificado como cancerígeno por la Agencia para el Registro de Sustancias Tóxicas y Enfermedades de Estados Unidos (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*) (ATSDR, 2012).

La contaminación por Cd es producto de las actividades antropogénicas, de tal forma que la población en general está expuesta a Cd a través del agua, la comida, el aire contaminado, además del hábito de fumar. Se ha reportado que el Cd está implicado en la carcinogénesis en múltiples órganos incluyendo pulmón, riñón, próstata, hígado, páncreas y testículos (Waalkes, 2000). Existen reportes de los daños provocados por el Cd en la reproducción, que demuestran que la exposición a Cd en etapa adulta causa infertilidad, tanto en machos como en hembras de diferentes especies, ocasionando principalmente lesiones en las gónadas (Arteaga-Silva *et al.*, 2012). El testículo es un órgano blanco de la toxicidad por Cd, pues disminuye la concentración de testosterona (T) (Lafuente *et al.*, 2001; Ji *et al.*, 2010), disminuye la concentración de espermatozoides y causa anormalidades en su morfología (Abarikwu *et al.*, 2016). El Cd también tiene efectos sobre el hipotálamo y la hipófisis causando alteraciones sobre la función reproductiva (Arteaga-Silva *et al.*, 2006; Mouritsen *et al.*, 2010).

Por otro lado, se ha reportado que el Cd produce modificaciones celulares del balance Redox (Cuypers *et al.*, 2010) favoreciendo la lipoperoxidación asociada al incremento en la concentración de especies reactivas del oxígeno (ERO) (Thévenod, 2010) induciendo estrés oxidante, alterando el desarrollo adecuado de la espermatogénesis (Monsefi *et al.*, 2010). A pesar de los estudios realizados en relación con el daño del Cd en la reproducción, se ha estudiado poco el efecto de la exposición al Cd durante la pubertad y su repercusión en etapas adultas, por lo que es necesario indagar más sus efectos en esta etapa, debido a que los seres humanos se encuentran expuestos a Cd en etapas tempranas como la pubertad y puede afectar la función testicular y epididimaria de la etapa adulta.

IV. ANTECEDENTES

Cadmio

El cadmio es un elemento químico cuyo símbolo es Cd, se encuentra en el grupo II-B de la tabla periódica, presenta un peso atómico de 112.4, número atómico de 48 y densidad relativa de 8.65 a 20 °C (68 °F). Su punto de fusión de 320.9 °C (610 °F) y de ebullición de 765 °C (1410 °F). Es un metal dúctil, de color blanco argentino con un ligero matiz azulado que generalmente no se presenta en el ambiente en forma pura, forma compuestos con otros elementos como el oxígeno (óxido de Cd), cloro (cloruro de Cd) o azufre (sulfato y sulfuro de Cd). Además, este elemento se asemeja al Zn^{2+} , pero difieren en sus puntos de ebullición, 907 y 767 °C, respectivamente (ATSDR, 2012). El Cd es divalente en todos sus compuestos estables y su ion es incoloro. Es importante resaltar que no existen reglas sobre el control del Cd en artículos de uso diario como pinturas, baterías, fertilizantes, entre otros, incluso no existe un acuerdo internacional con la cantidad de Cd exacta que pueda provocar daños a la salud a corto o largo plazo (Pérez-García y Azcona-Cruz, 2012).

El Cd es uno de los mayores agentes tóxicos asociados a contaminación ambiental e industrial, pues reúne cuatro de las características más distintivas de un tóxico, que son:

1. Causa efectos adversos para el hombre y el medio ambiente.
2. Presenta bioacumulación.
3. Persiste en el medio ambiente.
4. Es transportado grandes distancias por el viento y el agua (Ramírez, 2002).

Principales fuentes de contaminación y exposición al cadmio

Dentro de las principales fuentes de contaminación de Cd se encuentran la industria minero-metalúrgica, la fabricación de fertilizantes fosfatados, la incineración de residuos de madera, carbón o “plásticos”, la combustión de aceite y gasolina, y las aplicaciones industriales de Cd. La concentración de Cd en aire de áreas industriales varía entre 9.1 y 26.7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ frente a un 0.1 a 6 ng/m^3 en el aire de áreas rurales y el tiempo de permanencia del Cd en suelos es de hasta 300 años y el 90 % permanece sin transformarse (Ramírez, 2002). El Cd llega al suelo de los terrenos agrícolas por

deposición aérea (41 %), con los fertilizantes fosfatados (54 %), por aplicación de abono de estiércol (5 %) y frecuentemente por efluentes que contienen residuos líquidos y sólidos de plantas hidrometalúrgicas de Cd (Ramírez, 2002).

De menor importancia en contaminación ambiental por Cd son las partículas de polvo de caucho provenientes de las ruedas de automóvil, de la galvanización con Zn^{2+} de tuberías, de plásticos que contienen pigmentos coloreados de Cd y de la industria de cerámica glaseada. Se ha descrito intoxicación por uso doméstico de algunos utensilios bañados en Cd o por usar cubiertos de plata aleada con Cd y pinturas a base de Cd (Ramírez, 2002). Con respecto a la exposición no ocupacional, al Cd la alimentación y el tabaco constituyen las dos fuentes principales de exposición a este metal. Los fumadores pueden inhalar de Cd 0.5 a 1 μg por cigarrillo con una absorción aproximada del 50 %. Es por lo que, los fumadores forman un grupo especial, cuando se investigan los efectos tóxicos por exposición a Cd (Satarug y Moore, 2004, Ganguly *et al.*, 2018) Estudios realizados en la Ciudad de México, en hombres mayores de 40 años de edad, con ciertas características como ocupación de vida, antecedentes de tabaquismo, hábitos alimenticios, que viven en la zona centro y oeste de la ciudad mostraron que estos individuos tienen una mayor exposición a este metal, también se encontró un contenido alto de Cd al consumir embutidos de puerco (Torres-Sánchez *et al.*, 2018).

Pubertad y regulación hormonal

La pubertad en los mamíferos es un período de transición entre la infancia y la edad adulta, donde ocurren cambios endocrinos y morfológicos que llevan a los individuos a alcanzar la madurez sexual y su función reproductiva (Stoker *et al.*, 2000).

La pubertad masculina en los mamíferos se inicia con la activación del eje hipotálamo-hipófisis-testículo (HHT) (Abreu y Kaiser, 2016). En este proceso, áreas cerebrales como el núcleo arcuato del hipotálamo, secreta la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), que actúa en la hipófisis generando la liberación pulsátil de las gonadotropinas: la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH), estas a su vez actúan sobre el testículo. La activación de este eje produce la secreción de T, por parte de las células de Leydig que se encuentran entre los túbulos

seminíferos del testículo que posteriormente, en tejidos periféricos se metaboliza en dihidrotestosterona (DHT) y estradiol (E₂) (Lafuente, 2013; Jin *et al.*, 2016).

La T y su metabolito DHT desempeñan un papel importante en el desarrollo de los órganos reproductores masculinos (Dohle *et al.*, 2003; Abd El-Meseeh *et al.*, 2016; Rudolph *et al.*, 2016). Para que estas hormonas sexuales sean secretadas y ejerzan su acción, existen tres procesos primarios previos que se tienen que establecer en el eje HHT. Estos son: liberación de la GnRH por parte de neuronas secretoras del núcleo arcuato; la secreción de las gonadotropinas de la adenohipófisis que, a través de los gonadotropos secretan LH y FSH. Finalmente, se lleva a cabo la respuesta de los testículos, los cuales responden a la acción que ejercen la LH y la FSH, secretando T. De tal forma, que las concentraciones de FSH y de LH en la adenohipófisis y el contenido de la GnRH en el hipotálamo, se incrementan de manera pulsátil y progresiva durante el crecimiento testicular en la rata macho (Al-Tikriti *et al.*, 2017). Además, en la pubertad de la rata macho los cambios en la secreción de las gonadotropinas preceden a la maduración de los testículos. De manera que se ha establecido, que la liberación de FSH dentro de los túbulos seminíferos, facilita la espermatogénesis (Rudolph *et al.*, 2016; Al-Tikriti *et al.*, 2017), mientras que la LH estimula la secreción de T por acción directa en las células de Leydig (Abd El-Meseeh *et al.*, 2016; Rudolph *et al.*, 2016). Las concentraciones de T, en la rata macho, comienzan a incrementarse en la primera semana de vida alcanzando picos máximo de concentración en los días 33 y 49 de edad (Rudolph *et al.*, 2016), y la máxima respuesta de FSH sucede entre los 25 y 35 días de edad (Abd El-Meseeh *et al.*, 2016). Aunque la regulación del eje HHT se da principalmente por la FSH y la LH, se ha demostrado que otras hormonas pueden regular a este eje. Así, se sabe que las concentraciones de prolactina (PRL) se encuentran bajas hasta el día 20 postnatal, y se incrementan significativamente entre los días 25 y 40 de vida de la rata, observándose un pico máximo en la concentración de PRL que coincide con el inicio del crecimiento en la próstata y la vesícula seminal (Becú y Libertun, 1982).

Marcadores de la pubertad en la rata macho

En la rata el desarrollo sexual postnatal se ha dividido en cuatro etapas: 1) un período neonatal que comprende la primera semana de vida extrauterina (el día del nacimiento se designa día de vida 0), 2) un período infantil que se extiende desde el día de vida 8 al 21 (edad al destete), 3) un período juvenil que termina alrededor del día de vida 35, y 4) un período peripuberal que termina entre los días de vida 55 a 60, con la aparición de espermatozoides maduros en el conducto deferente (Prevot, 2015). Los indicadores de pubertad en el macho, tiene lugar entre los días 42 y 49 de vida (Ojeda & Skinner, 2005; Arteaga-Silva *et al.*, 2013), éstos incluyen cambios fisiológicos, tales como la maduración de las espermatogonias, la aparición de espermatozoides, la separación prepucial (SP), además de patrones conductuales tales como el acicalamiento genital (AG) y las erecciones peneanas espontáneas (EPE). La separación prepucial (SP) ocurre en la etapa peripuberal y se hace evidente cuando el prepucio comienza a retraerse gradualmente desde el día de vida 41 al 47, siendo el día de vida 47 en donde se presenta la separación prepucial completa (Korenbrot *et al.*, 1977; Hernández-González, 2000).

El AG consiste en el lamido de los testículos, pene y región anogenital. Esta conducta se presenta al inicio del destete y se incrementa en la pubertad, alcanzado su mayor manifestación a los 46 y 48 días de vida (Sachs *et al.*, 1984; Moore, 1986; Hernández-González, 2000). La ocurrencia con que sucede el AG es regulada por concentraciones hormonales de la LH y la T (Sachs *et al.*, 1984; Moore, 1986). Las EPE son aquellas que ocurren en ratas peripuberales hospedadas de forma individual o en grupo, pero en ausencia de estímulo proveniente de una potencial pareja sexual (una hembra receptiva). Generalmente ocurren al final de un tren de AG y su pico de ocurrencia es alrededor de los 47 días de vida (Hernández-González, 2000).

Todas las manifestaciones fisiológicas y morfológicas anteriormente descritas durante la pubertad están altamente influenciadas por las hormonas y factores ambientales (Stoker *et al.*, 2000; García-Rodríguez y Díaz-Loving, 2011; Juárez-Flores *et al.*, 2013).

Desarrollo posnatal de los órganos reproductivos

El desarrollo y la diferenciación de los órganos reproductivos inician desde etapas muy tempranas en la vida embrionaria. Desde el día 13 del desarrollo embrionario se forman de manera hormono-dependiente los cordones seminíferos, estos cordones continúan desarrollándose por la acción de la LH, la cual comienza a secretarse a partir del día 15 del desarrollo embrionario (Bajszczak y Slowikowska-Hilczer, 2016; Meena *et al.*, 2017). Las células germinales siguen un patrón de crecimiento específico en el tejido testicular con cambios característicos en el epitelio de los túbulos seminíferos y un aumento en el número de las células de Leydig en el intersticio (Dorostghoal *et al.*, 2010). En el testículo, la dependencia a los andrógenos es fundamental para el adecuado desarrollo de los túbulos seminíferos y el establecimiento de la espermatogénesis para una continua formación de espermatozoides maduros a partir de células precursoras (Kretser y Kerr, 1994).

Aunque la T es producida por los testículos del feto, la DHT es la responsable de la morfogénesis de los órganos sexuales. La T es metabolizada por la enzima 5 α -reductasa a DHT en el seno urogenital en los genitales externos de la rata, conejo y humanos (Riccetti *et al.*, 2017). La deficiencia de esta enzima da como resultado un crecimiento anormal de los genitales externos, efectos similares se han observado con la exposición a disruptores endocrinos (Jackson *et al.*, 2008).

El epidídimo inicia su desarrollo con los conductos eferentes, los cuales son los puentes de comunicación con el testículo y termina en el conducto deferente. Es un órgano estructurado por un tubo largo que varía en longitud dependiendo de la especie (Robaire y Hinton, 2015). Para su estudio, el epidídimo generalmente se divide en tres regiones anatómicas: cabeza (región cefálica), cuerpo (región media) y cola (región caudal). Se han descrito tres grandes etapas del desarrollo del epidídimo que son: el periodo de indiferenciación, periodo de diferenciación y el periodo de expansión (Robaire y Hinton, 2015). El epidídimo desde el nacimiento presenta un desarrollo en las regiones iniciales (segmento inicial al cuerpo) y su la cola aún tiene que completar su desarrollo y enrollamiento, en los días de vida 1 y 2 es cuando se forman los tabiques individuales que definen los segmentos del túbulo. En esta etapa, el epitelio es indiferenciado y se caracteriza por estar constituido de células columnares, que

contienen numerosos estereocilios. Desde sus orígenes embriológicos y después del día 15 posnatal, se observa un importante crecimiento del conducto del epidídimo de la rata, el cual es dependiente de T y cuya longitud es de casi 2 m. El período de expansión se describe como el crecimiento continuo del conducto y la aparición de espermatozoides en el lumen (Robaire y Hinton, 2015).

Los principales cambios en el desarrollo del epidídimo de la rata son los siguientes: en el día de vida 14, está la aparición de células halo; en el día de vida 15, se observan células estrechas y columnares; en el día de vida 28, las células columnares se diferencian en células basales y principales. Del día de vida 36 en adelante se observan células estrechas y claras, aproximadamente en el día de vida 49, todas las células epididimarias están completamente diferenciadas (Robaire y Hinton, 2015).

Sistema antioxidante

Para contrarrestar el daño producido por los radicales libres, el organismo cuenta con sistemas de defensa antioxidante, cuyo principal objetivo es restablecer el equilibrio entre el sistema del organismo. Los antioxidantes son moléculas encargadas de neutralizar las reacciones ocasionadas por los radicales libres y pueden ser enzimáticos y no enzimáticos. Entre los primeros se tienen las enzimas superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx). Como mecanismos no enzimáticos se tienen a las vitaminas A, C y E, al glutatión (GSH), al ácido lipoico, carotenoides, vitaminas B1, B2, B6, B12, entre otros (Johansen *et al.*, 2005).

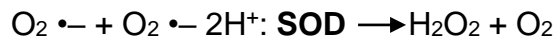
Superóxido dismutasa (SOD)

Enzima de gran importancia, pues es el primer sistema de defensa contra las ERO, dependiendo de su sitio activo la SOD se puede clasificar en tres isoformas: Cu/Zn-SOD (SOD1) que se ubica en citoplasma, Mn-SOD (SOD2), se encuentra en la mitocondria y una isoforma ubicada extracelularmente (SOD Ex), la actividad de estas enzimas se ha descrito en las células germinales y células de Sertoli (Mruk *et al.*, 2002; Aitken y Roman, 2008). Al aislar ARN total del hígado, cerebro y testículo de ratón en etapa prepuberal y etapa adulta sin ningún tipo de tratamiento, se observó un aumento

en la expresión de ARNm de la Mn-SOD en el testículo y en hígado, a diferencia de GPx y CAT (Gu y Hecht, 1996; Aitken y Roman, 2008).

En el epidídimo se han descrito niveles muy altos en la expresión de la enzima SOD1 en todo este órgano (Jervis y Robaire, 2001; Vernet *et al.*, 2004). En la región de la cola, encargada del almacén de los espermatozoides, la presencia de esta enzima en el fluido del túbulo del epidídimo es fundamental para la protección de los espermatozoides ante el estrés oxidante (Tramer *et al.*, 1998; Vernet *et al.*, 2004).

Reacción SOD:

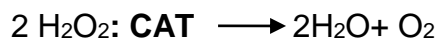


Catalasa (CAT)

Es de suma importancia la eliminación del H₂O₂ de la membrana de la célula para evitar daño en lípidos, proteínas y en el DNA esta eliminación la lleva a cabo las enzimas CAT y GPx (Zini y Schlegel, 1997; Aitken y Roman, 2008). Se ha reportado una mayor actividad de CAT en células de Leydig (Petrola *et al.*, 1996; Aitken y Roman, 2008). Se han reportado bajos niveles del RNAm de CAT en testículo en comparación con el RNAm de SOD y GPx (Vernet *et al.*, 2004).

