



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**EFFECTOS DE CIPERMETRINA SOBRE
LA CELULARIDAD, MORFOLOGIA Y PROLIFERACION EN
EPITELIO SEMINIFERO DE RATON CF-1**

PAMELA PATRICIA RUIZ VEGA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

PROFESOR GUIA: HECTOR RODRIGUEZ BUSTOS

SANTIAGO, CHILE
2006



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**EFFECTOS DE CIPERMETRINA SOBRE
LA CELULARIDAD, MORFOLOGÍA Y PROLIFERACION EN
EPITELIO SEMINIFERO DE RATON CF-1**

PAMELA PATRICIA RUIZ VEGA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

NOTA FINAL:

| | NOTA | FIRMA |
|--|-------|-------|
| PROFESOR GUIA : HECTOR RODRIGUEZ BUSTOS | | |
| PROFESOR CONSEJERO: RAQUEL CEPEDA CANALES | | |
| PROFESOR CONSEJERO: MONICA DE LOS REYES SOLOVERA | | |

PROFESOR GUIA: HECTOR RODRIGUEZ BUSTOS

SANTIAGO, CHILE
2006

Agradecimientos

A mis Padres por su apoyo incondicional y a mi hermano Marcelo por alegrarme siempre la vida.

A Paulina, mi amiga ídola por su apoyo permanente. A Francisco siempre portavoz de buenas noticias.

Al Dr. Héctor Rodríguez por haberme dado la oportunidad de desarrollar mi tesis en su laboratorio.

A la Dra. Mónica de los Reyes por sus conocimientos, a la Dra. Raquel Cepeda por sus consejos y dedicación.

A la Sra. Paula Muñoz por su amistad y por ayudar en la búsqueda de documentos.

Al profesor Juan Carlos Araya por explicarme con tanta paciencia inmunohistoquímica como también por sus consejos de redacción.

A los profesores Leonella Jiménez y Luis Sarabia quienes dedicaron tanto tiempo en ayudarme aportando su valiosa experiencia.

Del Laboratorio Central a la Sra. Irma Orellana, Don Juan Borjas, Don Ricardo Contreras, Don Francisco Cortés y a Don Orlando Valladares, quienes hicieron de mis problemas sus problemas y me ayudaron a resolverlos.

A la Sra. Cecilia, Manolito, Don Jaime y a Jonhy, quienes aportaron calidez a mis jornadas y me hicieron sentir en los laboratorios como si estuviera en mi casa.

Y también a mis primeros pacientes Jack y Miranda.

Resumen

La función reproductiva masculina es conocida por ser altamente sensible a muchos agentes químicos. Cipermetrina (CP) es un pesticida piretroide, cuyos efectos en variables de fertilidad masculina son controversiales. El objetivo de la presente Memoria de Título fue evaluar los efectos tóxicos de CP administrada en dosis única sobre la citología testicular de ratón macho adulto. Utilizando la técnica histológica de tinción hematoxilina (PAS) se cuantificó la celularidad del epitelio germinal de acuerdo a sus características morfológicas y la presencia de espermatozoides; en los mismos preparados, se observó la presencia de alteraciones histológicas como taponamiento tubular, discontinuidad y vacuolización del epitelio seminal. Mediante inmunohistoquímica se cuantificaron las células inmunomarcadas utilizando como indicador de proliferación celular el anticuerpo monoclonal antiantígeno Ki-67. El modelo biológico estudiado corresponde a ratones machos adultos cepa CF1, distribuidos en dos grupos: i) experimental, al cual se le administró $\frac{1}{5}$ DL₅₀ CP vehiculizada en aceite vegetal, ii) control inoculados solo con aceite vegetal, todos tratados en dosis única vía intraperitoneal, constituyendo el tiempo cero del tratamiento. Durante el periodo experimental se eutanasiaron tres animales de cada grupo según el siguiente calendario: un día después de la inoculación, luego cada 8,6 días, hasta completar 34,4 días. Los resultados indican que CP indujo una disminución estadísticamente significativa de las células en mitosis en el primer ciclo espermatogénico para luego aumentar compensatoriamente en los tres ciclos posteriores. CP indujo alteraciones en la organización histológica testicular aumentando la frecuencia de presentación de discontinuidad, vacuolización del epitelio y, en menor grado, taponamiento del lumen tubular; este último daño fue gradualmente revertido al completarse una onda espermatogénica. La presencia de espermatozoides en

lumen tubular disminuyó en relación a los controles. Los recuentos de los distintos tipos celulares demuestran que las células más sensibles a la acción de CP, con valores estadísticamente significativos, las espermatogonias tipo A disminuyeron a partir del primer ciclo, hasta tres ciclos. Las espermatogonias tipo B presentaron un aumento hacia el segundo ciclo. Los espermátocitos en paquiteno y espermátides redondas disminuyeron a las 24 horas post tratamiento y a los 25,8 días que corresponden al tercer ciclo. De estos resultados se concluye que CP ejerce un efecto tóxico manifestándose en la alteración del patrón de proliferación espermatogonial, como también en la organización histológica testicular, y a nivel de las poblaciones celulares del epitelio seminífero afectando su frecuencia y desarrollo.

Summary

Male reproductive function is known to be sensitive to many chemical agents. Cypermethrin is a pyrethroid pesticide, whose effects in the variables of male fertility are notorious. The aim of this investigation is to evaluate the toxic effects of CP, administered in a single dose over the testicular cytology of adult male mice. Germ epithelium's cellularity was quantified according to its morphological characteristics and the existence of spermatozoa by using the histological technique of staining, haematoxylin (PAS). Histological alterations (such as tubular bunging, discontinuity and vacuolation of the seminiferous epithelium) were observed in the same preparations. By means of immunohistochemistry, immunostained cells were quantified, using the anti-antigen monoclonal antibody Ki-67 as indicator of cell proliferation. The studied biological model corresponds to adult male CF-1 mice, distributed into two groups: i) experimental group, to whom CP 1/5 was administered using vegetable oil as vehicle, ii) control group, inoculated only with vegetable oil. All of them were treated with a single dose via IP, giving origin to zero time of the treatment. During the experimental period, euthanasia was provoked to three animals of each group, according to the following schedule: one day after the inoculation, then 8.6 days, until 34.4 days. The results show that CP caused a statistically significant reduction of the cells in mitosis in the first spermatogenic cycle, and then it rises in a compensatory way in the three following cycles. CP induced alterations in the testicular histological organization, increasing the frequency of discontinuity appearance, epithelium vacuolation and, to a minor extent, tubular lumen bunging. This latter damage was gradually reverted when a spermatogenic cycle ended. The presence of spermatozoa in the tubular lumen decreased in relation to the control group. The inventories in the different cell types show that A- type spermatogonies are the most sensitive to CP's action

cells, with statistically significant figures. These spermatogonies decrease from the first cycle, until reaching three cycles. B-type spermatogonies show an increase from the second cycle. The pachytene spermatocytes and round spermatids decrease when 24 hours have passed after the treatment and when 25.8 days are completed, which correspond to the third cycle. From these results it is concluded that CP has toxic effects, showing them in the alteration of spermatoginal proliferation, as well as the histological cell organization of the seminiferous epithelium, affecting its frequency and development.

Índice

| | Pág. |
|--|-------------|
| Introducción | 1 |
| Revisión bibliográfica | |
| ▪ Piretrinas y piretroides..... | 3 |
| ▪ Cipermetrina..... | 9 |
| ▪ Gónada masculina:..... | 13 |
| ▪ Espermatogénesis..... | 15 |
| ▪ Regulación de la espermatogénesis..... | 17 |
| ▪ Celularidad del epitelio germinal..... | 18 |
| ▪ Célula de Sertoli..... | 18 |
| ▪ Células de la línea germinal contabilizadas..... | 19 |
| ▪ Uniones celulares del epitelio germinal..... | 22 |
| Hipótesis | 24 |
| Objetivos | 24 |
| Material y método | 25 |
| Análisis de resultados | 28 |
| Análisis estadístico | 30 |
| Resultados | 31 |
| Discusión | 40 |
| Conclusión | 46 |
| Bibliografía | 47 |
| Anexo 1: Reactivos y equipos | 58 |

Anexo 2:

Protocolos.....61

Anexo 3: Reacción de inmunohistoquímica.....66

Índice de figuras

Fig. 1 Planta de Crisantemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*).

Fig. 2 Esquema de los canales de sodio voltajes sensibles (VSSC).

Fig. 3 Esquema de los VSSC modificados por los piretroides (tipo I y tipo II).

Fig. 4 a) Molécula de cipermetrina **b)** metabolización de cipermetrina.

Fig. 5 a) Esquema de testículo en un corte sagital, **b)** túbulos seminíferos en un corte transversal y **c)** detalle del epitelio seminífero.

Fig. 6 Esquema de los estadios de ciclo en epitelio seminífero ratón.

Fig. 7 Esquema de los tipos celulares de la línea germinal cuantificados.

Fig. 8 Microfotografía de un corte transversal de túbulo seminífero de ratón.

Fig. 9 Esquema de las uniones celulares en el epitelio seminífero de ratón.

Fig. 10 Esquema de los compartimientos formados por la barrera hematotesticular.

Fig. 11 Microfotografía de un corte transversal de túbulo seminífero de ratón tratado con CP utilizando la reacción inmunohistoquímica Ki- 67 (400x). Las flechas indican las células inmunomarcadas.

Fig. 12 Microfotografía de un corte transversal de túbulo seminífero de ratón tratado con CP. Utilizando la técnica de inmunohistoquímica Ki-67.