Se ha demostrado claramente la actividad de esta enzima en los espermatozoides a través del tránsito por el epidídimo o en la eyaculación (Zini *et al.*, 1993; Vernet *et al.*, 2004). Su actividad inicia cuando aumenta la presencia de H₂O₂ (Cohen y Hochstein, 1963; Vernet *et al.*, 2004). La participación de esta enzima no parece ser tan importante ante el daño por estrés oxidante (Vernet *et al.*, 2004)

Reacción CAT:



Glutación peroxidasa (GPx)

En la literatura se ha descrito cuatro miembros de la familia de la enzima antioxidante GPx (GPx-1, 3, 4 y 5), que se encuentra en las células epiteliales del epidídimo, así como en los espermatozoides y en el líquido seminal (Vernet *et al.*, 2004), siendo su

papel de mayor actividad ante la presencia de H₂O₂ en epidídimo (Dufaure *et al.*, 1996; Zini y Schlegel, 1997; Vernet *et al.*, 2004). Se ha observado que la forma GPx-1 es la más importante y su actividad se ha descrito en testículo y epidídimo (Dufaure *et al.*, 1996; Zini y Schlegel, 1997; Vernet *et al.*, 2004); en la forma celular GPx-3 se ha descrito que su expresión principal es en el citosol de la células epiteliales de la región de la cola epidídimo, observándose en la región de la cola una expresión menor que es secretada hacia el lumen, debiéndose su control de expresión de los andrógenos en la región de cola y cuerpo y siendo independiente de andrógenos en la región de la cabeza en el epidídimo (Schwaab *et al.*, 1998; Vernet *et al.*, 2004), respecto a la actividad de GPx-4 es mayor en testículo comparado con otros órganos como el hígado y corazón, dándose su expresión en células germinales y células de Leydig (Baek *et al.*, 2007). Esta expresión es influenciada por la T, ya que se observa después de la pubertad (Maiorino *et al.*, 1998), participa en procesos de espermatogénesis, pero no se expresa en células de Sertoli (Roveri *et al.*, 1992). El viaje que lleva el espermatozoide por el epidídimo inicia desde la región de la cabeza hacia la región de la cola llevándose a cabo la modificación estructural de la membrana plasmática y proteínas asociadas que confieren la capacidad fertilizante del espermatozoide. En la región de la cola los espermatozoides se vuelven altamente susceptibles a la lipoperoxidación inducido por el ataque de ERO (Vernet *et al.*, 2004), sobre la actividad de GPx-5 se ha establecido que es secretada en la región de la cabeza hacia el lumen, influenciada bajo el control de T (Faure *et al.*, 1991; Vernet *et al.*, 2004), durante el tránsito del espermatozoide por el epidídimo se expresa esta enzima en la membrana plasmática (Jimenez *et al.*, 1992; Vernet *et al.*, 2004).

Reacción GPx:



Toxicidad del cadmio

El Cd requiere de varios mecanismos para inducir toxicidad en células de diversos sistemas y tejidos, afectando su función ya sea directa o indirectamente; los efectos

tóxicos inducen degeneración o incluso trasmutación de las células (Zarros *et al.*, 2008; Rani *et al.*, 2013)

A nivel celular el Cd tiene la capacidad para provocar daño por estrés oxidante que ocasiona daño al DNA, lo que conlleva a (1) inducción de la proliferación celular, (2) inhibición de los mecanismos apoptóticos y (3) bloqueo de los mecanismos de reparación del DNA (Zarros *et al.*, 2008; Rani *et al.*, 2013).

Los posibles mecanismos por los cuales el Cd induce daño son la interferencia con los procesos dependientes del Ca^{2+} y del Zn^{2+} , la inducción de la apoptosis y el estrés oxidativo mediante la producción de ERO (Fouad y Jresat, 2011; Momeni y Eskandari, 2019).

En las últimas décadas, numerosos estudios han demostrado que la exposición ambiental y ocupacional al Cd, está relacionada con la infertilidad y la mala calidad del semen en los seres humanos, pues en varias investigaciones epidemiológicas se observó una correlación entre la concentración de Cd sanguíneo y la calidad del semen (Xu *et al.*, 1993; Pant *et al.*, 2003). Se han utilizado varias especies de mamíferos se han utilizado con diferentes esquemas de administración para estudiar los efectos adversos del Cd en los sistemas biológicos (Amara *et al.*, 2008; Samuel *et al.*, 2011). Dichos esquemas se han aplicado durante el embarazo y lactancia, administrándose el Cd en dosis de 1mg/Kg y 30 mg/Kg por vías de administración intraperitoneal y oral en agua de consumo, respectivamente, observándose daño testicular y disminución en la concentración de T (Salvatori *et al.*, 2004; Chemek *et al.*, 2016). La exposición al metal genera su acumulación en diferentes tejidos, entre los que incluyen, el testículo y el epidídimo (Abdalla *et al.*, 2014). Durante la pubertad (35 días), la exposición al Cd en dosis de 1mg/Kg reduce notablemente el peso de los testículos, el epidídimo, la próstata y la vesícula (Ji *et al.*, 2010). Además, se ha reportado que la exposición al Cd durante la edad puberal interrumpe la vía de regulación de la síntesis de T testicular, además de la expresión de la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR). La disminución de la síntesis de T testicular podría, contribuir a provocar un daño al desarrollo testicular y la espermatogénesis en ratones (Li *et al.*, 2009). Otras de las alteraciones causadas por el Cd, en animales adultos, se ven reflejadas directamente sobre los espermatozoides, los cuales se encuentran afectados en su

concentración y movilidad. También, se ha reportado que la concentración de Cd en la sangre de pacientes con infertilidad es inversamente proporcional a la concentración de espermatozoides en el eyaculado, lo mismo ocurre con el porcentaje de espermatozoides móviles (Benoff *et al.*, 2009). De hecho, la exposición a este metal causa efectos dañinos en los espermatozoides, observándose un incremento de la fragmentación del DNA, una reacción acrosomal prematura y disminución de la movilidad (Oliveira *et al.*, 2009). El Cd está clasificado como un disruptor endocrino tanto en humanos como en animales debido a que interfiere con la función de las células endocrinas (Adaramoye *et al.*, 2016), y por tanto con la función reproductiva de ratas macho adultas (Cupertino *et al.*, 2017). Las poblaciones más vulnerables a la exposición a Cd son los niños y los sujetos en desarrollo uterino, pues la exposición temprana predispone potencialmente a dichas enfermedades en los jóvenes y, debido a la mayor susceptibilidad del sistema nervioso, ocurren problemas cognitivos, reproductivos y conductuales (Sears *et al.*, 2012). Se ha reportado, que en adolescentes de comunidades italianas expuestos a Cd se retrasa el inicio de la pubertad, reportándose que existe una relación entre la concentración sérica de Cd y el hipogonadismo en niños varones, además de que presentan una disminución en las concentraciones de T en sangre (Interdonato *et al.*, 2015).

La principal fuente de exposición no ocupacional al Cd es el consumo de alimentos y agua contaminados. En etapas tempranas de la vida (Pérez-García y Azcona-Cruz, 2012), pero otra fuente importante es el humo de tabaco ambiental es otra fuente importante. Un cigarrillo contiene entre 0.5 a 1 µg de Cd, lo que puede causar un aumento significativo en la concentración de Cd en sangre, quizás 4 a 5 veces más altos en fumadores que en no fumadores (Satarug y Moore, 2004; Ganguly *et al.*, 2018). Así, fumar en exceso es una fuente de exposición de Cd en los seres humanos, provocando la acumulación de este metal en los testículos, y en particular se ha asociado con un bajo número de espermatozoides y baja motilidad (el-Demerdash *et al.*, 2003).

Dependiendo de la dosis y el periodo de la exposición al Cd, se pueden presentar efectos a nivel celular (Lacorte *et al.*, 2013). En este sentido se ha propuesto que el

estrés oxidante está implicado en la etiología de la morfología anormal de espermatozoides, lo que resulta en la infertilidad masculina (Correia *et al.*, 2017).

Cadmio y estrés oxidante

El Cd es un elemento que regularmente se encuentra en combinación con otros elementos tales como el oxígeno, el cloro y el azufre. A nivel celular, se ha reportado como un inductor de estrés oxidante (Valko *et al.*, 2005), aunque se considera que no es un metal que puede inducir la reacción de Fenton, por sí mismo, su efecto celular más estudiado está relacionado con modificaciones del balance Redox (Cuypers *et al.*, 2010). El Cd induce estrés oxidante por tres mecanismos indirectos, principalmente la unión de grupos sulfhidrilo (-SH) con Cd; provocando el agotamiento de glutatión reducido (GSH), segundo mecanismo es la interferencia del Cd con iones esenciales (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+}) inhibiendo la actividad de enzimas antioxidantes, conllevando a la inhibición de la cadena de transportes de electrones en la mitocondria (Stohs y Bagch, 1995; Valko *et al.*, 2005), interfiriendo con los lípidos de las membranas plasmáticas favoreciendo la lipoperoxidación, posteriormente el daño a proteínas y por último la degradación del DNA, induciendo la apoptosis celular (Thévenod, 2010), como se observa en la figura 1.

Debido a que el Cd muestra gran afinidad por los grupos (-SH) al unirse al que se encuentra en el glutatión (López *et al.*, 2006), inactiva a este importante agente antioxidante endógeno. Por lo que, en condiciones de alto contenido de Cd, se favorece un ambiente oxidante, al aumentar los niveles de ERO, producidos en los organelos celulares con una alta actividad oxidante como son los peroxisomas y la mitocondria.

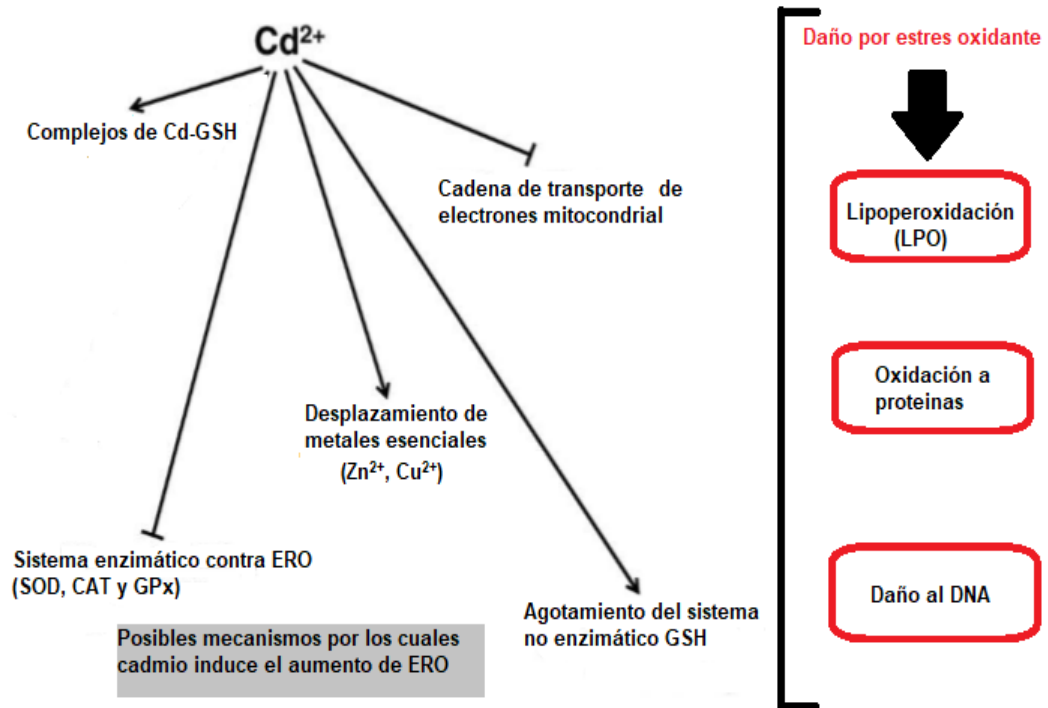


Figura 1: Mecanismo de toxicidad por cadmio. (Modificada de Thévenod, 2009). Mecanismos principales por los cuales el Cd induce estrés oxidante, agotamiento de GSH (glutathion reducido), por formación de complejos del Cd-GSH; inhibición de la actividad antioxidante SOD, CAT y GPx, lo que provoca la inhibición de la cadena de transporte de la mitocondria.

Daño por estrés oxidante (Lipoperoxidación)

El estrés oxidante a nivel celular es caracterizado por el desbalance de radicales libres y los sistemas antioxidantes. Un radical libre es una especie química que tiene en su última capa uno o más electrones desapareados, lo que los vuelve inestables y altamente reactivos. Los radicales libres pueden derivarse de oxígeno generando especies reactivas del oxígeno (ERO) o del nitrógeno (especies reactivas del nitrógeno o ERN). Las ERO son radicales libres en los cuales, el electrón desapareado se sitúa predominante en el átomo de oxígeno; habitualmente el oxígeno se encuentra en su forma más estable, la molécula diatómica O_2 , presentando los electrones que forman parte del enlace π en el mismo espín (estado triplete) (Johansen, 2005).

La formación del radical hidroxilo (*OH) (generado a través de la reacción de Fenton), es la vía por la que se induce la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados este daño es nombrado lipoperoxidación (Welch *et al.*, 2001; Valko *et al.*, 2005). La lipoperoxidación es un proceso que presenta las siguientes etapas; iniciación, propagación y terminación (Valko *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2005).

Dentro de las técnicas utilizadas para medir el daño causado por lipoperoxidación se encuentra la evaluación de la concentración del malondialdehído (MDA) que es ampliamente utilizado para reflejar el grado de lipoperoxidación *in vivo*, que puede causar cambios en la función celular, toxicidad genética, daño en el DNA y la carcinogénesis (Korchazhkina *et al.*, 2003; Aitken y Roman, 2008).

Efectos neuroendocrinos del cadmio

El Cd también se acumula y causa diversas alteraciones en todos los niveles del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG) (Lafuente, 2013). El Cd es considerado como disruptor endocrino al actuar en dosis muy bajas, puede interrumpir la funcionalidad del eje HHG alterando el equilibrio hormonal en estos tres niveles glandulares, provocando diferentes efectos adversos sobre la salud de las personas, animales o de sus descendientes (Lafuente, 2013). Además, puede provocar alteraciones del comportamiento, dependiendo de dónde ejerza su efecto sobre el eje HHG y del momento de la exposición; es decir durante el desarrollo fetal, la infancia, la pubertad o la etapa adulta (Arteaga-Silva *et al.*, 2015).

El Cd en el hipotálamo altera las concentraciones de aminas biogénicas hipotalámicas como la dopamina, la norepinefrina y la serotonina, además de las concentraciones de aminoácidos como el glutamato, el aspartato, la taurina y el ácido gama aminobutírico (GABA) (Lafuente y Esquifino, 1999), presentándose diferentes efectos dependiendo de la edad de administración del Cd. A pesar de que los mecanismos involucrados en la alteración de la actividad del eje HHG no se han entendido completamente en la actualidad, si es bien sabido que la administración de Cd afecta los mecanismos de secreción de hormonas adenohipofisarias como la prolactina (PRL), hormona adrenocorticotropa (ACTH), hormona del crecimiento (GH), hormona estimulante de la tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH) (Lafuente y Esquino, 1999). El Cd atraviesa

la barrera hematoencefálica (BHE) (López *et al.*, 2003) y se acumula en distintas regiones cerebrales (Lafuente *et al.*, 2003; Ong *et al.*, 2006). También puede depositarse en el plexo coroideo que constituye la BHE y destruir la ultraestructura de este (Manton y Kirkpatrick, 1984; Zheng, 2001).

Según diversos autores (Wong y Klaassen, 1980; Choudhuri *et al.*, 1996) algunas patologías neurológicas, podrían ser debidas a un aumento en la permeabilidad de la BHE al Cd y al estrés oxidativo que produce en el sistema nervioso central (SNC) (Gutiérrez-Reyes, Albores y Ríos, 1998). En cuanto a la hipófisis, estudios clásicos sugieren que los gonadotropos (células hipofisarias) de ratas y de monos son altamente sensibles al Cd (Allanson y Deanesly, 1962; Girod, 1964; Lafuente, 2013). Más recientemente, se ha demostrado una posible relación entre la exposición al Cd y la actividad hipofisaria, observándose que la exposición al Cd en el aire urbano reduce la secreción de la FSH en los trabajadores varones (Ciarrocca *et al.*, 2013). Por otro lado, también se sabe que el Cd podría interactuar con el Pb en el retraso de la aparición y/o progresión de la pubertad, mediante la reducción de las concentraciones séricas de inhibina B en edades peripuberales (Gollenberg *et al.*, 2010). Más aun, se ha observado que en ratas macho adultas tratadas con Cd, se presenta una disminución en la concentración de la hormona FSH en plasma, lo cual va acompañado de una baja en el número de espermatozoides. Además, se ha reportado que el Cd es capaz de alterar la frecuencia del pulso y la vida media de la LH en ratas machos púberes y adultas (Lafuente *et al.*, 1999).

A nivel testicular la dosis 0.5 a 1 mg/Kg de Cd administrada por vía intraperitoneal en ratas adultas provoca la disminución de la concentración de T en plasma (Lafuente *et al.*, 2000). Además, la administración de Cd en una dosis de 4 mg / Kg durante 6 días induce, a nivel testicular, una disminución importante de la actividad de las enzimas esteroideogénicas testiculares: 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) y 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD), que son las enzimas clave para la biosíntesis de T (Ji *et al.*, 2010), por lo tanto se observa también, una disminución en el recuento de espermatozoides testiculares así como la pérdida en la movilidad espermática, un aumento de la concentración intracelular (ERO), una mayor (LPO) y fragmentación del DNA (Manna *et al.*, 2008).

Cadmio en la pubertad

Estudios realizados con animales en etapa puberal con administración de 1 a 5 mg/Kg de Cd en periodos de hasta cuatro semanas, han demostrado una disminución en la concentración de T, disminución del tamaño testicular y del epidídimo, así como daño celular causado por estrés oxidante inducido por este metal (Djuric *et al.*, 2015; Elmallah *et al.*, 2017). Estudios en humanos entre los 12 a 14 años, que han vivido expuestos en un área industrial, describieron efectos como inicio tardío de la pubertad (puntuación de Tanner), disminución en volumen testicular, así como una menor concentración de T en suero, así como altos niveles de Cd en orina (Interdonato *et al.*, 2015). Se ha reportado la alteración de la actividad de enzimas antioxidantes, así como daño por estrés oxidante con un aumento de MDA en el epidídimo de ratas prepúberes, que tuvieron una exposición oral de 15 ppm de CdCl₂ durante 140 días (Lacorte *et al.*, 2013).

En ratas en etapa adulta se ha observado daño gonadal así como en el epidídimo, después de la administración de este metal ya sea por vía oral o intraperitoneal (Adamkovicova *et al.*, 2014) Otros autores han observado en etapa adulta disminución en la concentración de T, menor tamaño testicular y epidídimo, comprometiendo el desarrollo adecuado de la espermatogénesis, menor concentración de espermatozoides, menor vitalidad, así como una menor población de células de Leydig (Nna *et al.*, 2017).

V. JUSTIFICACIÓN

La presencia en el ambiente de metales pesados como el Cd, es producto de las actividades antropogénicas; como consecuencia, la población se encuentra en constante exposición a este tóxico. Debido a que la exposición al metal en etapas tempranas del desarrollo puede afectar procesos reproductivos como la generación de espermatozoides, esto puede estar relacionado a su vez, con la infertilidad masculina en adultos. A la fecha, son pocos los estudios que relacionan el efecto del Cd y los procesos de pubertad; sin embargo, es precisamente en esta etapa del desarrollo que diversos procesos reproductivos pueden ser afectados por el Cd, el cual se acumula

en los tres niveles del eje HHT, observándose disminución de la concentración de T. Asimismo, la susceptibilidad de los componentes del eje HHT varía en el periodo de desarrollo en el que se encuentre el individuo durante la exposición, es por ello que es importante indagar los efectos del Cd durante la pubertad, desde el punto de vista del estrés oxidante sobre los diferentes componentes anatómicos involucrados en particular con el testículo y epidídimo. Dilucidar los mecanismos de toxicidad del Cd a este nivel nos ayudará de igual forma, a plantear posibles soluciones para los problemas de salud causados por este metal tóxico.

VI. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

La influencia que tienen los contaminantes ambientales en la salud reproductiva de los mamíferos es muy conocida y se sabe que estos pueden impactar en etapas tempranas del desarrollo con efectos adversos en la etapa reproductiva del individuo. Es por esto, que resulta importante estudiar la exposición al Cd en relación con el desarrollo reproductivo específicamente sobre la espermatogénesis, y los mecanismos de daño asociados, especialmente los efectos oxidantes que pueden afectar la generación de espermatozoides y su maduración epididimaria.

VII. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cómo afecta la exposición a Cd en la etapa puberal a la generación de estrés oxidante generada por éste y la concentración de testosterona cuando la rata alcanza la madurez sexual?

VIII. HIPÓTESIS

Si la exposición al Cd induce estrés oxidante en testículo y epidídimo de ratas Wistar en etapas puberales, entonces se afectará la actividad de las enzimas antioxidantes y la concentración de testosterona cuando la alcanza la etapa adulta.

IX. OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de la exposición al Cd sobre marcadores de estrés oxidante en órganos reproductivos y la concentración sérica de testosterona de ratas Wistar en etapa puberal y en la etapa adulta.

X. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar la concentración de Cd en sangre, testículo y epidídimo en ratas adultas expuestas a este metal durante la etapa puberal.
- 2) Evaluar el efecto oxidante del Cd en testículo y epidídimo de ratas en etapa puberal (malondialdehído)
- 3) Evaluar la actividad de las enzimas SOD, CAT y GPx en testículo y epidídimo de ratas adultas que fueron expuestas a Cd durante la etapa puberal.
- 4) Determinar la concentración de testosterona en ratas adultas que fueron expuestas al Cd en etapa puberal.

XI. MATERIAL Y MÉTODO

Obtención de los animales experimentales y asignación de grupos

Se utilizaron ratas hembra gestantes del bioterio de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, las cuales fueron colocadas en cajas de manera individual y mantenidas en ciclo invertido de luz oscuridad 12: 12 a una temperatura constante (24 °C) y libre acceso a comida y agua. Los animales fueron manejados de acuerdo con los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio), en conjunto con la conducción ética de la investigación, la docencia y la difusión en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM-Iztapalapa y al INH para el cuidado animal. Se esperó el nacimiento de las crías, utilizando solo los machos para los experimentos realizados.

Se formaron cuatro grupos experimentales al destete de las ratas macho en el día 21 y se inició el tratamiento:

- **Grupo 1:** Control, se administró 0.1 ml de solución salina por vía intraperitoneal del día 21 al 49 de vida.
- **Grupo 2:** Se administró 1mg/kg de peso de CdCl₂ disuelto con agua destilada (Sigma, Chemical Co. St. Louis. MO, EEUU) por vía i.p. del día 21 al 49 de vida.
- **Grupo 3:** Control, se administró 0.1 ml de solución salina por vía i.p. del día 21 al 49 de vida, posteriormente se les dejó sin tratamiento hasta el día 90 de vida.
- **Grupo 4:** Se administró 1mg/kg de peso de CdCl₂ disuelto con agua destilada (Sigma, Chemical Co. St. Louis. MO, EE. UU.) por vía i.p. del día 21 al 49 de vida, posteriormente se les dejó sin tratamiento hasta el día 90 de vida.

En los grupos 1 y 2, cuando los animales cumplieron los 49 días de vida, se les realizó eutanasia por decapitación para la obtención de las muestras de sangre y suero, además de la disección del testículo y el epidídimo, regionalizado en cabeza, cuerpo y cola.

A los sujetos de los grupos 3 y 4 al cumplir los 90 días de vida, a los sujetos se les realizó eutanasia por decapitación para la obtención de las muestras de sangre y suero, además de la disección del testículo y el epidídimo, regionalizado en cabeza, cuerpo y cola. Todas las muestras fueron almacenadas a -70 °C, hasta que se les realizaron las determinaciones bioquímicas.

Cuantificación de cadmio en sangre y órganos reproductivos: testículo y epidídimo

De cada uno de los sujetos se obtuvo de 1 mL de sangre para la posterior determinación de Cd. Estas muestras fueron colectadas en tubos con EDTA-K₂. El testículo y el epidídimo fueron disectados y guardados a -20 °C. Posteriormente, a cada una de las muestras de los tejidos, se les agregaron 200 µL de ácido nítrico al 70 % y se incubaron en un baño maría a 60 °C por 10 minutos. El líquido resultante de la digestión ácida se diluyó 1:10 con agua para su posterior análisis. En cada sesión analítica, se realizaron curvas de calibración utilizando estándares comerciales de Cd. El contenido de Cd fue reportado como µg de Cd/dL de sangre y el contenido de Cd en tejidos se expresó como µg de Cd/g de tejido húmedo. La determinación de Cd en

sangre, el testículo y el epidídimo se realizaron por espectrofotometría de absorción atómica (Perkin-Elmer, Modelo AA Analyst 600; Norwalk, CT, USA) con un horno de grafito (HGA-600) y un auto-muestreador (AJS-60, Perkin Elmer).

Cuantificación de la concentración de testosterona en suero sanguíneo

La cuantificación de T en suero en el grupo control y experimental se realizó mediante la técnica de radioinmunoanálisis (RIA). Las muestras sanguíneas se colectarán en tubos con anticoagulantes y tapón separador de suero (BD Vacutainer SST, México, D.F). El suero se obtendrá mediante la centrifugación por 15 minutos a 1500 rpm. La determinación de T en suero se llevó a cabo utilizando un kit comercial (TKTT-1, Diagnostic Product Corporation, CA, Estados Unidos), que tiene un límite de detección mínimo de 4 ng / dL. El anticuerpo de T tiene una reactividad cruzada de 3.3 % a 5 α -dihidrotestosterona, 0.5 % a otros andrógenos, 0.01 % a glucocorticoides y 0.02 % a E₂. El método consiste en un RIA con I¹²⁵ marcado, diseñado para la determinación cuantitativa de esta hormona. Para ello se utilizaron tubos recubiertos con anticuerpos anti-T, en donde la hormona marcada con I¹²⁵ compete por los sitios de unión al anticuerpo con la hormona presente en la muestra. Luego de la incubación, los tubos fueron introducidos en el contador gamma (Cobra, Packard, Estados Unidos) donde la cantidad de cuentas leídas están inversamente relacionadas con la cantidad de hormona presente en la muestra, que se determinará comparando las cuentas con una curva de calibración (Martinez-Mota *et al.*, 2008).

Cuantificación del malondialdehído en tejido.

La cuantificación de MDA fue mediante la técnica de la cuantificación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. Se homogenizó el testículo y el epidídimo regionalizado en cabeza y cola en un tubo de ensayo, junto con 250 μ L de amortiguador de Tris (Tris-HCl, 150 mM, pH 7.4). Posteriormente se tomó 200 μ L de homogeneizado, adicionándole 700 μ L de Tris-HCl y se incubó a 37 °C por 30 minutos. Al término de la incubación, se agregaron 2 mL de ácido tiobarbitúrico (0.375 % p/v en

ácido tricloroacético al 15 %). Las muestras se incubaron por 45 minutos en ebullición. Posteriormente se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 3,000 rpm; al término de esto, se recuperó el sobrenadante, el cual fue leído a 532 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Perkin-Elmer Lambda 40). La concentración de MDA (se calcula a partir del coeficiente de extinción $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ en 1 cm) y fue expresada como nMoles de MDA que hay en tejido (Buegue y Austin, 1978).

Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de la SOD se basa en la reducción de citocromo C por parte del superóxido dismutasa que se deriva de la acción de la xantina oxidasa sobre la xantina (Schwartz *et al.*, 1998)

Se pesó el tejido y se homogenizó en 5 volúmenes de Buffer de carbonatos. 20 mM, pH 10.2 en tritón al 0.02 %

Para la actividad de SOD total:

Se tomó 20 μl de homogeneizado testicular y epididimario, posteriormente se agregaron 2.85 mL de sustrato (Citocromo C), para iniciar la reacción se depositó 50 μl de xantina oxidasa (xantina 100 μM / EDTA disódico 1 mM), se agitó. Se tomaron lecturas a 550 nm en espectrofotometría UV-vis cada 30 segundos durante 3 minutos.

Actividad Mn-SOD:

Se tomó 20 μl de homogeneizado testicular y epididimario, posteriormente se depositó 50 μl de KCN 1 mM con 2.85 mL de Sustratos (Citocromo C), por último, se agregó 50 μl de xantina oxidasa, se agitó y se tomaron lecturas cada 30 segundos por 3 minutos.

La actividad de la enzima se determinó por la siguiente relación:

Unidades x mg = $1000/\mu$ de proteína = μg enzima resultado de la $\frac{1}{2}$ de la máxima inhibición. La diferencia entre la actividad de SOD total y Mn-SOD es la actividad correspondiente a Cu-Zn/SOD.

Actividad de la enzima catalasa (CAT)

La actividad de la enzima catalasa se determinó basándose en la desaparición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), utilizado por la catalasa (Aebi, 1984). Se homogenizó

50 mg de tejido de testículo y epidídimo regionalizado en cabeza y cola en Buffer Tris-HCl 50 mM (pH 7.4). Se colocó en una celda del espectrofotómetro UV/UV-Vis 900 μ l de Buffer de fosfatos 50mM adicionándole 35 μ l de H₂O₂ al 0.3 M, posteriormente se agregó 15 μ L del homogeneizado; registrándose el cambio de absorbancia cada minuto después de 3 minutos, las muestras fueron leídas a una longitud de onda de 240 nm a 25 °C, la actividad fue medida por la disminución de la absorbancia. La actividad de la enzima catalasa se expresó como mU por mg de proteína por minuto (Leite *et al.*, 2018).

Actividad de glutatión peroxidasa (GPx)

La actividad de GPx fue medida empleando la técnica desarrollada por Hafman y colaboradores (1974), que consiste en evaluar la capacidad detoxificadora de la GPx reduciendo al H₂O₂ para producir H₂O y al mismo tiempo oxida al glutatión reducido (GSH).

Se homogenizó 20 mg de tejido testicular y epidídimo regionalizado en cabeza y cola en 1.2 mL de PB-EDTA a 50 mM (pH 10), 320 μ l de ácido meta-fosfórico al 25 %. Se utilizó 60 μ l del homogeneizado, 250 μ l de GSH (2 mM), 100 μ l de PB EDTA (50 mM), 100 μ L de azida de sodio y 120 μ l de agua desionizada, la mezcla se incubo a 37 °C durante 5 minutos con agitación constante. Posteriormente se añadió 0.25 μ l de H₂O₂ al 25 %. A continuación, a la mezcla se le añadió 1 mL de ácido meta-fosfórico, se agito en vórtex y se centrifugo a 14 000 rpm a 4 °C durante 20 minutos. Finalmente, se mezcló el sobrenadante con 500 μ l de DTBN (0.4 mg de DTNB en 10 mL de citrato sódico al 1 %). Después, se determinó la absorbancia a 412 nm durante 2 minutos, cada tubo se realizó por duplicado. Los resultados obtenidos se reportan como mMoles de GSH consumido/g de tejido/minuto.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los parámetros fueron expresados como la media \pm SEM. Las concentraciones séricas de T y la cuantificación de Cd en sangre y tejidos, así como la determinación de la actividad de enzimas antioxidantes se analizaron por un análisis de varianza

(ANOVA) de dos vías, seguida de una prueba de Tukey. Los valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados significativos.

XII. RESULTADOS

Cuantificación de Cd en tejido y sangre

Los resultados de la cuantificación de Cd en tejido testicular y del epididimario regionalizado en cabeza y cola de cinco sujetos por cada grupo se presentan en la figura 2. Observándose que la administración de Cd durante el periodo del día 21 al día 49 de vida, presentó una bioacumulación significativa en testículo, y en ambas regiones del epidídimo con respecto a su grupo control, refiriéndose a la interacción entre edad de los sujetos y el tratamiento (I) ($F=58.18$) $p<0.0001$). En el testículo, después de finalizar el tratamiento, en los sujetos de 49 días de vida, el Cd se incrementó significativamente en este tejido (0.7950 ± 0.0373 μg de Cd/g de tejido Vs. control 0.0123 ± 0.0039 μg de Cd/ g de tejido) que corresponde a (T=a la diferencia encontrada con el tratamiento), $F(1,16) = 262.7$, $p<0.0001$). Este se mantuvo bioacumulado hasta los 90 días de vida (0.2848 ± 0.05390 mg de Cd/g de tejido), respecto a su grupo control ($0.003027 \pm 4.876e-005$ μg de Cd/g de tejido). Sin embargo, esta bioacumulación es significativamente menor a los 90 días de vida, con respecto a los sujetos de 49 días de vida (E =que corresponde a las diferencias entre las edades) ($E, F(1,16) = 62.58$, $p<0.0001$) (figura A). En el caso de Cd en el epidídimo, se observó un efecto similar al observado en el testículo, en la región de la cabeza y de la cola, con un incremento en la bioacumulación del Cd tanto en la región de la cabeza (1.669 ± 1.087 mg de Cd/g de tejido) ($T, F(1,16) = 251$, $p<0.0001$) (figura B), como en la región de la cola (1.374 ± 0.835 mg de Cd/g de tejido) ($F(1,16) = 399.3$, $p<0.0001$) comparado con su grupo control (figura C), mismo que disminuyo en los sujetos de los 90 días de vida en ambas regiones del epidídimo (Cabeza (0.582 ± 0.095 μg de Cd/g de tejido) ($T, F(1,16) = 107.3$, $p<0.0001$; Cola (0.538 ± 0.146 μg de Cd/g de tejido) ($T, F(1,16) = 153.3$, $p<0.0001$) respecto al grupo de 49 días de vida.