Fig. 13 Microfotografía de un corte transversal de testículo de ratón tratado con Cipermetrina (200x). Método Reacción histoquímica Hematoxilina-PAS.

Fig. 14 Microfotografía de un corte transversal de testículo de ratón tratado con Cipermetrina. Reacción histoquímica Hematoxilina-PAS (400x).

Fig. 15 Reacción inmunohistoquímica método Streptavidin- Biotin- Complex (SABC).

Índice de tablas

Tabla 1. Calendario de Eutanasia.

Tabla 2. Alteraciones morfológicas según grupos evaluados para todos los tiempos postratamiento.

Índice de gráficos

Gráfico 1. Tipos celulares/ de Sertoli para el grupo experimental y control según días post tratamiento.

Gráfico 2. Tipos celulares/ túbulos totales para el grupo experimental y control según días post tratamiento.

Gráfico 3. Presencia de espermatozoides para los grupos control y experimental según días post tratamiento.

Gráfico 4. Proliferación celular calculado según la fracción de inhibición.

Abreviaturas

CP Cipermetrina.

GnRH Hormona liberadora de gonadotrofinas.

FSH Hormona folículo estimulante.

LH Hormona luteinizante.

T Testosterona.

ADN Acido desoxirribonucleico.

EPA Agencia de protección del ambiente.

ABP Proteína ligante de andrógenos.

SBGH Globulina ligante de hormonas sexuales.

SCE Intercambio de cromátidas hermanas.

DL₅₀ Dosis letal 50.

VSSC Canales de sodio voltaje sensibles.

INTRODUCCIÓN

En Chile, existe un uso masivo de pesticidas, donde los sistemas de producción intensivos dependen de la aplicación de éstos para producir alimentos suficientes, con el fin de abastecer las demandas de la población. Los efectos de los plaguicidas han producido intoxicaciones graves en personas expuestas a estos químicos, y estas implicancias contribuyeron a que algunos tuvieran un uso restringido o incluso, fueran prohibidos.

A nivel nacional, el Ministerio de Salud en el año 2005, comunicó que la primera causa de intoxicación aguda por plaguicidas correspondió a pesticidas organofosforados, compuestos altamente tóxicos para mamíferos. Estos son seguidos por los piretroides, que por su baja toxicidad para mamíferos se presentaron como alternativa a todos los otros pesticidas orgánicos. Sin embargo, otros estudios indican que estos agentes no son tan inocuos como se había propuesto y causarían serios riesgos para la salud.

En mamíferos, tanto las células germinales masculinas como femeninas comparten etapas del desarrollo y una finalidad en común, la producción de gametos. Desde el punto de vista de la toxicidad es relevante conocer el daño que se produce a nivel de estas células, ya que son ellas las responsables de la transmisión de la información genética de una generación a otra permitiendo la conservación y perpetuación de las especies.

En el macho adulto, las células germinales se producen continuamente, por lo que cualquier alteración inducida por la presencia de agentes tóxicos podría provocar algún grado de infertilidad transitoria, que dada la naturaleza cíclica de la espermatogénesis, redundaría posteriormente en un repoblamiento celular. Por el contrario, la hembra cuenta desde su nacimiento con una dotación

de células fijas, sin posibilidades de aportar nuevas al ciclo vital, durante la edad reproductiva.

Metodológicamente, el estudio de la gametogénesis en el macho adulto permite identificar distintos tipos celulares según su morfología, las cuales tienen diferentes sensibilidades como también una ubicación determinada en el túbulo seminífero que es posible seguir secuencialmente en el tiempo.

Es por este motivo que la espermatogénesis en mamíferos proporciona un sistema único para estudiar los efectos tóxicos que pudieran ejercer ciertas sustancias, como los pesticidas, entre los cuales se encuentra cipermetrina (CP) un piretroide clasificado como moderadamente tóxico por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Se ha demostrado que CP induce alteraciones sobre las variables de fertilidad masculina. A pesar de la extensa investigación sobre los efectos tóxicos de CP, poco se ha abordado sobre sus efectos en la potencialidad reproductiva masculina.

Utilizando como modelo biológico ratones machos adultos cepa CF-1, se procedió a administrarles CP en dosis única vía intraperitoneal, evaluando los efectos de ésta sobre la proliferación, celularidad y morfología testicular, los que fueron observados a las 24 horas posteriores al tratamiento y siguiendo con intervalos de tiempo coincidentes con cada ciclo del epitelio seminífero hasta completar una onda de la espermatogénesis.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Piretrinas y piretroides

Las plantas han evolucionado por más de 400 millones de años y para contrarrestar el ataque de insectos han desarrollado mecanismos químicos de protección, como la acción insecticida (Rodríguez *et al.*, 2003). Estos han sido utilizados por la industria para la obtención de insecticidas de origen vegetal, como también para el desarrollo de nuevos insecticidas sintéticos (Pascual-Villalobos, 1996).

Un ejemplo de insecticida natural son las piretrinas: su principio activo es el piretro o pelitre, contenido en plantas herbáceas perennes de la familia de las asteráceas, tales como crisantemos, caléndulas, zinnias y tagetes. Entre estas plantas, se destaca el *Chrysanthemum cinerariaefolium* (**Fig. 1**) por contener mayores concentraciones de este compuesto (Rathgeb, 2000). En ella, mediante la deshidratación y la extracción con solventes se obtiene desde la inflorescencia, una oleoresina con actividad insecticida (Verdugo, 1983). Las piretrinas son de toxicidad baja para los mamíferos, lo cual es importante desde el punto de vista de la seguridad para el usuario, no obstante presentaban el inconveniente de ser rápidamente degradadas, necesitando aplicaciones frecuentes (Casida, 1980; Casadei, 2003). Mediante modificaciones estructurales sobre la molécula del piretro, se han creado compuestos de mayor poder residual, originándose las piretrinas sintéticas o piretroides¹ (Eil y Nisula, 1990).

Estos compuestos presentan varias ventajas comparativas con respecto al uso de los pesticidas orgánicos clorados o fosforados. Los piretroides presentan una potencia insecticida alta, una contaminación ambiental baja y, para los

¹ Los piretroides son ésteres de ácido crisantémico o ácido p-clorofenilisovalérico combinado con 3-fenoxibencil, alfa ciano 3-fenoxibencil o 5-bencil 3-furilmetil alcohol (Perger y Szadkowsky, 1994).

mamíferos, conservan una toxicidad reducida (Casida, 1980; Perger y Szadkowsky, 1994; Casida y Quistad, 1998; Garey y Wolff, 1998).



Figura 1. Planta de Crisantemo (*Chrisantemun cinerariaefolium*) modificado de Benth y Hooks (1937).

Sin embargo, estudios epidemiológicos, informes clínicos y de laboratorios indican que los piretroides pueden producir una gama de efectos inmunotóxicos y neurotóxicos, tanto en seres humanos como en otros mamíferos (Garey y Wolff, 1998; Shan *et al.*, 2004).

Los piretroides se subdividen en dos tipos, basándose en las diferencias estructurales y la acción neurofisiológica–toxicológica (Eells *et al.*, 1992):

- **Tipo I.** Con ausencia del grupo α -ciano, que en intoxicaciones agudas producen el síndrome T, con temblor corporal.
- **Tipo II.** Con presencia del grupo α -ciano, determinando el síndrome CS, con síntomas de salivación profusa, incoordinación motora y coreoatetosis.

Estos compuestos actúan modificando la permeabilidad iónica de la membrana del axón, generando una neuroexcitación en todas las especies. En particular, la acción neuroexcitatoria se atribuye a cambios de voltaje dependientes de los canales de sodio que se mantienen abiertos por intervalos de tiempo anormalmente prologandos, lo que causa impulsos repetitivos (Cremlyn, 1991; Casadei, 2003).

Durante la conducción del impulso nervioso, en la fase de depolarización, los canales de sodio voltaje sensibles (VSSC) permanecen abiertos incorporando Na^+ al interior de la célula, para posteriormente limitar su ingreso y con esto la longitud de la depolarización. En consecuencia, los VSSC se inactivan y deben volver a un estado de “reclinación” antes de volverse a abrir **Fig. 2** (Shafer *et al.*, 2005).

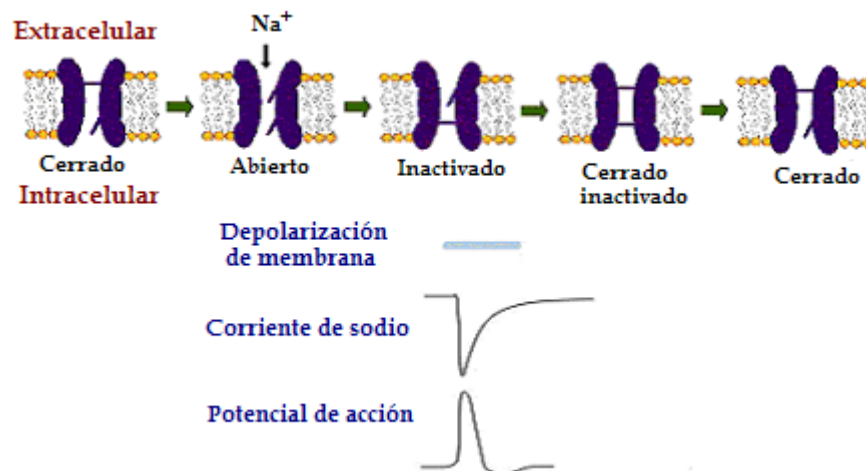


Figura 2. Esquema de los VSSC, depolarización de membrana, corriente de sodio y potencial de acción. Modificado de Shafer *et al.*, 2005.