De manera similar que en los tejidos analizados, el Cd en sangre total se incrementó en los sujetos de 49 días de vida ($0.237 \pm 0.00082 \mu\text{g}$ de Cd/mL de sangre), como en los sujetos de 90 días de vida ($0.0144 \pm 0.00097 \mu\text{g}$ de Cd/mL de sangre), (T, F (1,16) =14389, $p < 0.0001$), respecto a su grupo control, con una disminución significativa en la bioacumulación del Cd en los sujetos de 90 días vs 49 días de vida. (F (1,16) =12949, $p < 0.0001$) (Figura D).

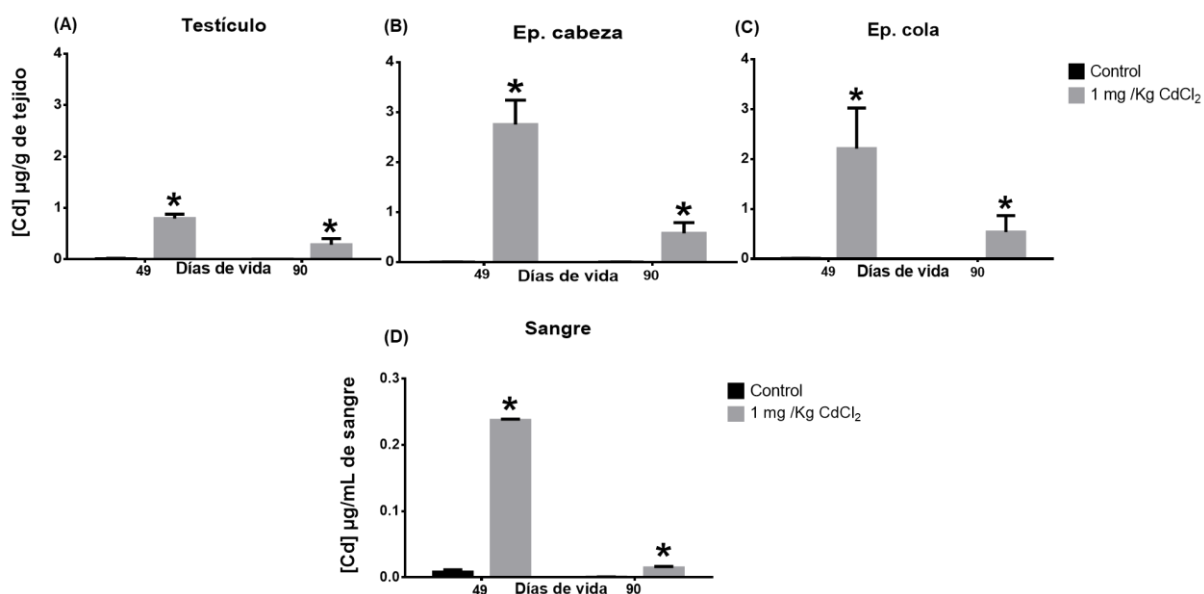


Figura 2. Se presenta la concentración de Cd en tejido de testículo y epidídimo regionalizado en cabeza y cola (A, B y C respectivamente), así como en sangre total (D). Cada valor representa ($X \pm \text{SEM}$), $n=5$ animales por grupo. ANOVA de dos vías, seguida de una prueba post hoc de Tukey. Variables analizadas: Edad (E), Tratamiento (T) e Interacción (I) entre Edad y Tratamiento. Testículo (figura A) * $p < 0.0001$ 49 vs control y de 90 Vs control; Ep. Cabeza (figura B) * $p < 0.0001$ 49 vs control y de 90 Vs control; Ep. Cola (figura C) * $p < 0.0001$ 49 vs control y de 90 Vs control; sangre (figura D) * $p < 0.0001$ 49 vs control y de 90 Vs control.

Concentración de testosterona en suero sanguíneo

Los resultados de la cuantificación de T en suero de cinco sujetos por cada grupo se presentan en la figura 3. Observándose que la administración de Cd durante el periodo del día 21 al día 49 postnatal, provocó una disminución en la concentración de esta hormona respecto a su grupo control ($0.4474 \pm 0.05292 \text{ ng/mL}$ de T Vs su control $1.265 \pm 0.4173 \text{ ng/mL}$ de T), resultado del tratamiento de los sujetos (T) (F (1,28) =6.666, $p=0.0153$). Con respecto a los resultados en el grupo de 90 días de edad, se observa

una disminución significativa de T en el grupo con tratamiento de Cd contra su grupo control (2.230 ± 0.5459 ng/mL de T Vs su control 3.708 ± 0.5619 ng/mL de T), se observa una diferencia significativa entre las edades de los tratamientos ($F(1,28) = 2.58, p < 0.0001$).

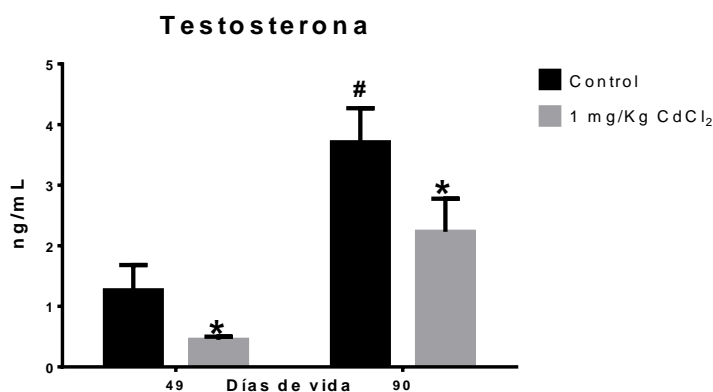


Figura 3. Se presenta la concentración de T en suero. Cada valor representa (media \pm SEM), $n=5$ animales por grupo. ANOVA de dos vías, seguida de un prueba post hoc de Tukey. Variables analizadas: Edad (E), Tratamiento (T) e Interacción (I) entre Edad y Tratamiento. (3) * $p=0.0153$ 49 días Vs control y de 90 días vs control; # $p < 0.0001$ 90 Vs 49 días de edad.

Cuantificación de malondialdehído (MDA) en tejido

En la figura 4 se muestra el efecto del tratamiento con Cd sobre la determinación de MDA en tejido testicular y del epidídimo regionalizado en cabeza y cola, de siete sujetos por grupo, (A, B y C), que fueron administrados del día 21 al 49 de vida. El tratamiento con Cd en los sujetos de 49 días de vida se observa un aumento en la concentración de MDA en el testículo respecto a su grupo control, (236.0 ± 23.97 MDA mg/proteína de tejido Vs control 145.5 ± 19.92), que corresponde a (T=a la diferencia encontrada con el tratamiento) ($F(1,24) = 29.84, p < 0.0001$). En el grupo evaluado a los 90 días de edad se observa esta tendencia de aumento de MDA testicular por el efecto del Cd contra su control en la figura A.

Respecto al epidídimo regionalizado en cabeza y cola en el grupo de 49 días de edad al terminar la exposición se muestra un aumento de MDA en ambas regiones, (223.0 ± 45.41 MDA mg/ proteína de tejido Vs control 292.1 ± 44.65 , región cabeza; $253.7 \pm$

43.13 MDA mg/proteína de tejido Vs control 111.3 ± 20.79 región cola), con respecto a su grupo control (T) ($F(1,24) = 0.3753$, $p = 0.5459$), (figura B). Respecto al grupo evaluado a los 90 días de edad se muestra el aumento significativo de MDA sólo en la región de la cola del epidídimo, (140.7 ± 10.52 MDA mg/ proteína de tejido Vs control 103.3 ± 6.638 MDA mg/ proteína de tejido) derivado del tratamiento de Cd, (figura C). Se muestra una diferencia en la determinación de MDA entre los 49 y 90 días de vida ($F(1,28) = 14.67$, $p = 0.0008$), que corresponde a las diferencias entre edad (E).

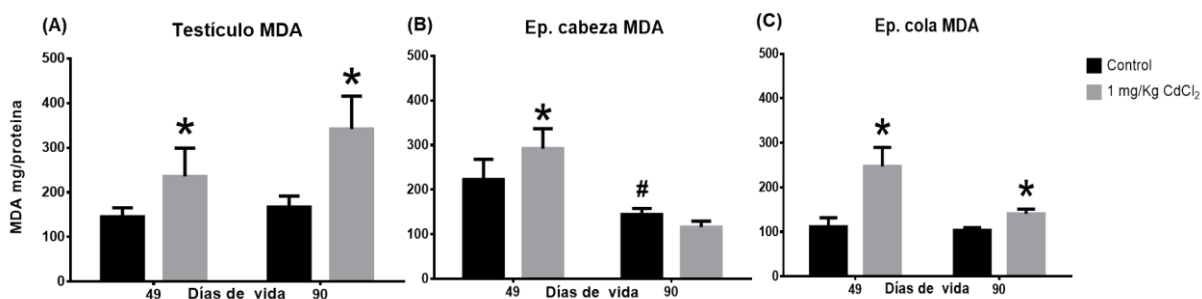


Figura 4. Se presenta el efecto del cadmio en la determinación de MDA en tejido testicular y epidídimo regionalizado en cabeza y cola (A, B y C respectivamente). Cada valor representa (media \pm SEM), $n=7$ animales por grupo. ANOVA de dos vías, seguida de una prueba post-hoc Tukey. Variables analizadas: Edad (E), Tratamiento (T) e Interacción (I) entre Edad y Tratamiento. Testículo (figura A) $*p < 0.0001$ 49 días Vs control y de 90 días vs control; $\#p = 0.0147$ 90 vs 49 días de edad; Ep. Cabeza (figura B) $*p = 0.5459$ 49 vs control; $\#p = 0.0008$ al comparar 90 vs 49 días de edad; Ep. Cola (figura C) $*p = 0.0017$ 49 Vs control y 90 Vs control.

Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD)

En cuanto a la actividad de la enzima de SOD se evaluó la actividad total, Mn-SOD y Cu/Zn-SOD, en testículo y epidídimo regionalizado en cabeza y cola, de cinco sujetos por grupo, (A, B y C respectivamente), se presentan en la figura 5, fueron administrados del día 21 al 49 de vida con 1 mg/Kg de CdCl₂. En el grupo de 49 días de vida, después de finalizar el tratamiento, en el testículo se observa una disminución significativa en la actividad de la enzima de SOD-total con respecto a su grupo control (0.2921 ± 0.0878 U SOD mg de proteína Vs control 1.478 ± 0.0312 U SOD mg de proteína), que corresponde al tratamiento (T) ($F(1,16) = 54.29$ $p < 0.0001$), el grupo de 90 días no se observa ninguna diferencia significativa con respecto a su grupo; sin embargo, se observa una diferencia significativa respecto a los sujetos de 49 días de

edad, refiriéndose a la edad (E) ($F(1,16) = 142.3$ $p < 0.0001$). Se muestra una significativa diferencia entre la edad de los sujetos y el tratamiento, refiriéndose como interacción (I) ($F(1,16) = 61.86$, $p < 0.0001$) en la figura 5. Sobre la actividad de la isoforma Cu/Zn-SOD en testículo, se muestra una disminución en la actividad enzimática en el grupo de 49 días al término del tratamiento con respecto a su grupo control (0.3373 ± 0.1242 U SOD mg por proteína Vs control 0.6782 ± 0.0602 U SOD mg por proteína), donde (T) ($F(1,16) = 2.522$ $p = 0.1318$), se observa en la figura B. No se muestra ninguna diferencia significativa en la actividad de la isoforma Mn-SOD en el testículo en la figura C.

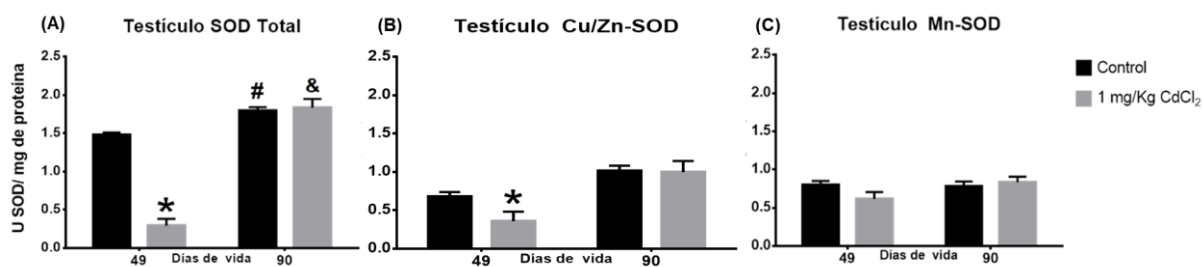


Figura 5. Se presenta el efecto del Cd sobre la actividad de SOD total, la isoforma Cu/Zn-SOD y la isoforma Mn-SOD en tejido de testículo (A, B y C respectivamente). Cada valor representa (media \pm SEM), $n=5$ animales por grupo. ANOVA de dos vías, seguida de prueba post-hoc Tukey. Variables analizadas Edad (E), Tratamiento (T) e Interacción (I) entre Edad y Tratamiento. Testículo SOD Total (figura A) * $p < 0.0001$ 49 vs control; # $p < 0.0001$, 90 vs 49 días de edad; & $p < 0.0001$ interacción entre edad y tx; testículo Cu/Zn-SOD (figura B) * $p < 0.0001$ 49 vs control; # $p < 0.0001$, 90 vs 49 días de edad; testículo Mn-SOD (figura C) no hubo diferencias significativas entre los grupos

En la región de la cabeza del epidídimo figura 6 ($n= 5$), en la figura A, podemos observar la actividad de la enzima SOD Total se observa un aumento significativo respecto a su grupo control en los sujetos de 90 días de vida, (1.098 ± 0.1154 U SOD mg de proteína Vs su control 0.5572 ± 0.1570 U SOD mg de proteína) que fueron expuestos en la etapa de pubertad, refiriéndose como (T $F(1,16) = 4.958$ $p = 0.0407$), se observa una diferencia significativa respecto a los sujetos de 49 días de edad, representándose entre la edades de los sujetos (E) ($F(1,16) = 14.36$ $p = 0.0016$). En la isoforma Cu/Zn-SOD se muestra una diferencia significativa en la actividad de esta enzima entre las edades de los grupos de 90 y 49 días de edad, donde se refiere (E) $F(1,16) = 33.20$, $p < 0.001$), en la figura B; referente a la isoforma Mn-SOD no se

muestra ninguna diferencia significativa en la región de la cabeza del epidídimo, figura C.

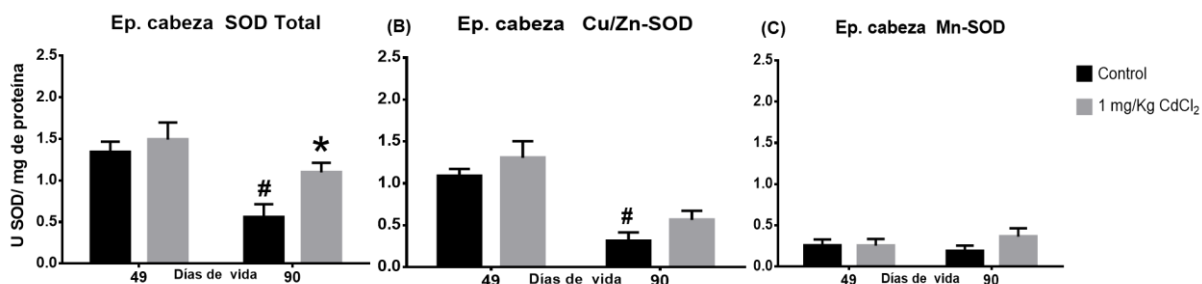


Figura 6. Se presenta el efecto del Cd en la actividad de SOD total, la isoforma Cu/Zn-SOD y la isoforma Mn-SOD en la región de la cabeza del epidídimo (A, B y C respectivamente). Cada valor representa ($X \pm SEM$), $n=5$ animales por grupo. ANOVA de dos vías, seguida de prueba post-hoc de Tukey. Variables analizadas Edad (E), Tratamiento (T) e Interacción (I) entre Edad y Tratamiento. Ep. Cabeza SOD Total (figura A) * $p = 0.0407$ 90 vs control; # $p = 0.0016$. 90 vs 40 días de edad; Ep. Cabeza Cu/Zn-SOD (figura B) * $p = 0.0407$ 90 vs control; # $p = 0.0003$. 90 vs 40 días de edad; Ep. Cabeza Mn-SOD (figura C) no hubo diferencias significativas entre los grupos

La región de la cola del epidídimo figura 7 ($n=5$), se muestra una disminución significativa en la actividad de SOD Total en el grupo de 90 días con respecto a su grupo control (0.3167 ± 0.1094 U SOD mg de proteína Vs grupo control 0.7122 ± 0.1770 U SOD mg de proteína), refiriéndose a T ($F(1,16) = 1.121$, $p=0.3055$), se observa una diferencia en la actividad entre las edades de los sujetos de 90 y 49 días de edad, describiéndose en (E) ($F(1,16) = 29.29$, $p<0.0001$); permanece alterada la actividad en la isoforma de Cu/Zn-SOD debido al efecto del Cd sobre ella en el grupo de 90 días respecto a su grupo control (0.2344 ± 0.2132 U SOD mg de proteína Vs su control 0.4724 ± 0.1821 U SOD mg de proteína), mostrándose en T ($F(1,16) = 0.1926$, $p=0.6667$); observándose una alteración de la actividad de la enzima debido a la edad de los sujetos, ($F(1,16) = 10.71$, $p= 0.0048$) entre el grupo de 90 y 49 días en la figura B. Respecto a la actividad de la isoforma Mn-SOD no muestra diferencia significativa en la figura C.

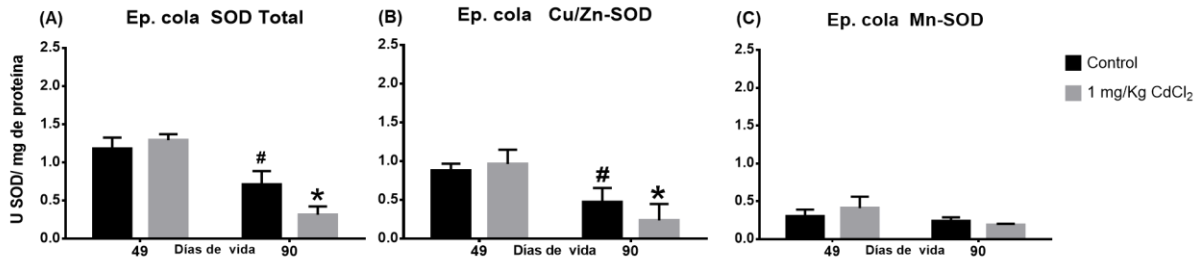


Figura 7. Se presenta el efecto del Cd en la actividad de SOD total, la isoforma Cu/Zn-SOD y la isoforma Mn-SOD en la región de la cola del epidídimo (A, B y C respectivamente). Cada valor representa ($X \pm SEM$), $n=5$ animales por grupo. ANOVA de dos vías, seguida de prueba post-hoc de Tukey. Diferencia significativa con el grupo control ($p < 0.05$). Variables analizadas Edad (E), Tratamiento (T) e Interacción (I) entre Edad y Tratamiento. Ep. cola SOD Total (figura A) * $p = 0.0407$ 90 vs control; # $p = 0.0016$. 90 vs 40 días de edad; Ep. Cola Cu/Zn-SOD (figura B) * $p = 0.0407$ 90 vs control; # $p = 0.0003$. 90 vs 40 días de edad; Ep. Cola Mn-SOD (figura C) no hubo diferencias significativas entre los grupos

Actividad de la enzima Catalasa (CAT)

En la figura 8 se muestra el efecto de Cd sobre la actividad de la enzima CAT en tejido testicular y del epidídimo regionalizado en cabeza y cola de cinco sujetos (A, B y C), que fueron administrados del día 21 al 49 de edad. El tratamiento con Cd en los sujetos de 49 días no se observa modificada la actividad de CAT en el testículo, sin embargo, la enzima CAT se altera en los sujetos que fueron expuestos con Cd y posteriormente se les quitó el tratamiento y fueron evaluados hasta el día 90 de vida. Se puede observar en el Testículo que hay una alteración en la actividad de la enzima que permanece a los 90 días de vida (0.4220 ± 0.0709 U/mg de proteína Vs su control 0.4767 ± 0.1062 U/mg de proteína), refiriéndose al tratamiento (T) ($F(1,16) = 7.777$, $p = 0.0131$) en los sujetos que fueron expuestos con este metal, al igual se percibe una alteración de la actividad de la enzima catalasa debido a la edad de los sujetos ($F(1,16) = 3.397$, $p = 0.0839$). Respecto a la actividad de esta enzima en el epidídimo regionalizado en cabeza y cola se muestra en ambos grupos, en cabeza (0.4959 ± 0.1000 U/mg de proteína Vs su control 0.8046 ± 0.1071 U/mg de proteína), relacionándose al tratamiento (T) ($F = 84.05$, $p < 0.0001$) y región de la cola (0.4767 ± 0.1210 U/mg de proteína Vs su control 0.8755 ± 0.1743 U/mg de proteína), relacionándose al tratamiento (T) ($F(1,16) = 43.19$, $p < 0.0001$) una disminución en la actividad de la enzima con respecto a su grupo control en la figura B y C. La actividad

de la enzima se reduce por la edad de los sujetos tanto en la región de la cabeza (F (1,16)=19.67, p=0.0004) y en la región de la cola (F (1,16) =11.85, p=0.0033)

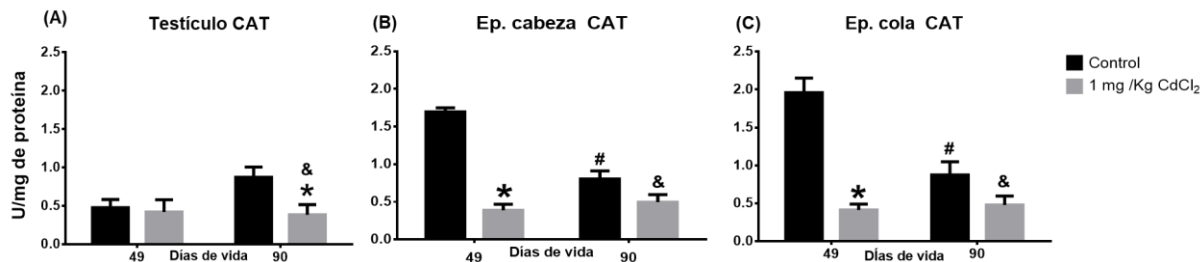


Figura 8. Se presenta el efecto del cadmio en la actividad de la enzima CAT en tejido testicular y del epidídimo regionalizado en cabeza y cola (A y B respectivamente). Cada valor representa (media \pm SEM), n=5 animales por grupo. ANOVA de dos vías, seguida de una prueba post-hoc Tukey). Variables analizadas Edad (E), Tratamiento (T) e Interacción (I) entre Edad y Tratamiento. Testículo (figura A) *p = 0.0131 90 días Vs 90 control; #p = 0.0407 90 Vs 49 días de edad; Ep. Cabeza (figura B) *p < 0.0001 49 Vs control; #p = 0.0004 al comparar 90 Vs 49 días de edad; &p < 0.0001 en la interacción de edad y tratamiento; Ep. Cola (figura C) *p < 0.0001 49 Vs control; #p = 0.0033 al comparar 90 Vs 49 días de edad; &p = 0.0013 en la interacción edad y tratamiento.

Actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx)

En la figura 9 se muestra el efecto del Cd en la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) en el tejido testicular y del epidídimo regionalizado en cabeza y cola de cinco sujetos (A, B y C respectivamente) que fueron expuestos del día 21 al 49 de vida. En el testículo el Cd indujo una disminución en la actividad enzimática respecto a su grupo control en los sujetos de 49 días de vida (128.1 ± 30.66 mmol/g de tejido húmedo Vs su control 443.3 ± 68.37 mmol/g de tejido húmedo), refiriéndose al tratamiento (T) (F (1,16) =8.052, p=0.0119), la alteración de la actividad de esta enzima también se puede observar en ambas edades de los sujetos de 49 y 90 días (F (1,16) =3.725, p=0.0715). Con respecto a la actividad de la enzima en el epidídimo en ambas regiones, la actividad de la enzima se encontró aumentada en los sujetos expuestos a Cd y evaluados a los 90 días de vida en la región de la cabeza (647.0 ± 48.40 mmol/g de tejido húmedo Vs su control 127.7 ± 489.57 mmol/g de tejido húmedo), se relaciona con (T) (F (1,16)=0.510, p=0.4866) en la figura B; en la región de la cola permanece el aumento de la actividad de esta enzima en el grupo de 90 días, respecto a su grupo control (363.7 ± 29.16 mmol/g de tejido húmedo Vs su control 235.0 ± 22.90 mmol/g

de tejido húmedo), refiriendo al tratamiento (T) ($F(1,16)=16.62, p=0.0009$), se muestra en la figura C.

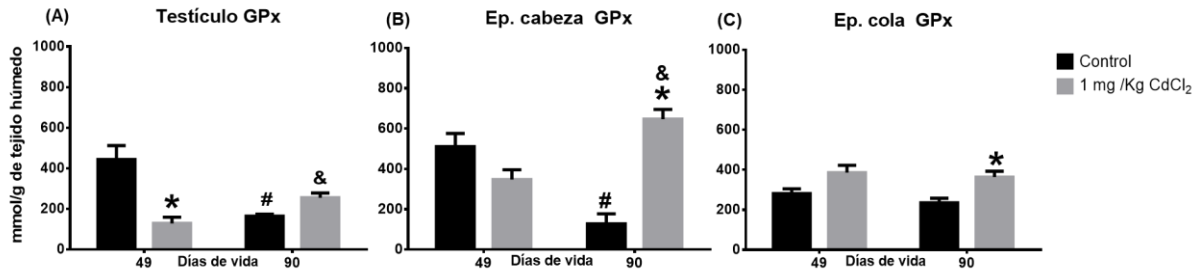


Figura 9. Se presenta el efecto del cadmio en la actividad de la enzima GPx en tejido testicular y epididimal regionalizado en cabeza y cola (A, B y C respectivamente). Cada valor representa (media±SEM), n=5 animales por grupo. ANOVA de dos vías, seguida de una prueba post-hoc Tukey. Variables analizadas Edad (E), Tratamiento (T) e Interacción (I) entre Edad y Tratamiento. Testículo (figura A) * $p = 0.0119$ 49 días Vs control; # $p = 0.0715$ 90 Vs 49 días de vida; & $p = 0.0001$ interacción entre edad y tratamiento; Ep. Cabeza (figura B) * $p = 0.0117$ 90 días Vs control; # $p = 0.0715$ 90 vs 49 días de vida; & $p < 0.0001$ interacción entre edad y tratamiento; Ep. Cola (figura C) * $p = 0.0009$ 90 días Vs control.

Relación GSH/GSSG

En la figura 10 se observa el efecto del Cd sobre la relación del glutatión (GSH/GSSG), en testículo y del epidídimo regionalizado en cabeza y cola de cinco sujetos (A, B y C). El análisis estadístico muestra que el tratamiento con Cd modifica la relación de GSH/GSSG tanto en los sujetos de 49 como de 90 días de edad comparados contra sus grupos control ($F(1,16) = 5.057, p = 0.0390$). Al analizar el efecto de la edad, se observa un aumento de la relación GSH/GSSG testicular en los sujetos de 90 días de edad con respecto a los sujetos de 49 días ($F(1,16) = 39.52, p < 0.0001$). En el caso del epidídimo región de la cabeza, en los sujetos de 49 días de vida que fueron administrados con Cd se percibe una disminución en la relación (GSH/GSSG) ($0.7745 \pm 0.0870 \mu/\text{mg}$ de tejido Vs su control $1.610 \pm 0.0710 \mu/\text{mg}$ de tejido), (T, $F(1,16) = 6.160, p = 0.0254$), por el efecto del tratamiento. Al analizar el factor edad, se presenta una disminución en la relación a los 90 días independientemente del tratamiento ($F(1,16) = 53.78, p < 0.0001$). En la región de la cola se presenta un aumento en la relación de GSH/GSSG en los sujetos de 49 días al finalizar el tratamiento con Cd ($1.265 \pm$

0.1057 μ /mg de tejido Vs su control 0.6699 \pm 0.1615 μ /mg de tejido), refiriéndose al tratamiento (T), (F (1,16) =8.525, p=0.0100) figura (B) y (C).

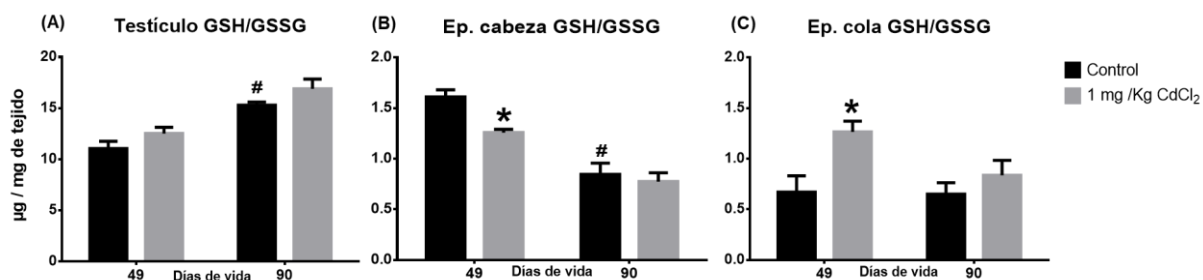


Figura 10. Se presenta el efecto del cadmio sobre la relación de glutatión GSH/GSSG en tejido testicular y epidídimo regionalizado en cabeza y cola (A, B y C respectivamente). Cada valor representa (media \pm SEM), n=5 animales por grupo. ANOVA de dos vías, seguido de Tukey. Variables analizadas Edad (E), Tratamiento (T) e Interacción (I) entre Edad y Tratamiento. Relación de GSH/GSSG a los 49 y 90 días de edad, después del tratamiento con CdCl₂ por 28 días, iniciando el día 21 de edad. Testículo (figura A) [#]p < 0.0001 90 Vs 49 días de edad; Ep. Cabeza (figura B) ^{*}p < 0.0001 49 Vs control; [#]p = 0.0254 90 vs 49 de edad; [&]p = 0.1203 en la interacción de edad y tratamiento; Ep. Cola (figura C) ^{*}p = 0.0100, 49 Vs control.

XIII. DISCUSIÓN

El cadmio (Cd) es un metal pesado, conocido como uno de los mayores contaminantes ambientales, se considera potencialmente peligroso para la salud (Thompson y Bannigan, 2008), pues afecta órganos vitales como el hígado y el riñón, entre otros (Waalkes, 2003, Thompson y Bannigan, 2008). Diversos reportes indican que el Cd afecta los procesos reproductivos independiente de la etapa de administración (Lafuente *et al.*, 2001), abarcando desde la etapa gestacional o prenatal y etapas postnatales como la pubertad o la etapa adulta. Sin embargo, no hay estudios que utilicen modelos animales como la rata y contemple la exposición durante la pubertad y se analice su efecto tanto al final de la administración y se mantenga el seguimiento hasta la edad adulta. El presente estudio abarcó ambas etapas con una administración de 28 días de Cd en una dosis de 1 mg/Kg, iniciando el tratamiento en el día 21 del destete y finalizó en el día 49, observándose una mayor concentración de Cd en testículo y en ambas regiones del epidídimo, disminución de T en comparación con los grupos controles, así como un aumento de malondialdehído (MDA) en testículo y epidídimo, también induce alteraciones en la actividad de SOD, CAT y GPx que

incide en la relación GSH/GSSG al finalizar la administración de Cd, en esta edad y aun después del 41 días de finalizado el tratamiento, en el día 90, indicando que el Cd afecta el proceso de pubertad, efecto que prevalece en la edad adulta. Nuestros resultados, muestran que el Cd administrado en edades tempranas repercute en la fertilidad masculina durante la edad adulta a través de la inducción de estrés oxidante. La pubertad masculina en la rata se inicia con la activación del HHT a partir del día 35 y se prolonga al día 49 de vida (Ji *et al.*, 2010; Ojeda y Skinner, 2015). Durante esta etapa, se inicia la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), misma que actúa en la hipófisis induciendo la liberando LH y FSH, estas a su vez ejercen su acción sobre el testículo produciendo la secreción de T, por parte de las células de Leydig (Ji *et al.*, 2010). Durante la pubertad, la T es necesaria para el correcto desarrollo y funcionamiento del testículo, así como del epidídimo, ya que su desarrollo celular finaliza alrededor del día 49 de vida (Robaire y Hinton, 2015). En la rata los índices que marcan el inicio de la pubertad son el descenso testicular, que ocurre en el día 15 de vida, así como la separación prepucial (Ojeda y Skinner, 2006), que ocurre entre el día 40 y 50 de vida, que es un marcador del proceso de la pubertad (Korenbrod *et al.*, 1977; Stoker *et al.*, 2000); y es en el día 45 de vida cuando se observan los primeros espermatozoides en el lumen de los túbulos seminíferos (Clermont y Perey, 1957; Stoker *et al.*, 2000). Se ha reportado en humanos adolescentes expuestos al Cd que viven en una zona industrial, se presenta una disminución en el volumen testicular y un inicio tardío de la pubertad (puntuación de Tanner), así como una disminución en la concentración de la T (Interdonato *et al.*, 2015), similar a lo observado en ratas púberes de 49 días de edad. Durante la pubertad de las ratas las concentraciones de T se incrementan gradualmente, a los 14-28 días se reportan valores de hasta 1.0 ng/mL de T, hormona que al día 42 de edad se incrementa hasta 1.5 ng/mL en promedio, mientras que en la edad de 70 y 90 días aumenta a 2.0 y 4.5 ng/mL (Arteaga-Silva *et al.*, 2013). Particularmente, las ratas tratadas con Cd mostraron bajas concentraciones de T a los 49 días (Control 0.8547 ± 0.06530 Vs Cd 0.4547 ± 0.04773 ng/mL) y a los 90 días esta disminución se mantuvo (control 3.077 ± 0.3239 Vs Cd 1.672 ± 0.2023 ng/mL), en ambos casos la

concentración disminuye proporcionalmente con respecto a su control, un efecto tóxico del Cd sobre las concentraciones de T que se sostiene en la edad adulta.