Los piretroides tipo I modifican la apertura de los VSSC, se prolonga hasta después de terminada la depolarización produciendo una corriente de arrastre; esto termina depolarizando la membrana sobre el umbral de generación de potencial, lo que provoca una serie de potenciales de acción. En cambio en los piretroides Tipo II producen una mayor depolarización, disminuyendo el gradiente electroquímico de sodio y la amplitud del potencial de acción, sosteniendo abiertos los VSSC por más tiempo, al punto que el potencial de membrana se depolariza cuando la generación del potencial de acción no es posible **Fig. 3** (Shafer *et al.*, 2005).

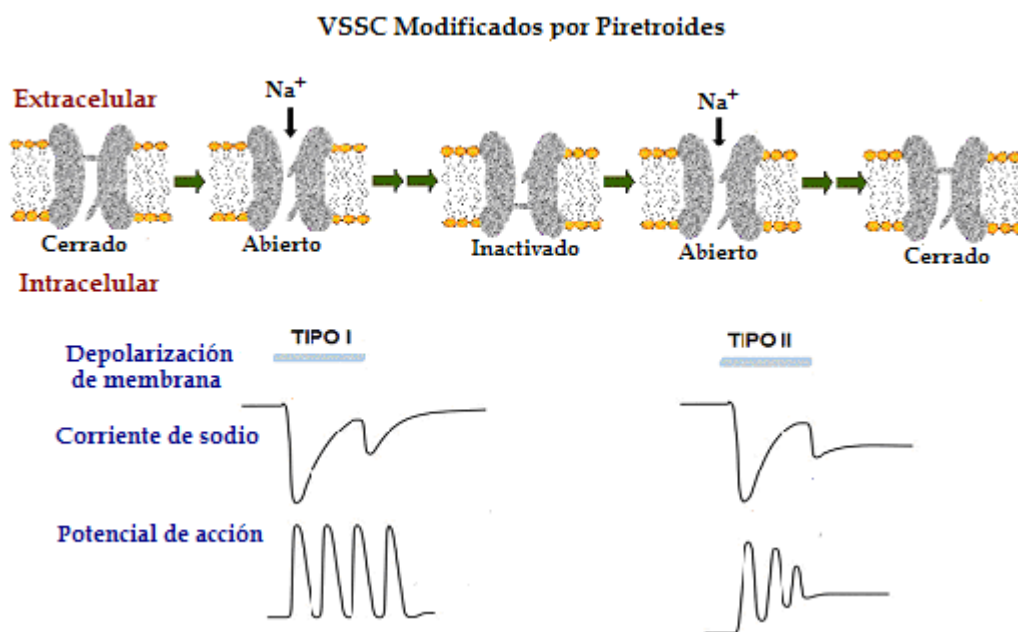


Figura 3. Esquema de los VSSC modificados por los piretroides (tipo I y tipo II), mostrando sus efectos en: la depolarización de membrana, corriente de sodio y potencial de acción. Modificado de Shafer *et al.*, 2005.

Estos mecanismos de acción hacen que los pesticidas sean sustancias peligrosas para la vida de las especies. Los seres vivos tienen vías metabólicas y procesos bioquímicos que les son comunes o por lo menos equivalentes y es precisamente en estos que la mayoría de los pesticidas actúan (Ciudad, 1995).

Sin embargo, los piretroides muestran mayor toxicidad selectiva en insectos. En las terminaciones nerviosas, la potencia tóxica aumenta con la disminución de la temperatura. De este modo, considerando en proporción el grado de sensibilidad del nervio en los mamíferos y los insectos, la menor temperatura de estos últimos los hace más sensibles a la acción del pesticida. Además, si se considera el menor tamaño de los insectos, tienen menos posibilidades de metabolizar los insecticidas antes de que alcancen los sitios blanco (Zlotkin, 1999).

Por el contrario, en los mamíferos el efecto tóxico agudo y la acumulación en la grasa corporal son relativamente bajos, debido a su rápida biotransformación y eliminación en forma de metabolitos solubles en agua, principalmente vía renal (Casida *et al.*, 1983; Cremlyn, 1991; Perger y Szadkowsky, 1994; Luty *et al.*, 1998).

En mamíferos, el efecto adverso de los piretroides tipo II más comunmente descrito es la parestesia por exposición dérmica, cuyos síntomas característicos son sensaciones de ardor, prurito y entumecimiento, lo que es considerado como un efecto agudo local (Wilks, 2000). Sin embargo, estos piretroides también pueden producir signos sistémicos por intoxicación aguda afectando al sistema nervioso central produciendo mareos, dolor de cabeza, disturbios de conciencia, fasciculaciones musculares, ataques convulsivos e incluso, un estado de coma (Perger y Szadkowsky, 1994). A pesar de que los piretroides se han usado intensamente y por largo tiempo, pocos problemas serios habían sido reportados, sólo recientemente se ha informado de enfermedades crónicas severas causadas por piretroides (Perger y Szadkowsky, 1994). En el caso del ser humano, la dosis letal de piretroide es de 50 a 100 gramos pv (Lauwerys, 1994).

La evidencia experimental sugiere que *in vitro* algunos piretroides tienen afinidad por los receptores de andrógenos de los fibroblastos de la piel humana como también puede unirse a la globulina ligante de hormonas sexuales (SHBG) (Eil y Nisula, 1989).

Según Brody y Loriaux (2003), los resultados en el análisis de fibroblastos demuestran que el piretroide fenotrin (causante de una epidemia de ginecomastia en refugiados Haitianos) se une al receptor humano de andrógeno *in vitro*. *In vivo*, el Fenotrin se comporta como un antiandrógeno al inhibir el efecto de testosterona en la próstata en ratas sexualmente inmaduras.

Algunos investigadores han demostrado el potencial de los piretroides para actuar como agonistas o antagonistas de hormonas esteroidales, desconociéndose aún el mecanismo de acción (Garey y Wolff, 1998; Kim *et al.*, 2004). Sin embargo, los resultados de los experimentos *in vitro*, en algunos casos han sido contradictorios.

Go *et al.* (1999), utilizaron la línea celular MCF-7 del carcinoma mamario, caracterizado por su sensibilidad a estrógenos. En este modelo, la proliferación celular fue utilizada para probar estrogenicidad de los piretroides Sumitrina, Fenvalerato, D- trans alletrina y Permetrina. Los piretroides Sumitrina y Fenvalerato indujeron la proliferación de células MCF-7 de manera dosis dependiente.

Estudios en líneas celulares de endometriosis Ishikawa Var-I y de cáncer mamario T47D, productoras de fosfatasa alcalina como indicador de actividad hormonal, demostraron que los piretroides Fenvalerato y Sumitrina tienen actividad estrogénica, y que los piretroides Fenvalerato y D- trans Alletrina tienen actividad antiprogestágena (Garey y Wolff, 1998). Sin embargo, en otro estudio de siete piretroides, incluido CP, coinciden en la estrogenicidad del piretroide Sumitrina. Sin embargo, Fenvalerato, Bioaletrina y Permetrina mostraron

actividad antiestrogénica (Kim *et al.*, 2004). Por el contrario, Saito *et al.*, (2000) estudiaron en el receptor de estrógenos humano α (*hER* α) los piretroides D-Trans alletrina, CP, Empetrina, Fenvalerato, Imiprotrina, Permetrina, Fenotrina y Praletrina, describiendo que ninguno de los piretroides considerados en el ensayo presentó actividad estrogénica o antiestrogénica.

Cipermetrina

La cipermetrina (CP) es un piretroide de amplio espectro activo contra plagas de lepidóptera, coleóptero, hemíptera, homóptera y otras clases de insectos (Thomson, 1998).

La CP² es un éster del ácido dihalovinil-ciclopropano, con un grupo sustituyente α -ciano perteneciendo a los piretroides tipo II **Fig. 4a** (Elliott, 1976). La agencia de protección del medio ambiente de Estados Unidos (EPA), considera a CP como prototipo para determinar los riesgos de otros piretroides (Zahodiakin, 1999).

Se le cataloga como moderadamente peligrosa, clase II de riesgo según la OMS y clase III de riesgo para el Ministerio de Salud de Chile, ambas clasificaciones basada según dosis letal 50 (DL₅₀) administrada a ratas vía dérmica y oral. La DL₅₀ para ratón vía intraperitoneal es de 485 mg/kg peso vivo solubilizado en aceite de maíz (W.H.O. y F.A.O., 1989; Vallebuona, 2003).

La detoxificación de CP en mamíferos, está implicado el sistema microsómico de oxidasas de función mixta que por hidrólisis del éster central origina dos metabolitos principales: ácido fenoxibenzoico y ácido ciclopropano carboxílico, que luego de oxidaciones e hidroxilaciones son eliminados como

² Estructura química de Cipermetrina: 3-(2,2-dichloroethenyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylic acid cyano(3-phenoxyphenyl)-methyl ester. α - cyano-3-phenoxybenzyl-(\pm)- cis, trans- 3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane-carboxylate. C₂₂H₁₉Cl₂NO₃ n° REGISTRO CAS: 52315-07-8 (W.H.O. y F.A.O., 1989).

alcoholes o fenoles que se conjugan con glicina, sulfatos y ácido glucurónico **Fig. 4b** (Casida *et al.*, 1983; Perger y Szadkowsky, 1994; Shan *et al.*, 2004).