La administración de Cd realizada durante la etapa puberal no solo altera esa misma etapa, sino posterior a la exposición, en la edad adulta, la actividad del eje se afecta. Un indicativo de esto es la disminución de T en las ratas de 90 días de vida. El eje HHG madura durante la pubertad, en el caso de la rata macho de la cepa Wistar, se evidencia por un incremento paulatino en las concentraciones de T plasmática desde el día 35 de vida, alcanzando sus niveles máximos en el día 70 de vida (Arteaga-Silva *et al.*, 2013). En este contexto, se ha sugerido que la T en este periodo tiene un papel importante que facilita cambios morfológicos y conductuales asociados con la maduración sexual (por ejemplo, la maduración de las gónadas, el desarrollo de espinas peneanas, separación prepucial, ocurrencia de erecciones peneanas espontáneas, auto-acicalamiento genital, etc.), lo que se refleja en una adecuada ejecución sexual en la etapa adulta (Hernández-González, 2000; Arteaga-Silva *et al.*, 2013). El Cd parece alterar la maduración sexual al afectar las concentraciones de T durante esta etapa y la edad adulta presentando alteraciones en los parámetros conductas dependientes de andrógenos como es la calidad espermática, la conducta sexual, parámetros de maduración sexual durante la pubertad (Hernández-González, *et al.*, 2015), alteraciones en el tamaño testicular (Sayegh, *et al.*, 1990), y como se ha mencionado, la concentración disminuida de T plasmática (Amstislavskaya *et al.*, 2013).

El Cd afecta la actividad del eje HHT como un disruptor endocrino y/o directamente a nivel del testículo. Se ha descrito que el Cd como disruptor endocrino (Zeng *et al.*, 2004; Mendiola *et al.*, 2011; Lafuente *et al.*, 2013; Interdonato *et al.*, 2015), imita a los estrógenos (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009; Ali *et al.*, 2010; Lafuente *et al.*, 2013), por lo que interrumpe los mecanismos reguladores del HHT, además de alterar los neurotransmisores involucrados en la regulación del eje a nivel hipotalámico, modificando la secreción de gonadotropinas, afectando la estructura y actividad testicular (Lafuente *et al.*, 2003; Lafuente *et al.*, 2013).

A nivel del testículo, el Cd al bioacumularse en las células de Sertoli inhibe la síntesis y liberación de inhibina B (Lafuente *et al.*, 2001), por lo que interrumpe el mecanismo

regulador bidireccional del eje HHT, induciendo un aumento en la liberación de la hormona FSH y LH en plasma (Lafuente *et al.*, 2001). A nivel de las células de Leydig, algunos estudios reportan que el Cd causa disminución en la población de estas células (Chen *et al.*, 2016; Nna *et al.*, 2017) y en consecuencia disminuye la síntesis de T. Estudios indican que las células de Leydig proliferan durante la etapa puberal. Se ha descrito cuatro etapas de diferenciación de células de Leydig en rata: 1) células de Leydig madre, 2) células de Leydig progenitoras, 3) células de Leydig inmaduras y 4) células de Leydig adultas (Chen *et al.*, 2009). El inicio de la diferenciación de células Leydig madre a células Leydig progenitoras es a partir del día 21 de vida, ya que del día 28 al 56 de vida se termina por diferenciar a células de Leydig adultas (Guo *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2017); observándose que en animales de 90 días la producción de T es 150 veces mayor que en un animal de 21 días de vida con células de Leydig productoras y cinco veces mayor que las células de Leydig inmaduras a los 35 días de vida (Shan *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 2017). El Cd disminuye la población de células de Leydig, así como daña su morfología y funciones (Chung y Cheng, 2001; Wu *et al.*, 2017; Nna *et al.*, 2017) y puede dañar de manera permanente la regeneración de células de Leydig cuando se administra durante la edad adulta (Wu *et al.*, 2017). En este estudio la administración de Cd se realizó durante 21-49 de vida, etapa en que las células de Leydig terminan de diferenciarse. Así, es probable que en presente esquema de administración, el Cd no sólo afectará a las células de Leydig, adultas sino también pudo interferir con las células de Leydig en proceso de diferenciación durante la etapa puberal (Wu *et al.*, 2017). Sin embargo, al día 49 de vida que termina el tratamiento con Cd, las células siguen en proceso de diferenciación y proliferación, las cuales podrían mantener las bajas concentraciones de T obtenidas en la edad adulta.

Por otro lado, diversos estudios con Cd han descrito que el metal se bioacumula en sangre y diversos órganos, siendo uno de ellos el testículo (Nordberg, 2009; ATSDR, 2012; De Angelis *et al.*, 2017), coincidiendo con nuestros resultados donde se observa que la administración de Cd aumentó al finalizar la exposición (día 49 de vida) y posterior de cese (hasta el día 90 de vida, cuando se volvió a evaluar) en sangre, testículo y epidídimo. Sin embargo, este aumento es significativamente menor en los

sujetos que fueron administrados con este mismo esquema, pero que se les retiró al día 49 de vida el Cd y se mantuvieron 41 días sin exposición alguna a este tóxico, se observó una bioacumulación de este metal, pero significativamente menor respecto al grupo de 49 días de vida, confirmándose que una fracción pequeña pero significativa de este metal permanece bioacumulado, a pesar de que el sujeto deje estar expuesto. En estudios en humanos se ha reportado una vida media biológica del Cd estimada de 10 a 40 años (ATSDR., 2012, De Angelis *et al.*, 2017). Un mecanismo responsable de la bioacumulación de este metal consiste en que su entrada a las células es a través de canales de Ca^{2+} , y en la célula el Cd reemplaza otros metales con cationes divalentes homólogos como son Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} y Fe, interfiriendo con el sistema Redox (Waisberg *et al.*, 2003; el-Demerdash *et al.*, 2004; Ognjanovic *et al.*, 2010).

Después de la absorción del metal al organismo, el Cd se transporta al hígado unido a la albumina en el hígado, induciendo la síntesis de proteínas de unión a metales llamadas metalotioneínas (MT), posteriormente el Cd unido a la MT se libera del hígado para ingresar al plasma (Nordberg *et al.*, 1992; Thompson y Bannigan, 2008), por lo que esto constituye un mecanismo de distribución en el organismo y se encuentra una concentración alta al finalizar la administración y al día 90. Sin embargo, en el caso de los animales de 90 días, se observó que el Cd se mantiene bioacumulado, pero en menor concentración, lo que indica que hubo eliminación de este metal durante el intervalo de tiempo entre el día 49 y 90 de vida. El porcentaje que se excreta de este metal por orina o heces es muy bajo (IARC, 2012; de Angelis *et al.*, 2017). La cantidad de excreción de Cd por orina depende del tiempo de exposición (Zalups, 1997; Zalups y Ahmad, 2003). Se ha descrito que la excreción del Cd por heces se deriva de la secreción hepatocelular de conjugados del Cd-GSH en el sistema biliar (Zalups y Ahmad, 2003). Un mecanismo de salida de Cd es a través del Zn^{2+} , un metal esencial que puede aumentar el flujo de salida del organismo al Cd (Amara *et al.*, 2008), a través de la orina (Interdonato, 2015).

Diversos reportes indican que el Cd induce estrés oxidante en diferentes tejidos (Ognjanović *et al.*, 2010; de Angelis *et al.*, 2017). Una medida directa de evaluar el daño inducido del Cd a nivel de la membrana celular es a través del MDA, producto final de la LPO, que en este caso es una de la consecuencia temprana ante la

exposición de Cd (Shohda *et al.*, 2001; Ognjanović *et al.*, 2010). Nna *et al.* (2017) indica que la administración aguda de Cd produjo un incremento en la concentración de MDA, induciendo lipoperoxidación en animales adulto y en la etapa puberal, al producir radicales libres tales como radicales hidroxilo (OH·), que producen, a su vez oxidación a los ácidos grasos poli-insaturados (Stohs *et al.*, 1995; Ognjanović *et al.*, 2010; Lacorte *et al.*, 2013). En nuestros resultados se observó que en ambos grupos de 49 y 90 días de vida hay un aumento significativo de MDA en el testículo y en ambas regiones del epidídimo, dañando esto tejidos al inducir estrés oxidante independiente de la edad de evaluación, excepto en la cabeza del epidídimo en el grupo de 90 días de vida, la región del epidídimo con alta eficiencia en el sistema antioxidante reaccionó contrarrestando el daño del Cd en este segmento del epidídimo.

Se ha desmostado que en animales en etapa puberal que han sido expuestos a cadmio se puede inducir la producción de ERO, como el radical ion superóxido (O₂⁻), radicales hidroxilo (OH·) y peróxido de hidrogeno (H₂O₂) (Saïd *et al.*, 2010). Cuando hay una exposición aguda de este metal se ha descrito una disminución en la actividad de enzimas antioxidante (SOD, CAT y GPx), provocando un incremento en valores de malondialdehído (Ognjanović *et al.*, 2010; Saïd *et al.*, 2010).

Con respecto a nuestros resultados relacionados con la actividad de SOD total, en animales que fueron expuestos al Cd del día 21 al día 49 de vida, se encontró una menor actividad enzimática en testículo, en comparación con el grupo control. Estudios realizados con animales en edad puberal concuerdan con nuestros resultados, observándose una disminución de la actividad por efecto de la exposición a Cd (Elmallaha *et al.*, 2017). Consideramos que el Cd bioacumulado durante la etapa puberal puede dañar la actividad enzimática de SOD reduciendo su actividad como resultado de la destitución por elementos minerales divalentes como el Zn²⁺, Cu²⁺, aunque en nuestro caso particular, la actividad de Mn-SOD no se modificó.

Estudios realizados con animales en etapa adulta que han sido expuestos a Cd con dosis de 1 a 5 mg/kg vía por i.p. a diferentes tiempos de exposición, han reportado una disminución en la actividad de SOD total y en particular la isoforma Cu/Zn-SOD tanto en testículo como en el epidídimo. De acuerdo a estos reportes, el efecto de Cd sobre estos órganos, esta mediado principalmente por el desplazamiento de elementos

esenciales como el Zn^{2+} y Cu^{2+} ubicados en la enzima antioxidante, además de aumentar la concentración de Cu libre en la célula que a su vez induce la producción de ERO a través de las reacciones de Haber-Weiss y Fenton, en las cuales participa dicho ion (Miglianiri *et al.*, 2005; Pillai y Gupta, 2005; Lacorte *et al.*, 2013; de Angelis *et al.*, 2017; Nna *et al.*, 2017). Un efecto opuesto se observó en los animales adultos que fueron expuestos al Cd durante los 21 a 49 días de vida, mostrando un aumento en la actividad de SOD total y en Cu/Zn-SOD, sólo en el epidídimo tanto en cabeza y cola. Durante esta etapa el epidídimo ha madurado llevando a cabo el proceso de empermiogénesis, con un sistema antioxidante para contrarrestar la formación de radicales libres que se forman en este proceso, por lo que podemos asumir un aumento en la actividad enzimática que contrarresta la toxicidad del Cd que parece mantenerse hasta la edad adulta.

Se ha descrito que la función de la enzima CAT es catalizar el H_2O_2 y degradarlo en oxígeno y agua (Zini y Schlegel; 1996; Vaisberg *et al.*, 2005; Aitken *et al.*, 2008), dicha enzima es inhibida por el Cd provocando la acumulación del H_2O_2 induciendo estrés oxidante (Valko *et al.*, 2005). Varios estudios experimentales empleando diferentes concentraciones de Cd han demostrado que el metal inhibe la actividad de esta enzima ocasionando una alteración en su mecanismo regulador contra ERO (Stohs y Bagchi, 1995, Ognjanović *et al.*, 2010; Lacorte *et al.*, 2013; de Angelis *et al.*, 2017) por el desplazamiento de metales endógenos (Lacorte *et al.*, 2013), sin alterar la expresión de ARNm en epidídimo ni en testículo (Zalups y Ahmad, 2003; Lacorte *et al.*, 2013). En nuestro caso, se observó una respuesta diferencial de la enzima con respecto a los días y considerando en tejido analizado, la actividad de CAT en el epidídimo disminuyó en los animales de 49 días de vida, a diferencia de los animales de 90 días de vida, que se observó una reducción en el testículo. Durante la etapa de maduración del epidídimo (35-59 días de vida) el epidídimo parece ser sensible al estrés oxidante, a diferencia de la edad adulta. Debido a que la CAT es de limitada importancia en el testículo (Vaisberg *et al.*, 2005; Aitken y Roman, 2008), dado que se ha descrito que en ratas adulta de forma fisiológica la expresión de CAT es baja en el testículo y epidídimo para neutralizar las ERO producidos por los espermatozoides (Zini y

Schlegel, 1996; Kozirowska-Gilun *et al.*, 2012; Lacorte *et al.*, 2013), este sistema antioxidante no es capaz de contrarrestar el efecto del Cd.

Se ha reportado que el Cd puede interferir en el metabolismo de selenio (Se), mineral que forma parte de la enzima glutatión peroxidasa, al reducir las concentraciones en suero y testículo afectando así la actividad de GPx (Obarikwu *et al.*, 2013; de Angelis *et al.*, 2017). A este respecto, estudios en animales en los cuales se inició el tratamiento con Cd (15 ppm) en la etapa puberal por 20 semanas, la actividad de GPx disminuyó en epidídimo cuando el animal era adulto (Lacorte *et al.*, 2013). Un efecto contrario se observó en el grupo de 90 días de vida, con un aumento en la actividad de la GPx, esta diferencia podría deberse al tiempo de exposición, considerando que, en un reporte previo, después de una exposición continua por 20 semanas la actividad de GPx fue inhibida, (Lacorte *et al.*, 2013). Sin embargo, en nuestro estudio la actividad de GPx disminuyó en testículo al día 49 de vida, de manera similar Elmallah *et al.* (2017) reportaron que en animales púberes administrados con una dosis de 6.5 mg/kg por 5 días la actividad de GPx disminuyó en testículo. El Cd está involucrado en el incremento de H₂O₂ al inhibir sistema antioxidante GPx lo que resulta en una mayor lipoperoxidación (Valko *et al.*, 2005), debido a su interacción con grupos sulfhidrilos del GSH, (Shelly, 2009; Lacorte *et al.*, 2013). En nuestros resultados también se observó un aumento de lipoperoxidación en epidídimo y testículo tanto en 49 y 90 días, excepto en la cola a los 49 días de vida, lo que refleja que el Cd induce estrés oxidante en estos dos tejidos.

La glutatión peroxidasa requiere la presencia de glutatión reducido para su acción. La glutatión reductasa (GSR) reduce el disulfuro de glutatión (GSSG) a la forma de sulfhidrilo GSH, que es un antioxidante celular importante (Mannervik, 1987; Aprioku, 2013). Por cada mol de glutatión oxidado (GSSG), se requiere una mol de NADPH para reducir GSSG a GSH (Aprioku, 2013). En este sentido, se ha descrito, en estudios de cultivo celular de la línea celular HaCat, que el Cd causa una disminución en la relación GSSG/GSH modificando en el estado Redox de la célula e induciendo un aumento en la generación de ERO (Nzengue *et al.*, 2008), principalmente en los radicales OH. En este caso, la producción de OH podría aumentar en las células del epidídimo y ser responsable del daño oxidativo y de la oxidación directa de GSH en

GSSG, reflejándose en la relación reducida en este tejido, tal y como se observó al evaluar esta variable en el presente proyecto.

En la literatura se han descrito cuatro miembros de la familia de la enzima antioxidante GPx (GPx-1, 3, 4 y 5), que se encuentra en las células epiteliales del epidídimo, así como en los espermatozoides y en el líquido seminal (Vernet *et al.*, 2004), siendo su papel de mayor actividad ante la presencia de H₂O₂ en epidídimo (Dufaure *et al.*, 1996; Zini y Schlegel, 1997; Vernet *et al.*, 2004). La forma GPx-1 es la más importante y su actividad se ha descrito en testículo y epidídimo, siendo de mayor actividad en presencia H₂O₂ en el epidídimo (Dufaure *et al.*, 1996; Zini y Schlegel, 1997; Vernet *et al.*, 2004); en la forma celular GPx-3 se ha descrito que su expresión principal está en la región de la cola en el citosol de las células epiteliales del epidídimo, mientras que en la región de la cauda una expresión menor es secretada hacia el lumen, debiéndose su control de expresión por los andrógenos en la región de cola y cuerpo y siendo independiente de andrógenos en la región de la cabeza en el epidídimo (Schwaab *et al.*, 1998; Vernet *et al.*, 2004). Respecto a la actividad de GPx-4, es mayor su expresión en testículo que en células germinales y células de Leydig (Baek *et al.*, 2007), esta expresión es influenciada por la T, ya que su expresión se observa después de la pubertad (Maiorino *et al.*, 1998), participa en procesos de espermatogénesis, pero no se expresa en células de Sertoli (Roveri *et al.*, 1992). En nuestro caso la actividad de GPx disminuyó en testículo al día 49 de vida al finalizar el tratamiento con Cd, por lo que podríamos inferir que la actividad de GPx-4 es la que podría afectarse en el testículo durante esta etapa, debido a las bajas concentraciones de T causadas por este metal.

Algunos estudios han sugerido que, en comparación con otros órganos (p. Ej. El hígado), las respuestas defensivas de los testículos y el epidídimo a los efectos tóxicos de Cd parecen ser limitadas debido a la dificultad para inducir la proteína protectora metalotioneína en las gónadas, que une el Cd y lo hace no disponible (de Souza *et al.*, 2010). En nuestro estudio, el epidídimo, a diferencia del testículo, muestra una mayor sensibilidad en el deterioro de la actividad antioxidante. El epidídimo es responsable de la maduración de los espermatozoides (Tremellen, 2008; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2016) y los procesos de fertilidad (Cornwall, 2009) cuya actividad enzimática es

diferencial y específica para cada región de la cabeza, el cuerpo y cola del epidídimo. El viaje que lleva el espermatozoide por el epidídimo inicia desde la región de la cabeza hacia la región de la cola llevándose a cabo la modificación estructural de la membrana plasmática y proteínas asociadas que confieren la capacidad fertilizante del espermatozoide, en la región de la cola los espermatozoides se vuelven altamente susceptibles a la lipoperoxidación inducido por el ataque de ERO (Vernet *et al.*, 2004). Sí bien los eventos de maduración de los espermatozoides epididimarios necesitan un nivel determinado de oxidación, al igual un sistema antioxidante eficiente, que aparece durante el proceso de maduración sexual, por ello se observan diferencias en la actividad de las enzimas antioxidantes definidas por la edad en las ratas control, además de depender de las adecuadas concentraciones de T, como es el caso de la GPx-4 y GPx-5, directamente influenciadas bajo el control de T (Faure *et al.*, 1991; Vernet *et al.*, 2004), durante el transito del espermatozoide por el epidídimo se expresa esta enzima en la membrana plasmática (Jiménez *et al.*, 1992; Vernet *et al.*, 2004).

XIV. CONCLUSIÓN

Se observó una bioacumulación de cadmio en el testículo y epidídimo en sus tres regiones después de 21 días de exposición al metal. La acumulación de Cd se pudo encontrar, aunque en menor proporción, incluso hasta el día 90 de vida, a pesar del cese de exposición. Esta bioacumulación provocó la alteración de la actividad de enzimas antioxidantes como SOD, CAT y GPx y la disminución en la concentración de T, que permaneció hasta los 90 días de vida. De tal forma, que nuestros resultados sugieren que la exposición de Cd en etapas puberales puede contribuir a la infertilidad reportada en etapas adultas del individuo.

XV. BIBLIOGRAFÍA

- Ali, I., Penttinen-Damdiopoulou, P. E., Makela, S. I., Berglund, M., Stenius, U., Akesson, A., Hakansson, H. y Halldin, K. (2010). Estrogen-like effects of cadmium in vivo do not appear to be mediated via the classical estrogen receptor transcriptional pathway. *Environmental Health Sciences*, 118(10): 1389-1394.
- Agency for Toxic Substances & Disease Registry (ATSDR). (2012). Toxicological Profile for Cadmium. Division of Toxicology and Environmental Medicine, Atlanta, G.A. Chemical Abstract Service, 487.
- Abreu, A. P., Kaiser, U. B., y Latronico, A. C. (2010). The Role of Prokineticins in the Pathogenesis of Hypogonadotropic Hypogonadism. *Neuroendocrinology*, 91(4): 283-290.
- Abarikwu, S. O., Olufemi, P. D., Lawrence, C. J., Wekere, F. C., Ochulor, A. C. y Barikuma, A. M. (2016). Rutin, an antioxidant flavonoid, induces glutathione and glutathione peroxidase activities to protect against ethanol effects in cadmium-induced oxidative stress in the testis of adult rats. *Andrologia*, 49(7): 1-12.
- Abreu, A. P. y Kaiser, U. B. (2016). Pubertal development and regulation. *Lancet Diabetes Endocrinology*, 4(3): 254-264.
- Abdalla, F. H., Cardoso, A. M., Schmatz, R., Gonçalves, J. F., Baldissarelli, J., Martins, C. C. y Mazzanti, C. M. A. (2014). Protective effect of quercetin in ecto-enzymes, cholinesterases, and myeloperoxidase activities in the lymphocytes of rats exposed to cadmium. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 396(1-2): 201–211.
- Abd El-Meseeh, N. A., El Shaarawy, E. A., Al Domairy, A. F. y Sehly, R. A. (2016). Changes in rat testis morphology and androgen receptor expression around the age of puberty. *Annals of anatomy*, 205: 37-44.
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*; 105: 121-126.
- Adamkovicova, M., Toman, R., Cabaj, M., Massanyi, P., Martiniakova, M., Omelka, R. y Duranova, H. (2014). Effects of Subchronic Exposure to Cadmium and Diazinon on Testis and Epididymis in Rats. *The Scientific World Journal*, 2014: 1–9.
- Adaramoye, O. A. y Akanni, O. O. (2016). Protective effects of *Artocarpus altilis* (Moraceae) on cadmium-induced changes in sperm characteristics and testicular oxidative damage in rats. *Andrology*, 48(2): 152-163.

- Aitken, R. J., y Roman, S. D. (2008) Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1:15–24.
- Al-Tikriti, A., Al-Khateeb, E., y Abbas, M. A. (2017). Teucrium polium hexane extract downregulated androgen receptor in testis and decreased fertility index in rats. *Hum Experimental Toxicology*, 36 (12): 1248-1255.
- Amara, S., Abdelmelek, H., Garrel, C., Guiraud, P., Douki, T., Ravana, J., L. Favier, A., Sakly, M. y Benrhouma, K. (2008). Preventive Effect of Zinc against Cadmium induced Oxidative Stress in the Rat Testis. *Journal Reproductive Development*, 54(2):129-134.
- Allanson, M., y Deanesly, R. (1962). Observations on cadmium damage and repair in rat testes and the effects on the pituitary gonadotrophs. *Journal of Endocrinology*, 24(4), 453–NP.
- Amstislavskaya, T. G., Bulygina, V.V., Tikhonova, M.A., Maslova, L. N. (2013). Social isolation during peri-adolescence or adulthood: effects on sexual motivation, testosterone and corticosterone response under conditions of sexual arousal in male rats. *The Chinese journal of physiology*, 56 (1): 36-43.
- Aprioku, J. S. (2013). Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. *Journal Reproductive Infertility*. 14(4):158-72.
- Arteaga-Silva, M., Hernández-López, A., Alcántara-Ramírez, M., Hernández-Rodríguez, J., Viguera-Villaseñor, R.M., Bonilla-Jaime, H. y Guzmán-García, X. (2012). Efecto del cadmio sobre el epitelio peneano de la rata Wistar. *Asociación Mesoamericana de Ecotoxicología y Química Ambiental*.
- Arteaga-Silva, M., Viguera-Villaseñor, R.M., Retana-Márquez, S., Hernández -González, M., Bonilla-Jaime, H., Guzmán-García, X. y Contreras-Montiel, J.L. (2013). Testosterone Levels and Development of the Penile Spines and Testicular Tissue during the Postnatal Growth in Wistar Rats. *Advances in Sexual Medicine*, 3(2013):1-9.
- Baek, I. J., Seo, D. S., Yon, J. M., Lee, S. R., Jin, Y., Nahm, S. S. y Nam, S. Y. (2007). Tissue expression and cellular localization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) mRNA in male mice. *Journal of Molecular Histology*, 38(3): 237–244.
- Bajszczak, K. y Slowikowska-Hilczer, J. (2016). [Therapeutic problems in disorders of sex development]. *Pediatric Endocrinology Diabetes Metabolism*, 22(1): 26-31.
- Becu, D., y Libertun, C. (1982). Comparative maturation of the regulation of prolactin and thyrotropin by serotonin and thyrotropin-releasing hormone in male and female rats. *Endocrinology*, 110(6): 1879-1884.
- Benoff, S., Hauser, R., Marmar, J. L., Hurley, I. R., Napolitano, B. y Centola, G. M. (2009). Cadmium concentrations in blood and seminal plasma: correlations with sperm number and

motility in three male populations (infertility patients, artificial insemination donors, and unselected volunteers). *Molecular Medicine Society*, 15(7-8): 248-262.

- Chemek, M., Mimouna, S. B., Boughammoura, S., Delbes, G. y Messaoudi, I. (2016). Protective role of zinc against the toxicity induced by exposure to cadmium during gestation and lactation on testis development. *Reproductive Toxicology*, 63: 151-160.
- Chen, X., Li, L., Li, H., Guan, H., Dong, Y., Li, X. y Ge, R. S. (2017). Prenatal exposure to di-n-butyl phthalate disrupts the development of adult Leydig cells in male rats during puberty. *Toxicology*, 386: 19–27.
- Ciarrocca, M., Rosati, M. V., Tomei, F., Capozzella, A., Andreozzi, G., Tomei, G. y Caciari, T. (2013). Is urinary 1-hydroxypyrene a valid biomarker for exposure to air pollution in outdoor workers? A meta-analysis. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 24(1): 17–26.
- Choudhuri, S., Li Liu, W., Berman, N. E. J. y Klaassen, C. D. (1996). Cadmium accumulation and metallothionein expression in brain of mice at different stages of development. *Toxicology Letters*, 84(3): 127–133.
- Correia, S., Vaz, C. V., Silva, A. M., Cavaco, J. E. y Socorro, S. (2017). Regucalcin counteracts tert-butyl hydroperoxide and cadmium-induced oxidative stress in rat testis. *Journal of applied Toxicology*. 37(2): 159-166.
- Cohen, G. y Hochstein, P., (1963). Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochemistry*, 2: 1420–1428.
- Cornwall, G. A. (2008). New insights into epididymal biology and function. *Human Reproduction Update*, 15(2): 213–227.
- Cupertino, M. C., Novaes, R. D., Santos, E. C., Neves, A. C., Silva, E., Oliveira, J. A. y Matta, S. L. P. (2017). Differential Susceptibility of Germ and Leydig Cells to Cadmium-Mediated Toxicity: Impact on Testis Structure, Adiponectin Levels, and Steroidogenesis. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 3405089: 1-11.
- Cuypers, A., Plusquin, M., Remans, T., Jozefczak, M., Keunen, E., Gielen, H. y Smeets, K. (2010). Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals*, 23(5): 927-940.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M. y Gore, A. C. (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews*, 30(4): 293–342.
- Dohle, G. R., Smit, M. y Weber, R. F. (2003). Androgens and male fertility. *World Journal Urology*, 21(5): 341-345.
- Djuric, A., Begic, A., Gobeljic, B., Stanojevic, I., Ninkovic, M., Vojvodic, D. y Djukic, M. (2015). Oxidative stress, bioelements and androgen status in testes of rats subacutely exposed to cadmium. *Food and Chemical Toxicology*, 86: 25–33.

- De Angelis, C., Galdiero, M., Pivonello, C., Salzano, C., Gianfrilli, D., Piscitelli, P. y Pivonello, R. (2017). The environment and male reproduction: The effect of cadmium exposure on reproductive function and its implication in fertility. *Reproductive Toxicology*, 73: 105–127.
- De Souza Predes, F., Diamante, M. A. S. y Dolder, H. (2010). Testis response to low doses of cadmium in Wistar rats. *International Journal of Experimental Pathology*, 91(2): 125–131.
- Dorostghoal, M., Sorooshnia, F. y Zardkaf, A. (2010). Stereological analysis of Wistar rat testis during early postnatal development. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 40(2): 89–94.
- Dufaure, J.P., Lareyre, J.J., Schwaab, V., Mattei, M.G. y Drevet, J.R. (1996). Structural organization, chromosomal localization, expression and phylogenetic evaluation of mouse glutathione peroxidase encoding genes. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie*, 319 (1996): 559–568.
- el-Demerdash, F. M., Yousef, M. I. y Al-Salhen, K. S. (2003). Protective effects of isoflavone on some biochemical parameters affected by cypermethrin in male rabbits. *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 38(3): 365-378.
- Elmallah, M., Elkhadragey, M., Al-Olayan, E. y Abdel Moneim, A. (2017). Protective Effect of *Fragaria ananassa* Crude Extract on Cadmium-Induced Lipid Peroxidation, Antioxidant Enzymes Suppression, and Apoptosis in Rat Testes. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5): 957.
- Faure, J., Ghyselink, N. B., Jimenez, C. y Dufaure, J. P. (1991). Specific Distribution of Messenger Ribonucleic Acids for 24-Kilodalton Proteins in the Mouse Epididymis as Revealed by in Situ Hybridization: Developmental Expression and Regulation in the Adult1. *Biology of Reproduction*, 44(1): 13–22.
- Ganguly, K., Levänen, B., Palmberg, L., Åkesson, A. y Lindén, A. (2018). Cadmium in tobacco smokers: a neglected link to lung disease? *European Respiratory Review*, 27: (147).
- García Rodríguez, G. y Díaz Loving, R. (2011). Predictores psicosociales del comportamiento sexual. *Interamerican Journal of Psychology*, 45(3): 405.
- Girod, C. A. (1964). Propos de L'Influence du Chlore de Cdmium sur le testicule; research in the monkey macacus irus f. cuv. *Seances Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales*, 158: 297–299.
- Gollenberg, A. L., Hediger, M. L., Lee, P. A., Himes, J. H. y Buck Louis, G. M. (2010). Association Between Lead and Cadmium and Reproductive Hormones in Peripubertal U.S. Girls. *Environmental Health Perspectives*, 118(12):1782-7.

- Gu, W. y Hecht, N. B. (1996). Developmental expression of glutathione peroxidase, catalase, and manganese superoxide dismutase mRNAs during spermatogenesis in the mouse. *Journal of Andrology*, 17: 256-62.
- Guo, J., Zhou, H., Su, Z., Chen, B., Wang, G., Wang, C. Q. F. y Ge, R. S. (2013). Comparison of cell types in the rat Leydig cell lineage after ethane dimethanesulfonate treatment. *Reproduction*, 145(4): 371–380.
- Hernández-González, M. (2000). Prepubertal genital grooming and penile erections in relation to sexual behavior of rats. *Physiology and behavior*, 71(1-2): 51–56.
- Hernández-Rodríguez, J., Togno-Pierce, C., López de Jesús, P., Perez-Aguirre, S. G., Arenas-Ríos, E., Viguera-Villaseñor, R. M., Montes-López, S., Bonilla-Jaime, H., Damián-Matsumura, P. y Arteaga-Silva, M. (2016). Efecto del cadmio en la maduración espermática epididimaria. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, ISSN 2334-2501.
- IARC, IARC (2012). Monographs vol. 100C, Evaluation of carcinogenic risks to humans, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- Interdonato, M., Pizzino, G., Bitto, A., Galfo, F., Irrera, N., Mecchio, A. y Altavilla, D. (2015). Cadmium delays puberty onset and testis growth in adolescents. *Clinical endocrinology (Oxford)*, 83(3): 357-362.
- Jackson, L. M., Timmer, K. M. y Foster, D. L. (2008). Sexual differentiation of the external genitalia and the timing of puberty in the presence of an antiandrogen in sheep. *Endocrinology*, 149(8): 4200-4208.
- Jarvis, K.M. y Robaire, B., (2001). Dynamic changes in gene expression along the rat epididymis. *Biology. Reproductive*, 65: 696–703.
- Jimenez, C., Lefrancois, A. M., Ghyselinck, N. B. y Dufaure, J. P. (1992). Characterization and hormonal regulation of 24 kDa protein synthesis by the adult murine epididymis. *Journal of Endocrinology*, 133(2): 197–NP.
- Ji, Y.-L., Wang, H., Liu, P., Wang, Q., Zhao, X.-F., Meng, X.-H. y Xu, D.-X. (2010). Pubertal cadmium exposure impairs testicular development and spermatogenesis via disrupting testicular testosterone synthesis in adult mice. *Reproductive Toxicology*, 29(2): 176-183.
- Jin, S., Sun, D., Xi, Q., Dong, X., Song, D., Fu, H. y Zhang, Y. (2016). Identification of genes in the hypothalamus-pituitary-gonad axis in the brain of Amur sturgeons (*Acipenser schrenckii*) by comparative transcriptome analysis in relation to kisspeptin treatment. *Gene*, 595(1): 53-61.
- Johansen, J. S., Harris, A. K., Rychly, D. J. y Ergul, A. (2005). Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovascular Diabetology*, 4:5.