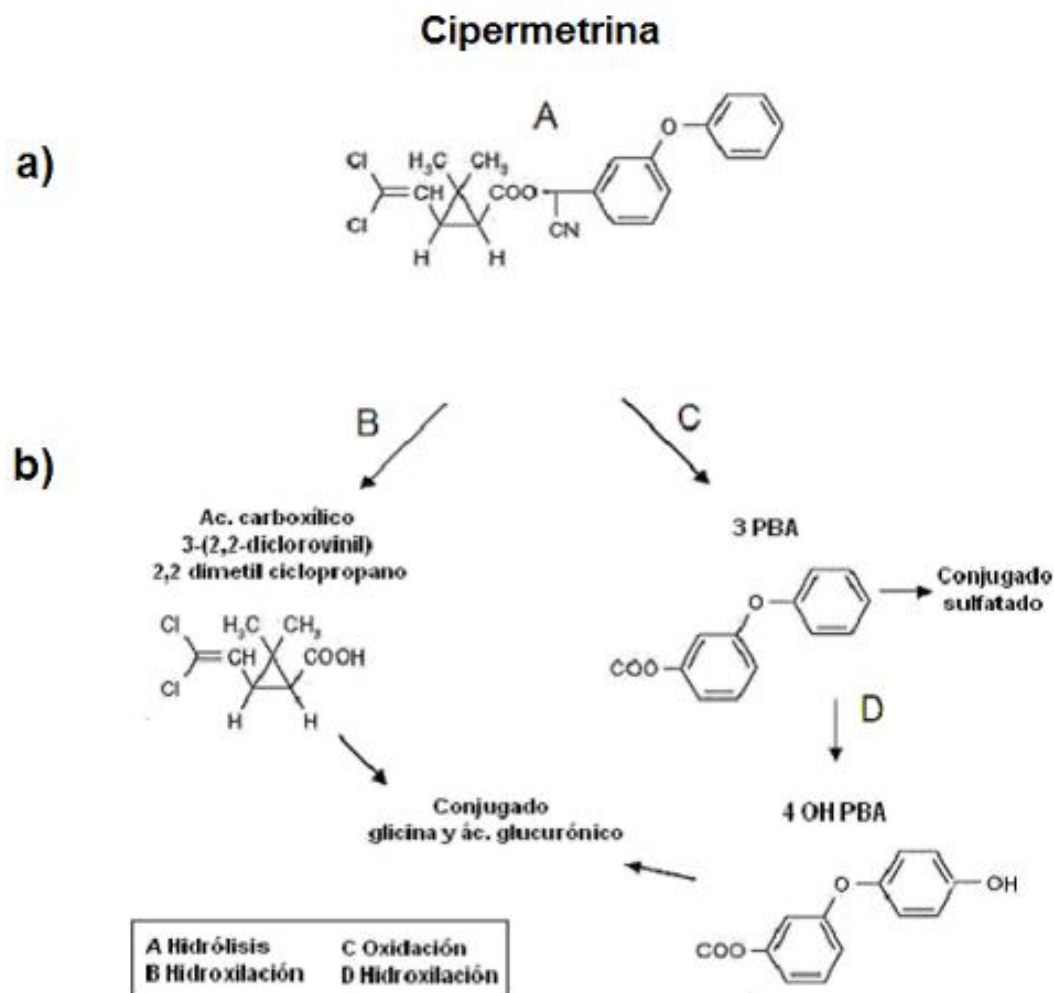


Figura 4. a) Molécula de cipermetrina **b)** metabolización de cipermetrina. (3PBA): Acido 3-fenoxibenzoico. (4OHPBA): Acido 3-(4-hidroxi)-fenoxibenzoico.

Estudios en ratas han demostrado que CP es metabolizada rápidamente, eliminándose más del 99% en pocas horas. El 1% restante comienza a ser almacenado en la grasa corporal. Esta porción es eliminada lentamente, con un

periodo de vida media de 18 días para el cis-isómero y 3.4 días para el trans-isómero (Elbetieha *et al.*, 2001).

Se postula, que los agentes químicos pueden producir potencialmente daño en la espermatogénesis en algunas de sus etapas, desde la proliferación celular de las espermatogonias hasta los espermatozoides maduros, pudiendose observar efectos citotóxicos y genotóxicos (Brinkworth y Handelsman, 1997).

La estabilidad de la información genética es de vital importancia en el normal funcionamiento y reproducción de todos los organismos vivos. En especies heterogaméticas esta estabilidad es mantenida en las células somáticas, pero en particular en las células germinales (Baarends *et al.*, 2001). Existe información acerca de las alteraciones que pueden ejercer CP sobre el material genético. Bhunya y Pati (1988), demostraron los efectos genotóxicos de CP al administrar vía intraperitoneal y subcutánea en ratones, y observaron anomalías en los espermatozoides. Otros estudios mencionan que CP induce en ratones aberraciones cromosómicas tales como, ruptura de cromátidas y cromosomas, fragmentación, tetraploidía, y aumento de metafases con aberraciones, como también un aumento de la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (SCE)³ en bazo y médula (Amer *et al.*, 1993). En otros estudios recientes, se ha demostrado que CP interactúa con el ADN, según el análisis de SCE, indicando un efecto mutagénico potencial (Chauhan *et al.* 1997; Giri *et al.*, 2003).

³ Sister chromatid exchange (SCE) es un indicador citogénético de riesgo genotóxico a productos químicos. Detecta el intercambio de ADN en cromosomas en metafase entre los productos de replica en loci homólogos (Chauhan *et al.*, 1997).

En relación a los efectos de CP sobre el sistema reproductor, la información es contradictoria. Por una parte, el análisis en ratones de dominantes letales⁴ no demostró relación entre dosis utilizadas y reducción en número de implantaciones o muertes fetales, pues no aparecieron daños histológicos testiculares ni epididimarios. En ratas, hasta la tercera generación siguiente a la administración de CP (hasta 500 mg/kg vía oral) no se observaron efectos nocivos sobre la conducta reproductiva, la fertilidad, la gestación, la viabilidad o la lactancia de las hembras cruzadas con los machos experimentales (W.H.O. y F.A.O., 1989).

Mientras que al administrar CP en ratones machos vía oral por 65 días, se observó una disminución en el recuento de espermatozoides testiculares y epididimarios, niveles plasmáticos de hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH) y testosterona significativamente reducidos, además de tasas de implantación embrionaria y viabilidad fetal reducidas en cruza con hembras normales (Elbetieha *et al.*, 2001). Resultados similares observaron al dosificar cipermetrina vía oral en ratas (EL khalek *et al.*, 1999).

Estudios en humanos y animales apoyan la idea que los pesticidas inducen estrés oxidativo como un mecanismo de acción citotóxico en el organismo. Los radicales libres son átomos o moléculas que contienen unos o más electrones desapareados, que son parte del metabolismo oxidativo (Abdollahi *et al.*, 2004). El daño causado por estos oxidantes a nivel celular es atenuado por enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (Gabbianelli *et al.*, 2002). Estudios en ratas tratadas con alfa cipermetrina, demostraron una disminución de las enzimas CAT y SOD, como

⁴ Test indicador de genotoxicidad, mediante los cambios genéticos inducidos de manera dominante que producen la muerte del cigoto, por ejemplo en mamíferos, la reducción en el tamaño de la camada, midiendo y contando el número de implantes que sobreviven (Generoso, 1994).

también alteraciones morfohistológicas en diversos órganos, incluidos los testículos (Manna *et al.*, 2004)

Gónada masculina

Los testículos se encuentran rodeados por la túnica albugínea, que en su superficie posterior forma el mediastino testicular, por donde penetran los vasos sanguíneos y salen los conductos eferentes (Fawcett y Jensch, 1999). Desde el mediastino se irradian septos testiculares, que dividen al parénquima en compartimientos piramidales denominados lobulillos testiculares, que contienen de uno a cuatro túbulos seminíferos de trayectoria flexuosa **Fig. 5a** (Wrobel, 1999).

Los túbulos seminíferos son estructuras cilíndricas, rodeadas por un compartimiento intersticial formado por tejido conectivo laxo muy vascularizado en el que se encuentran vasos sanguíneos y linfáticos, además, fibroblastos, mastocitos, macrófagos y células de Leydig que representan el componente endocrino **Fig. 5b** (Junqueira y Carneiro, 2005). Cada tubo seminífero está rodeado por células mioides peritubulares, que corresponden a los elementos contráctiles que generan ondas peristálticas a lo largo de los túbulos (Schlatt, 1997). Los túbulos están revestidos por el epitelio seminífero, formado por las células de Sertoli en contacto con la lámina basal y las células germinales **Fig. 5c** (Fawcett y Jensch, 1999). Durante la proliferación y diferenciación las células espermatogénicas se desplazan lentamente a lo largo de las caras laterales de las células de Sertoli, hacia la superficie libre del epitelio (Geneser, 2000).

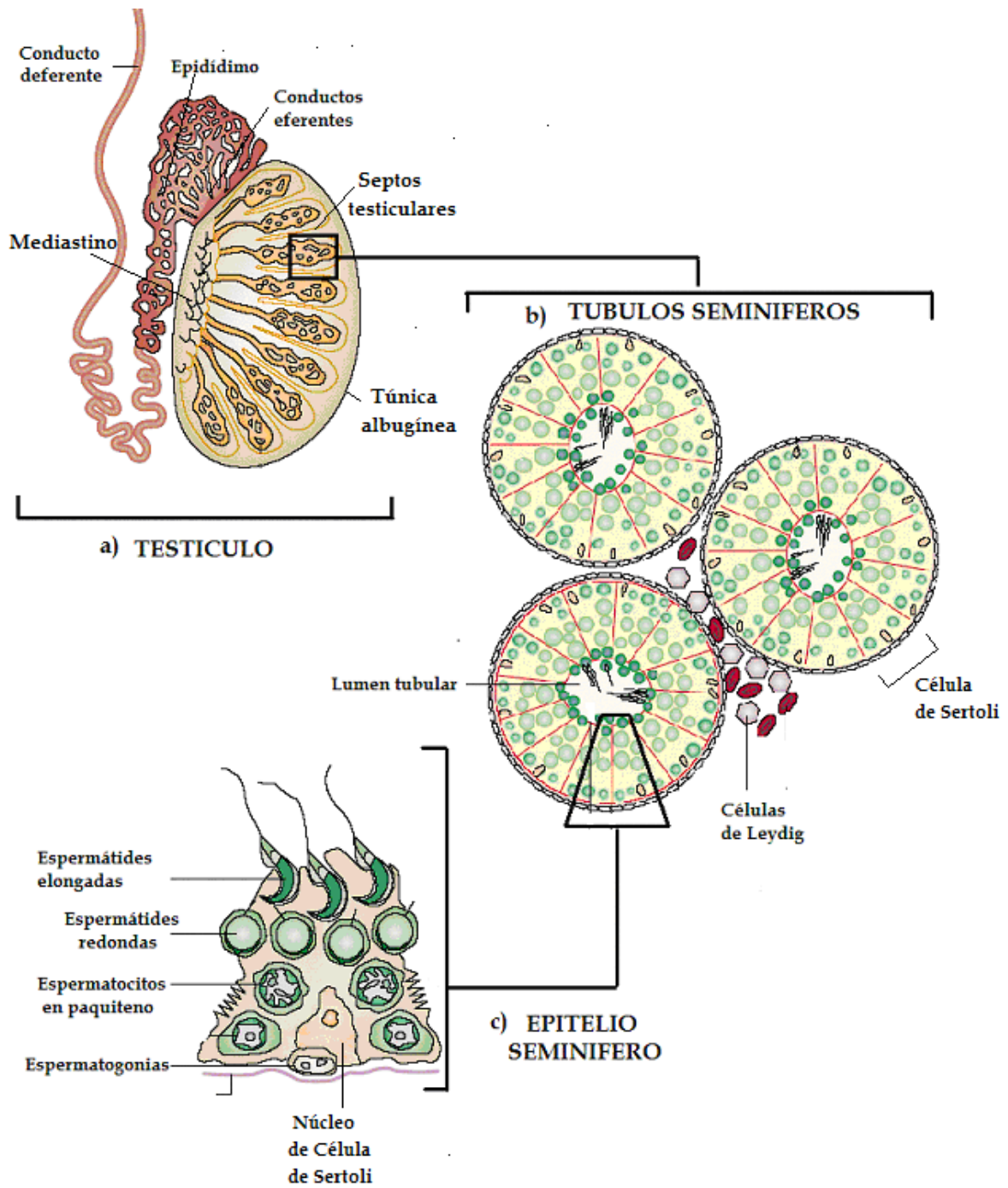


Figura 5. a) Esquema de testículo (corte sagital), b) túbulos seminíferos corte transversal y c) detalle del epitelio seminífero. Modificado de Cooke y Saunders, 2002.

Espermatogénesis

La espermatogénesis es la secuencia citológica de eventos que da como resultado la formación de espermatozoides. Este proceso ocurre al interior de los túbulos seminíferos e involucra la renovación y expansión celular por proliferación mitótica, la reducción del número de cromosomas por división meiótica y la espermiogénesis o diferenciación celular de espermátidas en espermatozoides (de Kretser y Kerr, 1988).

En mamíferos, la espermatogénesis es cíclica en cualquier área del túbulo seminífero una nueva generación de células germinales comienza a diferenciarse antes de que la generación pasada haya terminado su desarrollo. De este modo, a intervalos definidos y periódicos, nuevas generaciones comienzan su proceso de diferenciación (Roosen- Runge, 1962).

En un corte transversal del túbulo seminífero, se observan células de la línea germinal en diferentes estados evolutivos asociados, de manera que siempre va a existir una determinada combinación de tipos celulares denominados **estadios**, según el método propuesto por Leblond y Clermont (1952), considerando la evolución del acrosoma y la morfología de los núcleos con el método histoquímico de Hematoxilina-PAS. Todos los estadios en conjunto constituyen un **ciclo** del epitelio seminífero, que consiste en el conjunto de cambios que ocurre entre dos apariciones sucesivas de la misma asociación celular en un área determinada del túbulo. Para cada especie animal el estadio ocupa un segmento del túbulo seminífero y limita con un segmento superior e inferior que contiene otros estadios del ciclo (Geneser, 2000). La secuencia del segmento tubular que incluye todas las asociaciones distintas o estadios en orden numérico se denomina **onda** del epitelio seminífero (Roosen-Runge, 1962).

En el ratón, un ciclo de la espermatogénesis se compone de 12 asociaciones celulares o estadios, que transcurren en 8,6 días. La

espermatogénesis está cualitativamente completa cuando son depositados en el lumen tubular los espermatozoides generados a partir de una espermatogonia con una duración de 34,4 días, correspondiendo a cuatro ciclos **Fig. 6** (Oakberg, 1956). En este tiempo, la fase de proliferación de espermatogonias comprende 6 días, la fase meiótica 14 días y la espermiogénesis alrededor de 9 días (Adler, 2000).

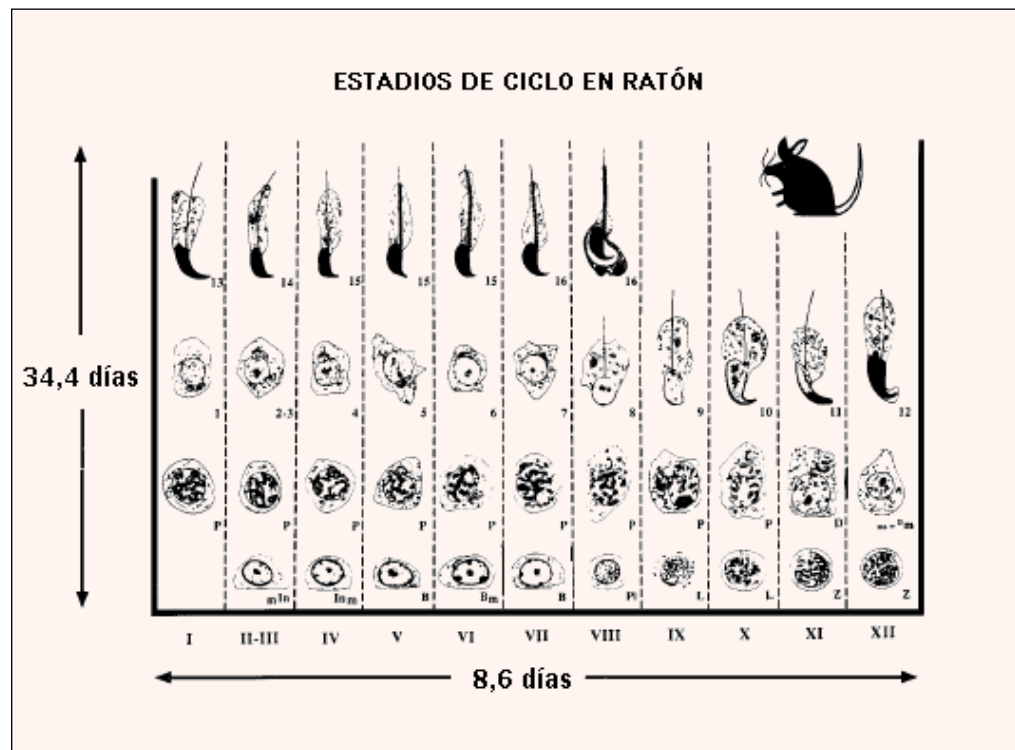


Figura 6. Esquema de las doce asociaciones que constituyen un ciclo de la espermatogénesis. Modificado de França *et al.*, 1998.

Los conceptos de estadio, ciclo y onda del epitelio seminífero han permitido analizar cuantitativamente y con gran detalle los diferentes tipos celulares, sirviendo como una herramienta útil para investigar los factores que influyen y regulan el proceso de la espermatogénesis (Roosen-Runge, 1962).

Regulación de la espermatogénesis

La hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) es un decapeptido que se sintetiza en el hipotálamo y se libera en forma pulsátil hacia el sistema porta hipotalámico-hipofisiario, en la adenohipófisis se une a los receptores gonadotrofos para estimular la biosíntesis y secreción de las glicoproteínas: hormona foliculo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) (Amory y Bremner, 2003; Keung y Leung, 2005). Estas actúan directamente en el testículo, la LH estimula la síntesis de testosterona (T) en las células de Leydig, mientras que la FSH regula la espermatogénesis vía células de Sertoli (Guyton y Hall, 2001; Amory y Bremner, 2003).

La T actúa vía receptores de andrógenos en las células de Sertoli, de Leydig y peritubulares (Guyton y Hall, 2001).

La FSH induce a las células de Sertoli para que sinteticen y liberen una proteína ligante de andrógeno ABP, que se une a la T, de este modo mantiene en los tubulos seminíferos altas concentraciones de esta hormona necesaria para iniciar y mantener la espermatogénesis (Gartner y Hiatt, 2002).

La T para llegar a otros tejidos se une a albúminas plasmáticas o a una globulina β denominada globulina ligante de hormonas sexuales (SBGH), de esta manera circula por la sangre (Guyton y Hall, 2001).

Celularidad del epitelio germinal

Célula de Sertoli

La célula de Sertoli está siempre presente en el ciclo espermatogénico. Se le atribuyen dos funciones principales: coordinar la proliferación y el desarrollo de las células germinales, determinando la cantidad de espermatozoides del testículo adulto. Se ha demostrado, que bajo condiciones normales como patológicas, el número de células de Sertoli se correlaciona con la producción de espermatozoides (de Franca *et al.*, 1995).

En el túbulo seminífero postpuberal las células de Sertoli se presentan como elementos alargados, que a modo de pilares se apoyan sobre la lámina basal y sus extremos apicales alcanzan la luz tubular, de manera que una célula de Sertoli establece contacto con unas cinco células de Sertoli vecinas y con unas cincuenta células germinales que se encuentran en distintas etapas de desarrollo.

En preparados para microscopía óptica con hematoxilina-PAS no se distingue su citoplasma, pero su núcleo se detecta con facilidad (Geneser, 2000); son polimorfos, de ubicación basal sobre la lámina propia, lo que en algunas especies como el ratón y la rata es más evidente (Russell y Griswold, 1993); en cortes transversales suelen aparecer de contorno triangular, con cromatina laxa distribuida desigualmente y el nucleólo contrasta por su intensa coloración roja (Bacha y Wood, 1991).

Una característica de la célula de Sertoli, en comparación con las células germinales, es su elevada resistencia ante sustancias tóxicas, radiación y otras noxas (Nistal y Paniagua, 1984). Motivo por el cual se utilizó como factor de corrección para estandarizar los resultados de los recuentos de las diferentes poblaciones celulares de la línea espermatogénica (Bustos- Obregón, 1970).

Células de la línea germinal investigadas

Los tipos celulares de la línea germinal contabilizados fueron identificados en base a su morfología y por la diferente ubicación espacial en el epitelio seminífero **Fig. 7 y 8**.

La espermatogonias **tipo A** son de núcleo pálido ovoide con su eje mayor orientando en paralelo a la membrana basal del túbulo. Su cromatina es heterogénea. Experimentan mitosis, dando origen a las espermatogonias **tipo Intermedias** (presentes sólo en roedores), células con un núcleo oval y la cromatina se concentra alrededor de la corteza de la membrana nuclear (Setchell, 1978), luego se dividen por mitosis nuevamente generando las espermatogonias **tipo B**, en las cuales, las acumulaciones de cromatina son aún más condensadas y sus núcleos más pequeños y esféricos que en las tipo A e Intermedias (Setchell, 1978).

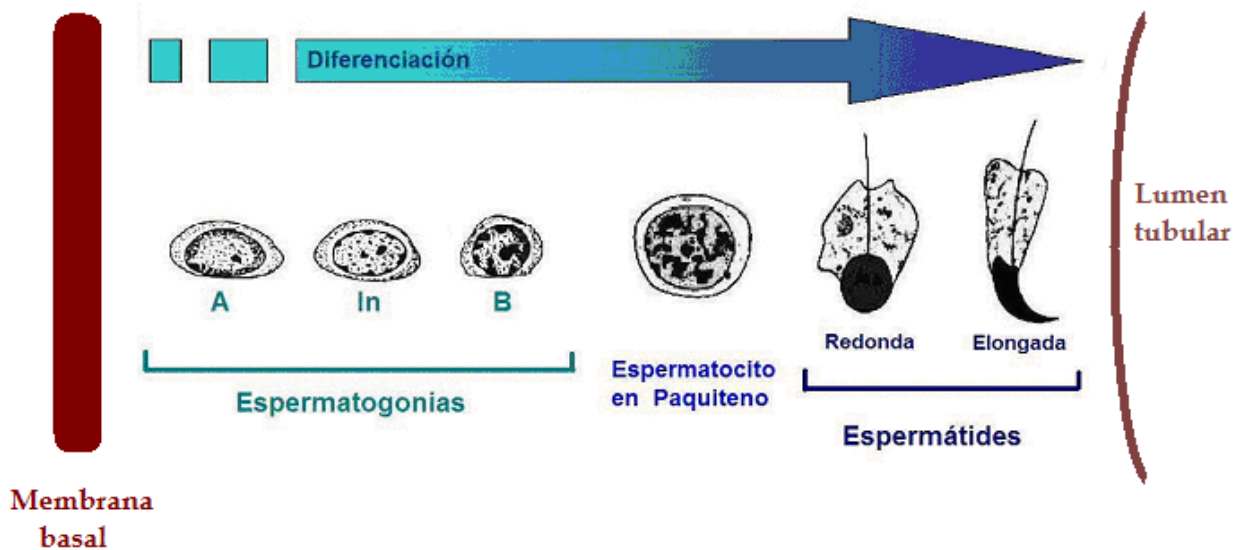


Figura 7. Esquema de los tipos celulares de la línea germinal que se tipificaron y se contabilizaron en base a su morfología por microscopía óptica: espermatogonias (tipos A, In, Intermedias y B), espermatocitos primarios en fase de paquiteno y espermátides (redondas y elongadas). No se consideran aquellas células que no fueron objeto de estudio.

Los espermátocitos primarios son las células que experimentan meiosis, debido a que la profase I es muy extensa, comprende 4 etapas (Leptoteno, Cigoteno, Paquiteno y Diacinesis), la mayoría de los preparados histológicos se observan en esta fase (Junqueira y Carneiro, 2005). Sin embargo en la fase de **paquiteno** los cromosomas son gruesos y cortos, permitiendo la fácil identificación de éstas células, que ocupan una ubicación intermedia en el epitelio seminífero entre las espermatogonias y las espermátides (Wrobel, 1999; Gartner y Hiatt, 2002).

Las **espermátides redondas** son las células provenientes de la segunda división meiótica, inicialmente su núcleo es de forma redondeada y con una cantidad moderada de citoplasma (Setchell, 1978). Mediante un proceso denominado espermiogénesis a partir de las espermátides redondas se forman las **espermátides elongadas**, produciéndose los siguientes cambios: condensación de la cromatina, elongación del núcleo, eliminación del citoplasma y la formación del flagelo (O'Donnell *et al.*, 2001).

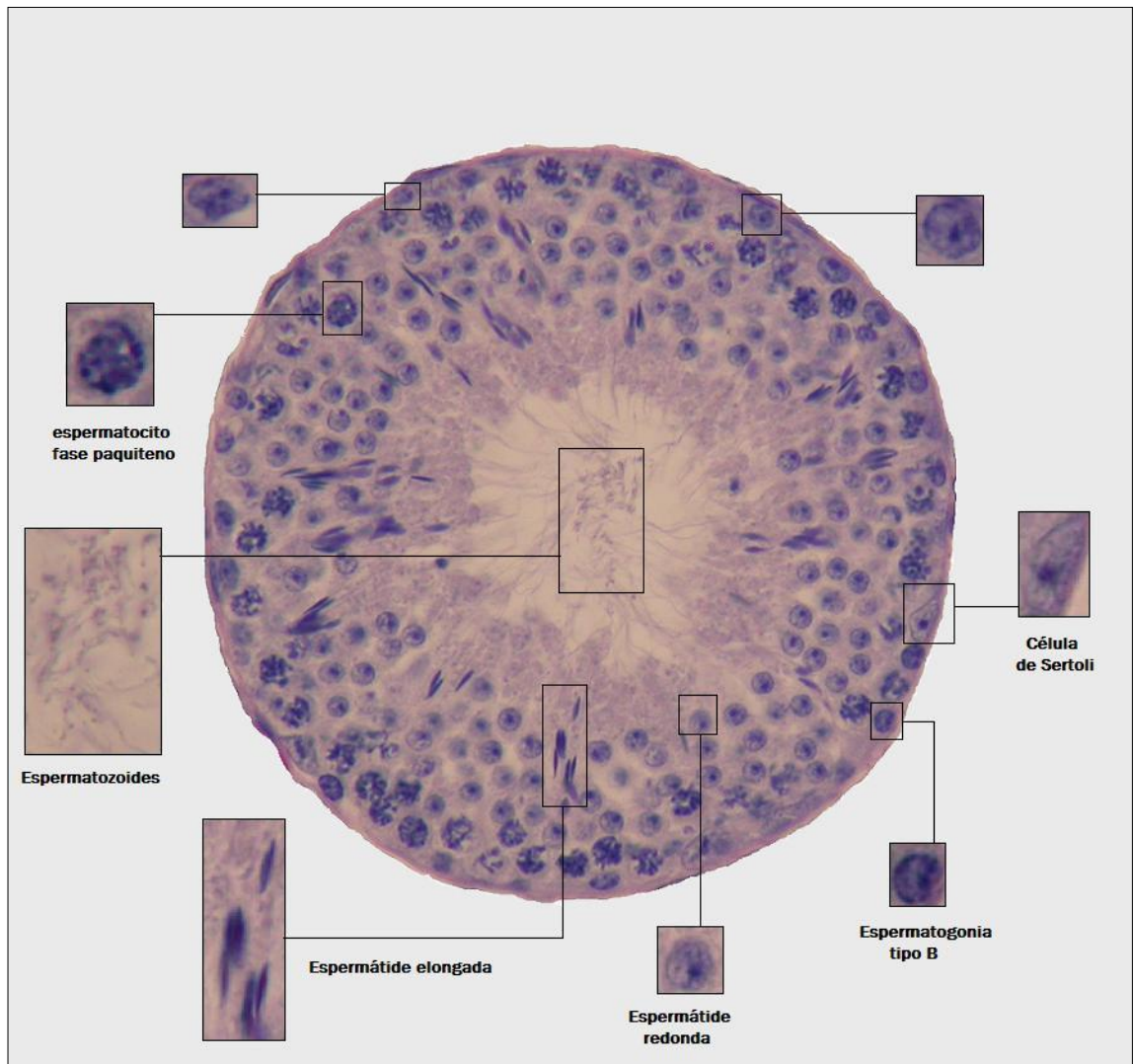


Figura 8. Microfotografía de un corte transversal de túbulo seminífero de ratón. En los recuadros se amplifican los distintos tipos celulares estudiados, según estado de diferenciación. H-PAS, 1000x.

Uniones celulares del epitelio germinal

En el epitelio seminífero es posible encontrar uniones entre las células que tienen un rol importante en la mantención de la organización de los tejidos: a) **uniones de comunicación**, b) **uniones de adhesión** que consisten en cuatro tipos de las cuales dos son formadas por filamentos de actina: uniones célula-célula y contactos focales entre célula y matriz, y las otras dos por filamentos intermedios: desmosomas que unen células entre sí y hemidesmosomas que unen las células a la matriz y, c) **uniones de oclusión**, son importante ya que en la pubertad, las fibrillas discontinuas de las uniones oclusivas se vuelven continuas y se organizan en una zónula oclusiva sellando la ruta paracelular entre células, de este modo participan en la creación de una barrera selectiva denominada hematotesticular **Fig.9** (Dym y Fawcett, 1970; Mruk y Cheng, 2002; Mruk y Cheng, 2004).

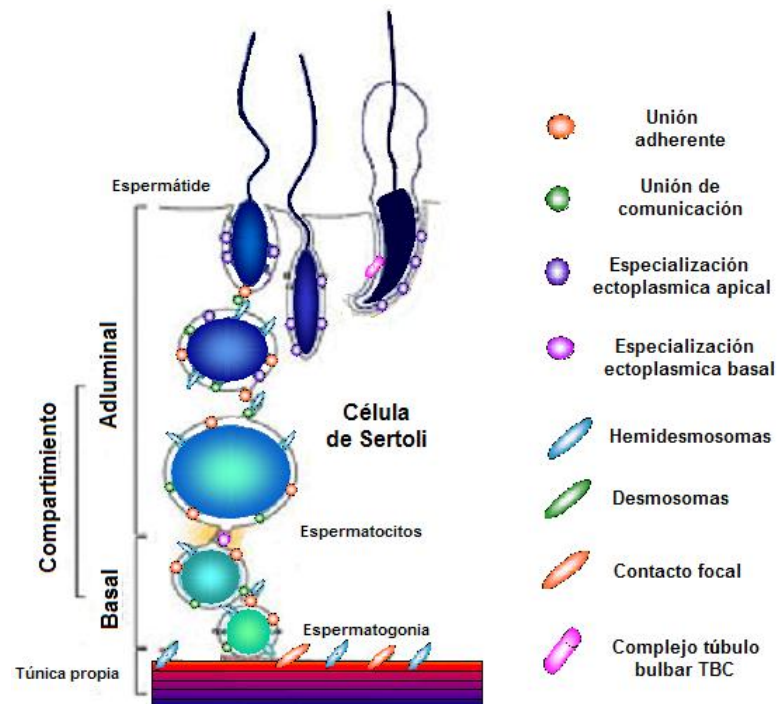


Figura 9. Esquema de las uniones celulares en el epitelio seminífero de ratón. Modificado de Siu y Cheng, 2004.

Una consecuencia topográfica de la formación de esta barrera situada en el tercio basal tubular, es la división del epitelio seminífero en dos compartimientos: uno basal en el que residen espermatogonias, espermatocitos (fases preleptoteno y leptoteno) y un compartimiento adluminal en el cual se encuentran espermatocitos I, II y espermátides en varias etapas de la espermiogénesis **Fig. 10** (Dym y Fawcett, 1970; Mruk y Cheng, 2004). De esta manera protege a las células germinales post-meióticas contra tóxicos exógenos transportados por la sangre testicular y la linfa (Holstein *et al.*, 2003).

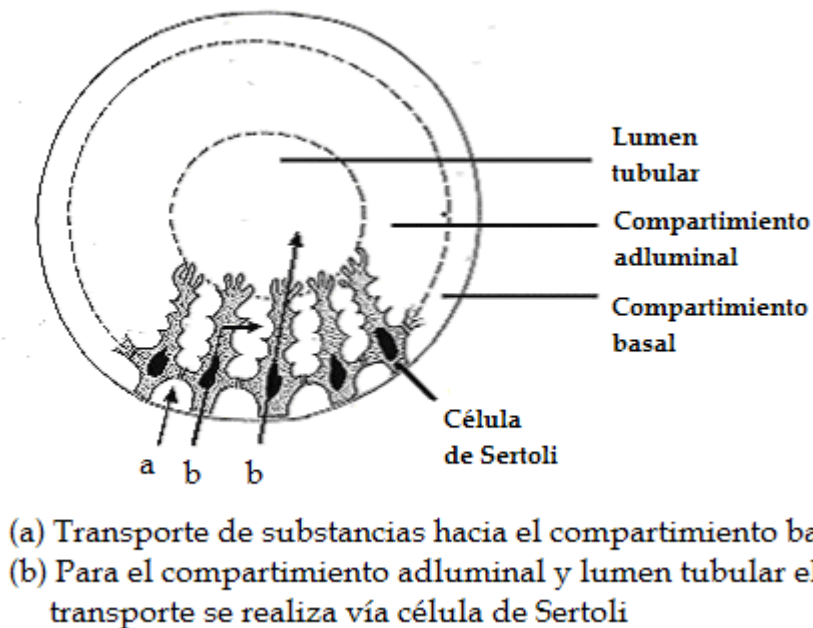


Figura 10. Esquema de los compartimientos formados por la barrera hematotesticular. Las flechas indican la dirección del transporte de sustancias (modificado de Holstein *et al.*, 2003).

Consecuente con lo anteriormente descrito, se considera de interés el análisis de los efectos respecto de la acción de un insecticida considerado como moderadamente tóxico, sobre la fertilidad masculina representada por la morfología, proliferación y celularidad de su epitelio seminífero.

HIPOTESIS

La espermatogénesis en ratón adulto CF-1 es alterada por la exposición al pesticida piretroide cipermetrina, administrado en dosis única, produciendo cambios en la morfología, la celularidad y en la proliferación del epitelio germinal.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar los efectos tóxicos del insecticida cipermetrina sobre la citología testicular de ratón macho adulto.

Objetivos Específicos

- Cuantificar la proliferación espermatogonial en ratón tratado con cipermetrina en dosis única.
- Evaluar las alteraciones morfológicas de los túbulos seminíferos de ratón tratado con cipermetrina en dosis única.
- Cuantificar los diferentes tipos celulares del epitelio germinal en ratones tratados con dosis única de cipermetrina.

MATERIAL Y METODO

Ubicación

La presente memoria de título se realizó en el Laboratorio de Histoembriología del Programa de Morfología del I.C.B.M. de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Se contó con la infraestructura y el apoyo técnico del laboratorio central de histología, donde se desarrollaron la totalidad de las técnicas histológicas de rutina y especiales. Paralelamente, se utilizó la sala de microscopía óptica del laboratorio de histoembriología.

Material químico

El pesticida utilizado corresponde al piretroide cipermetrina, cuya solución madre se encuentra a una concentración de 92.7%, con una densidad de 1,23 g/L, elaborado en Anasac S.A. Chile.

Material biológico

Se utilizaron 30 ratones machos de la cepa CF1 de 2,5 a 3 meses de edad, con un peso promedio de 30 g. Aproximadamente, mantenidos bajo condiciones estándares de bioterio: fotoperíodo de 12 hrs. luz: 12 hrs. oscuridad, temperatura entre 18 a 22 °C, *pellet* comercial y agua *ad libitum*.

Los animales fueron distribuidos al azar en dos grupos de 15: al grupo control, se les administró 0.2 ml de aceite vegetal y al grupo experimental, se le administró cipermetrina vehiculizada en aceite vegetal a una concentración de $\frac{1}{5}$ de la DL_{50} en un volumen final de 0,2 ml, vía intraperitoneal.

Durante el periodo experimental tres animales de cada grupo fueron anestesiados con ketamina 10% (Ketostop®) vía i.m. y posteriormente sacrificados por dislocación cervical, según el siguiente calendario: 1 día después de la inoculación, luego a intervalos de 8,6 días hasta completar 34,4 días. Al sacrificio y por una incisión retroumbilical en la línea media, se extrajeron las gónadas.

Tabla 1. Calendario de eutanasia.

| Eutanasia Grupos | Tiempo post-tratamiento (días) | | | | |
|---------------------|--------------------------------|-----|------|------|------|
| | 1 | 8,6 | 17,2 | 25,8 | 34,4 |
| Control | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Experimental | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |

Procedimiento histológico

Los testículos obtenidos fueron fijados en una solución de Bouin alcohólico fresco o Dubosq - Brasil. Transcurrida la primera hora de fijación, la muestra fue seccionada en los polos para permitir una rápida perfusión del fijador al tejido, permaneciendo hasta completar un periodo de 8 horas, para luego pasar a una solución de alcohol al 70%.

Posteriormente, los tejidos fueron procesados por técnicas histológicas de rutina: incluidos en parafina (paraplast), permitiendo confeccionar bloques a partir de los que se obtuvieron secciones transversales de tejido gonadal de 5 μm de espesor. La mitad de los cortes fueron montados en portaobjetos previamente tratados con silano al 1%, para muestras destinadas a inmunohistoquímica y la otra mitad en portaobjetos con poli-L-lisina, para tinción hematoxilina- PAS.

a) Reacción histoquímica Hematoxilina- PAS.

Se utilizó el método de histoquímico Hematoxilina- PAS (Acido Peryódico de Schiff), para evidenciar los polisacáridos de la membrana basal del túbulo seminífero, destacando el límite periférico del compartimiento tubular, además esta técnica permite contrastar e identificar los núcleos de las diferentes poblaciones celulares del epitelio seminífero ver Anexo 2 (Lillie, 1965).

b) Técnica de inmunohistoquímica.

Para contabilizar la proliferación celular se utilizó un anticuerpo monoclonal de conejo Ki-67 (clon SP6) Labvision Co. REF RM 9106-R7 Lot 9106R404D, dirigido contra la proteína antígeno, detectable exclusivamente en el núcleo/ nucleolos durante las fases S, G₂, M, G₁ del ciclo celular y ausente en fase G₀ ver Anexo 2 y 3 (Gerdes et al., 1984).

ANALISIS DE RESULTADOS

Para cada testículo se contabilizó un mínimo de 50 túbulos seminíferos utilizando un microscopio óptico; se tipificaron las células según morfología para luego contabilizar el número de células: de Sertoli, espermatogonias (A, In, B) espermatocitos en fase de paquiteno, espermatídes (redondas y elongadas).

Una vez cuantificados los tipos celulares del túbulo seminífero, se calcularon las siguientes proporciones:

1.- (Tipos celulares/ células de Sertoli) x 100

2.- (Tipos celulares/ N° total de túbulos) x 100

Las células positivas para la reacción inmunohistoquímica se evidenciaron de color rojo por microscopía óptica con aumento 400x; luego de contabilizarlas se calculó:

Proporción:

1.- (N° de túbulos marcados/ N° total de túbulos) x 100

Fracción de inhibición (Verly *et al.*, 1971):

(valor control - valor experimental)/valor control

En los preparados histológicos también se observó según presencia o ausencia: espermatozoides en el lumen tubular y alteraciones morfológicas (discontinuidad, vacuolización del epitelio seminífero y taponamiento tubular).

Proporción:

1.- (Tipo de alteración morfológica del epitelio)/ N° total de túbulos.

2.- (Espermatozoides en lumen tubular)/N° total de túbulos.

ANALISIS ESTADISTICO

Para validar las diferencias existentes entre el grupo control y el experimental en el recuento de las diferentes poblaciones celulares y la proliferación celular, se utilizó un test de hipótesis paramétrico (t de Student) para comparar dos poblaciones independientes se consideró un nivel de significancia de un 5%.

Las diferencias estadísticas para evaluar la presencia de espermatozoides y las alteraciones morfológicas entre los grupos control y experimental se realizó mediante una prueba para comparar proporciones de dos poblaciones independientes a través del estadístico dado por la distribución normal.

Las pruebas estadísticas fueron procesadas utilizando el software estadístico SPSS versión 11.5 en español.

RESULTADOS

Recuento celular del epitelio seminífero por reacción histoquímica hematoxilina-PAS.

1 día post tratamiento

A las 24 horas postinoculación de CP la proporción tipo celular/célula de Sertoli, mostró una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,01$) entre el grupo control y el experimental para espermátocitos en fase de paquiteno y espermátides redondas.

En la proporción tipo celular/ túbulos totales se presentó una disminución de los tipos celulares en fase de paquiteno y espermátidas elongadas estadísticamente significativa ($p < 0,01$).

8,6 días post tratamiento (primer ciclo espermatogénico)

En la proporción tipo células de Sertoli se evidenció una disminución de las espermatogonias tipo A en relación al grupo control, siendo ésta estadísticamente significativa ($p < 0,01$). Para los demás tipos celulares no existieron diferencias significativas.

En la proporción tipo celular/ túbulos totales entre el grupo control y el experimental se registró una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,01$) para las siguientes poblaciones celulares: espermatogonias tipo A, tipo B y espermátocitos en paquiteno.

17,2 días post tratamiento (segundo ciclo espermatogénico)

Para el segundo ciclo de la espermatogénesis del ratón en la proporción tipo celular/ células de Sertoli, disminuyeron las espermatogonias tipo A y aumentaron las espermatogonias tipo In, diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,03$).

En la proporción tipo celular/túbulos totales disminuyeron las células en fase de paquiteno comparadas con el grupo control, cuya diferencia está validada estadísticamente ($p < 0,03$).

25,8 días post tratamiento (tercer ciclo espermatogénico)

A los 25,8 días posteriores al tratamiento con CP se evidenció en la proporción tipo celular/ células de Sertoli una disminución significativa ($p < 0,01$) de los siguientes tipos celulares: espermatogonias tipo A, células en paquiteno, espermátides redondas y elongadas.

Para la proporción tipo celular/ túbulos totales se establecieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) entre el grupo control y el experimental con disminución de las espermatogonias tipo A, células en paquiteno, espermátides elongadas y aumento de las espermatogonias tipo In.

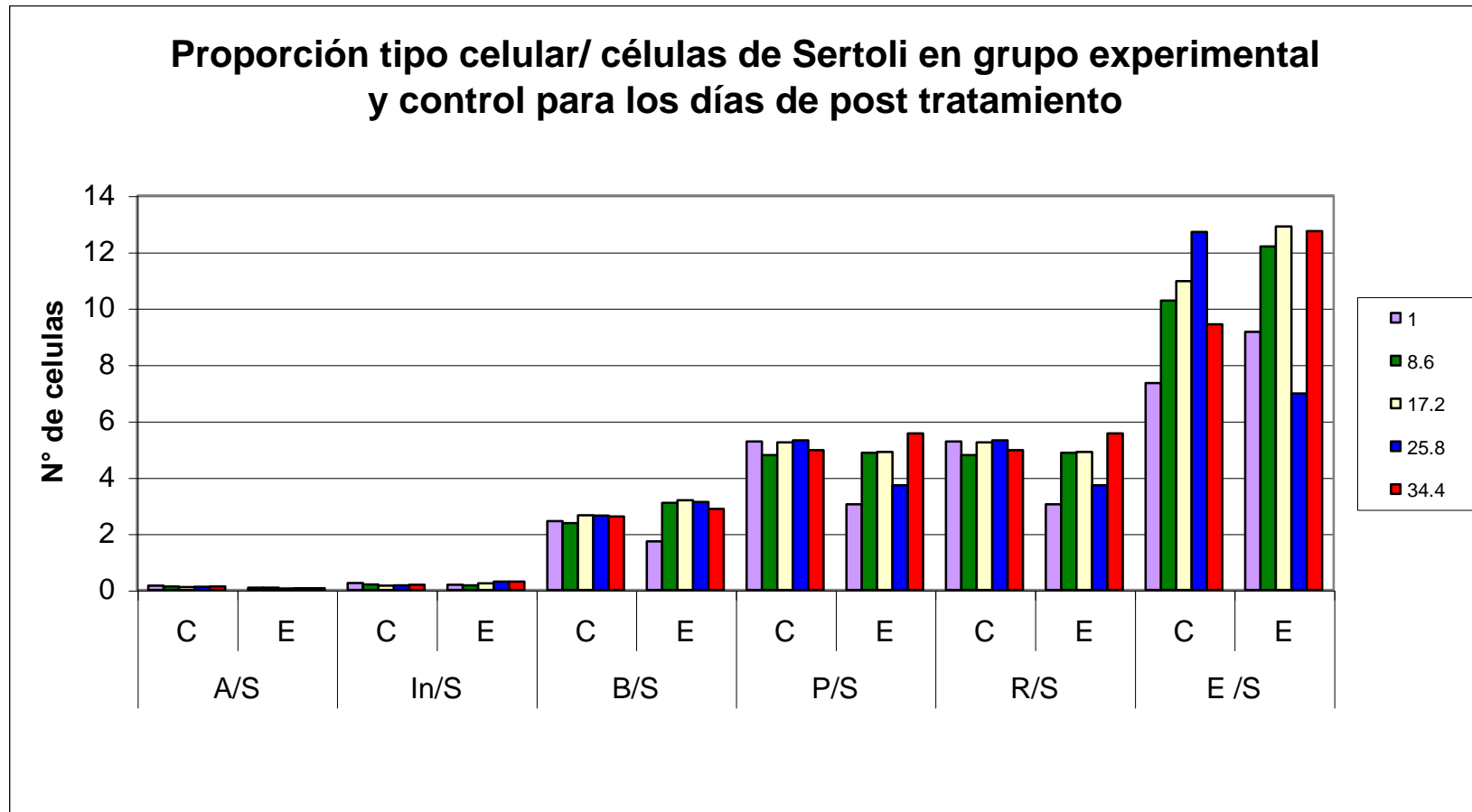
34,4 días post tratamiento (cuarto ciclo espermatogénico)

Transcurridos 34,4 días del inicio del tratamiento con CP, la proporción tipo celular/ célula de Sertoli para las espermatogonias tipo A se observó una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,01$).

Al analizar la proporción tipo celular/túbulos totales, no se registró diferencias estadísticamente significativas para las diferentes poblaciones celulares.