- Juárez Flores, D. L., Quevedo Díaz, M., Reséndiz Sharpe, A. y López González, P. (2013). Mecanismos neuroendocrinos al inicio de la pubertad. *Revista Mexicana de Pediatría*, 80(6): 240.
- Kretser, D. M. y Kerr, J. B. (1994) "The Cytology of the Testis," In: E. Knobil and J. Neil, Eds., *Physiology of Reproduction*, 2nd Edition, Raven Press, New York, 1177-1290.
- Korchazhkina, O., Exley, C. y Andrew Spencer, S. (2003). Measurement by reversed-phase high-performance liquid chromatography of malondialdehyde in normal human urine following derivatization with 2, 4-dinitrophenylhydrazine. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 794(2): 353-362.
- Kozirowska-Gilun, M., Gilun, P., Fraser, L., Kozirowski, M., Kordan, W. y Stefanczyk-Krzyszowska, S. (2012). Antioxidant Enzyme Activity and mRNA Expression in Reproductive Tract of Adult Male European Bison (*Bison bonasus*, Linnaeus 1758). *Reproduction in Domestic Animals*, 48(1): 7–14.
- Korenbrot, C. C., Huhtaniemi, I. T. y Weiner, R. I. (1977). Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. *Biology Reproductive*, 17(2): 298-303.
- Lacorte, L. M., Seiva, F. R. F., Rinaldi, J. C., Delella, F. K., Moroz, A., Sarobo, C. y Felisbino, S. L. (2013). Caffeine reduces cadmium accumulation in the organism and enhances the levels of antioxidant protein expression in the epididymis. *Reproductive Toxicology*, 35: 137-143.
- Lafuente, A. y Esquifino, A. I. (1999). Cadmium effects on hypothalamic activity and pituitary hormone secretion in the male. *Toxicology letters*, 110(3): 209–218.
- Lafuente, A., Alvarez-Demanuel, E., Márquez, N. y Esquifino, A. I. (1999). Pubertal dependent effects of cadmium on episodic prolactin secretion in male rats. *Archives of Toxicology*, 73(1): 60–63.
- Lafuente, A., Márquez, N., Pérez-Lorenzo, M., Pazo, D. y Esquifino, A. (2000). Pubertal and postpubertal cadmium exposure differentially affects the hypothalamic–pituitary–testicular axis function in the rat. *Food and Chemical Toxicology*, 38(10): 913–923.
- Lafuente, A. y Esquifino, A. I. (2002). Effects of Oral Cadmium Exposure through Puberty on Plasma Prolactin and Gonadotropin Levels and Amino Acid Contents in Various Brain Areas in Pubertal Male Rats. *NeuroToxicology*, 23(2): 207–213.
- Lafuente, A., Márquez, N., Pazo, D. y Esquifino, A. I. (2001). Cadmium effects on dopamine turnover and plasma levels of prolactin, GH and ACTH. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 57(3): 231–236.
- Lafuente, A., González-Carracedo, A., Romero, A. y Esquifino, A. I. (2003). Effect of cadmium on lymphocyte subsets distribution in thymus and spleen. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 59(1): 43–48.

- Lafuente, A. (2013). The hypothalamic–pituitary–gonadal axis is target of cadmium toxicity. An update of recent studies and potential therapeutic approaches. *Food and Chemical Toxicology*, 59: 395–404.
- López, M. (2003). Study of phenolic compounds as natural antioxidants by a fluorescence method. *Talanta*, 60(2-3): 609–616.
- López, E., Arce, C., Oset-Gasque, M. J., Canadas, S. y Gonzalez, M. P. (2006). Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free Radicals Biology Medicine*, 40(6): 940-951.
- Maiorino, M., Wissing, J. B., Brigelius-Flohé, R., Calabrese, F., Roveri, A., Steinert, P. y Flohé, L. (1998). Testosterone mediates expression of the selenoprotein PHGPx by induction of spermatogenesis and not by direct transcriptional gene activation. *Journal Federation of American Societies for Experimental Biology*, 12(13): 1359–1370.
- Manton, W. I., Kirkpatrick, J. B. y Cook, J. D. (1984). Does the choroid plexus really protect the brain from lead? *The Lancet*, 324:(8398).
- Manna, P., Sinha, M. y Sil, P. C. (2008). Cadmium induced testicular pathophysiology: Prophylactic role of taurine. *Reproductive Toxicology*, 26(3-4): 282–291.
- Meena, R., Supriya, C., Pratap Reddy, K. y Sreenivasula Reddy, P. (2017). Altered spermatogenesis, steroidogenesis and suppressed fertility in adult male rats exposed to genistein, a non-steroidal phytoestrogen during embryonic development. *Food Chemistry Toxicology*, 99: 70-77pp.
- Mendiola, J., Moreno, J. M., Roca, M., Vergara-Juárez, N., Martínez-García, M. J., García-Sánchez, A. y Torres-Cantero, A. M. (2011). Relationships between heavy metal concentrations in three different body fluids and male reproductive parameters: a pilot study. *Environmental Health*, 10 (1): 6.
- Migliarini, B., Campisi, A. M., Maradonna, F., Truzzi, C., Annibaldi, A., Scarponi, G. y Carnevali, O. (2005). Effects of cadmium exposure on testis apoptosis in the marine teleost *Gobius niger*. *General and Comparative Endocrinology*, 142(1-2): 241–247.
- Monsefi, M., Alaee, S., Moradshahi, A. y Rohani L. (2010). Cadmium-induced infertility in male mice. *Environmental Toxicology*, 5(1): 94-102.
- Moore, C L. (1986). A hormonal basis for sex differences in the self-grooming of rats. *Hormones and behavior*, 20:155 – 65.
- Mouritsen, A., Aksglaede, L., Sorensen, K., Mogensen, S. S., Leffers, H., Main, K. M. y Juul, A. (2010). Hypothesis: exposure to endocrine-disrupting chemicals may interfere with timing of puberty. *Int Journal Andrology*, 33(2): 346-359.

- Mruk, D. D., Silvestrini, B., Mo, M. y Cheng, C. Y. (2002). Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception*, 65(4): 305–311.
- Nna, V. U., Ujah, G. A., Mohamed, M., Etim, K. B., Igba, B. O., Augustine, E. R. y Osim, E. E. (2017). Cadmium chloride–induced testicular toxicity in male wistar rats; prophylactic effect of quercetin, and assessment of testicular recovery following cadmium chloride withdrawal. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 94: 109–123.
- Nordberg, G. F. (2009). Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238(3): 192–200.
- Nzungue, Y., Steiman, R. y Guiraud, P. (2008). Characterization of the cell death induced by cadmium in HaCaT and C6 cell lines. *Free Radical Research*, 42(2): 142–153.
- Ognjanović, B. I., Marković, S. D., Đorđević, N. Z., Trbojević, I. S., Štajn, A. Š. y Saičić, Z. S. (2010). Cadmium-induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: Protective role of coenzyme Q10 and Vitamin E. *Reproductive Toxicology*, 29(2): 191–197.
- Ojeda, R. S. y Skinner, M. K. (2005). Puberty in the rat. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 2061-2126.
- Oliveira, R. M. R. de, Verreschi, I. T. do N., Lipay, M. V. N., Eça, L. P., Guedes, A. D. y Bianco, B. (2009). Y chromosome in Turner syndrome: review of the literature. *Sao Paulo Medical Journal*, 127(6): 373–378.
- Ong, W. Y., He, X., Chua, L. H. y Ong, C. N. (2006). Increased uptake of divalent metals lead and cadmium into the brain after kainite-induced neuronal injury. *Experimental Brain Research*, 173(3): 468–474.
- Pant, N., Upadhyay, G., Pandey, S., Mathur, N., Saxena, D. K. y Srivastava, S. P. (2003). Lead and cadmium concentration in the seminal plasma of men in the general population: correlation with sperm quality. *Reproductive Toxicology*. 17(4): 447–450.
- Peltola, V., Huhtaniemi, I., Metsa-Ketela, T. y Ahotupa, M. (1996). Induction of lipid peroxidation during steroidogenesis in the rat testis. *Endocrinology*, 137(1): 105–112.
- Pérez García, P. y Azcona Cruz, M. I. (2012). Los efectos del cadmio en la salud. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 17 (3): 199-205.
- Pillai, A. y Gupta, S. (2005). Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver of female rats co-exposed to lead and cadmium: Effects of vitamin E and Mn²⁺. *Free Radical Research*, 39(7): 707–712.
- Prevot, V. (2015) Puberty in the rat. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*.

- Ramírez, A. (2002) Toxicología del cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos. *Anales de la Facultad de Medicina*, 1(63): 51-64.
- Rani, A., Kumar, A., Lal, A. y Pant, M. (2013). Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. *International journal of environmental health research*, 24(4): 378–399.
- Riccetti, L., De Pascali, F., Gilioli, L., Poti, F., Giva, L. B., Marino, M. y Casarini, L. (2017). Human LH and hCG stimulate differently the early signalling pathways but result in equal testosterone synthesis in mouse Leydig cells in vitro. *Reproductive Biology Endocrinology*, 15(1): 2.
- Robaire, B., Hinton, B.T. y Orgebin-Crist, M.C. 2015. The Epididymis. En: Knobil E., Neill J.D. (eds.), *Physiology of Reproduction*. St. Louis, USA: Elsevier. 1072–1148.
- Roveri, A., Casasco, A., Mairorino, M., Dalan, P., Calligaro, A. y Ursini, F. (1992). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rat testis. Gonadotropin dependence and immunocytochemical identification. *The Journal of biological chemistry*, 267 (9): 6142-6.
- Rudolph, L. M., Bentley, G. E., Calandra, R. S., Paredes, A. H., Tesone, M., Wu, T. J. y Micevych, P. E. (2016). Peripheral and Central Mechanisms Involved in the Hormonal Control of Male and Female Reproduction. *Journal Neuroendocrinology*, 28(7).
- Sachs, B. D., Glater, G. B. y O'Hanlon, J. K. (1984). Morphology of the erect glans penis in rats under various gonadal hormonal conditions. *Anatomical record*, 210(1): 45-52.
- Saïd, L., Banni, M., Kerkeni, A., Saïd, K. y Messaoudi, I. (2010). Influence of combined treatment with zinc and selenium on cadmium induced testicular pathophysiology in rat. *Food and Chemical Toxicology*, 48:2759–65
- Salvatori, F., Talassi, C. B., Salzgeber, S. A., Spinosa, H. S. y Bernardi, M. M. (2004). Embryotoxic and long-term effects of cadmium exposure during embryogenesis in rats. *Neurotoxicology and teratology*, 26(5): 673-680.
- Samuel, J. B., Stanley, J. A., Princess, R. A., Shanthi, P. y Sebastian, M. S. (2011). Gestational cadmium exposure-induced ovotoxicity delays puberty through oxidative stress and impaired steroid hormone levels. *Journal Medicine Toxicology*, 7(3): 195-204.
- Shan, L.X., Phillips, D.M., Bardin, C.W. y Hardy, M.P. (1993). Differential regulation of steroidogenic enzymes during differentiation optimizes testosterone production by adult rat Leydig cells. *Endocrinology*, 133: 2277–2283.
- Sears, M.E., Kerr, K.J. y Bray, R.I. (2012). Arsenic, cadmium, lead, and mercury in sweat: a systematic review. *Environ Public Health*, 184745.

- Shelly, C. L. (2009) Regulation of glutathione synthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30:42–59.
- Stohs, S. J., Bagchi, D., Hassoun, E. y Bagchi, M. (2001). Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 20: 77-88.
- Satarug, S. y Moore, M. R. (2004). Adverse Health Effects of Chronic Exposure to Low-Level Cadmium in Foodstuffs and Cigarette Smoke. *Environmental Health Perspectives*, 112(10): 1099–1103.
- Sayegh, J. F., Kobor, G., Lajtha, A. y Vadasz, C. (1990). Effects of social isolation and the time of day on testosterone levels in plasma of C57BL/6By and BALB/cBy mice. *Steroids*, 55(2): 79–82.
- Schwaab, V., Lareyre, J.J., Vernet, P., Pons, E., Faure, J., Dufaure, J.P. y Drevet, J.R., (1998). Characterization, regulation of the expression and putative roles of two glutathione peroxidase proteins found in the mouse epididymis. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 53: 157– 162.
- Stoker, T. E., Parks, L. G., Gray, L. E. y Cooper, R. L. (2000). Endocrine-disrupting chemicals: prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid function in the male rat. A focus on the EDSTAC recommendations. *Endocrine Disrupter Screening and Testing Advisory Committee. Crit Revision Toxicology*, 30(2): 197-252.
- Tramer, F., Rocco, F., Micali, F., Sandri, G. y Panfili, E. (1998). Antioxidant Systems in Rat Epididymal Spermatozoa1. *Biology of Reproduction*, 59(4): 753–758.
- Thévenod, F. (2009). Cadmium and cellular signaling cascades: To be or not to be? *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238(3): 221–239.
- Thévenod, F. (2010). Catch me if you can! Novel aspects of cadmium transport in mammalian cells. *Biometals*, 23(5): 857-875.
- Thompson, J. y Bannigan, J. (2008). Cadmium: Toxic effects on the reproductive system and the embryo. *Reproductive Toxicology*, 25(3): 304–315.
- Tremellen, K. (2008). Oxidative stress and male infertility a clinical perspective. *Human Reproduction Update*, 14(3): 243–258.
- Torres-Sánchez, L., Vázquez-Salas, R. A., Vite, A., Galván-Portillo, M., Cebrián, M. E., Macías-Jiménez, A. P. y Montes, S. (2018). Blood cadmium determinants among males over forty living in Mexico City. *Science of the Total Environment*, 637-638: 686–694.
- Vaisberg, C. N., Jelezarsky, L. V., Dishlianova, B. y Chaushev, T. A. (2005). Activity, substrate detection and immunolocalization of glutathione peroxidase (GPx) in bovine reproductive organs and semen. *Theriogenology*, 64(2): 416–428.

- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J. y Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 266(1/2): 37–56.
- Valko, M., Morris, H. y Cronin, M. T. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current medicinal chemistry*, 12(10): 1161-1208.
- Vernet, P., Aitken, R. y Drevet, J. (2004). Antioxidant strategies in the epididymis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 216(1-2): 31–39.
- Xu, B., Jin, Y., Feng, Z., Xu, Z. y Matsushita, T. (1993). Lipid peroxidation induced by maternal cadmium exposure in mouse pups. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 51(5):772-9.
- Waalkes, M.P. (2000). Cadmium carcinogenesis in review. *Journal. Inorganic. Biochemistry*, 79(1-2):241-244.
- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B. y Beyersmann, D. (2003). Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis: a review. *Toxicology*, 192: 95–117.
- Welch, K. D., Van Eden, M. E. y Aust, S. D. (2001). Modification of ferritin during iron loading. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(8): 999–1006.
- Wong, K.-L. y Klaassen, C. D. (1980). Tissue distribution and retention of cadmium in rats during postnatal development: Minimal role of hepatic metallothionein. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 53(2): 343–353.
- Wu, X., Guo, X., Wang, H., Zhou, S., Li, L., Chen, X. y Ge, R. S. (2017). A brief exposure to cadmium impairs Leydig cell regeneration in the adult rat testis. *Scientific Reports*, 24; 7(1): 6337.
- Zalups, R. K. (1997). Influence of different degrees of reduced renal mass on the renal and hepatic disposition of administered cadmium. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 51(3): 245–264.
- Zalups, R. K. y Ahmad, S. (2003). Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 186(3): 163–188.
- Zheng, W. (2001). Toxicology of choroid plexus: Special reference to metal-induced neurotoxicities. *Microscopy Research and Technique*, 52(1): 89–103.
- Zini, A., Lamirande, E. y Gagnon, C. (1993). Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *International Journal of Andrology*, 16(3): 183–188.
- Zini, A. y Schlegel, P. N. (1997). Expression of glutathione peroxidases in the adult male rat reproductive tract. *Fertility and Sterility*, 68(4): 689–695.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00072

Matrícula: 2173801344

Exposición a cadmio en etapa puberal: su efecto oxidante y la determinación de testosterona en la rata Wistar adulta.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 29 del mes de enero del año 2020 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. HERLINDA BONILLA JAIME
- DRA. SONIA GALVAN ARZATE
- DRA. MIRNA RUIZ RAMOS
- DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA



SONIA GUADALUPE PEREZ AGUIRRE
ALUMNA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: SONIA GUADALUPE PEREZ AGUIRRE

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. HERLINDA BONILLA JAIME

VOCAL

DRA. SONIA GALVAN ARZATE

VOCAL

DRA. MIRNA RUIZ RAMOS

SECRETARIO

DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA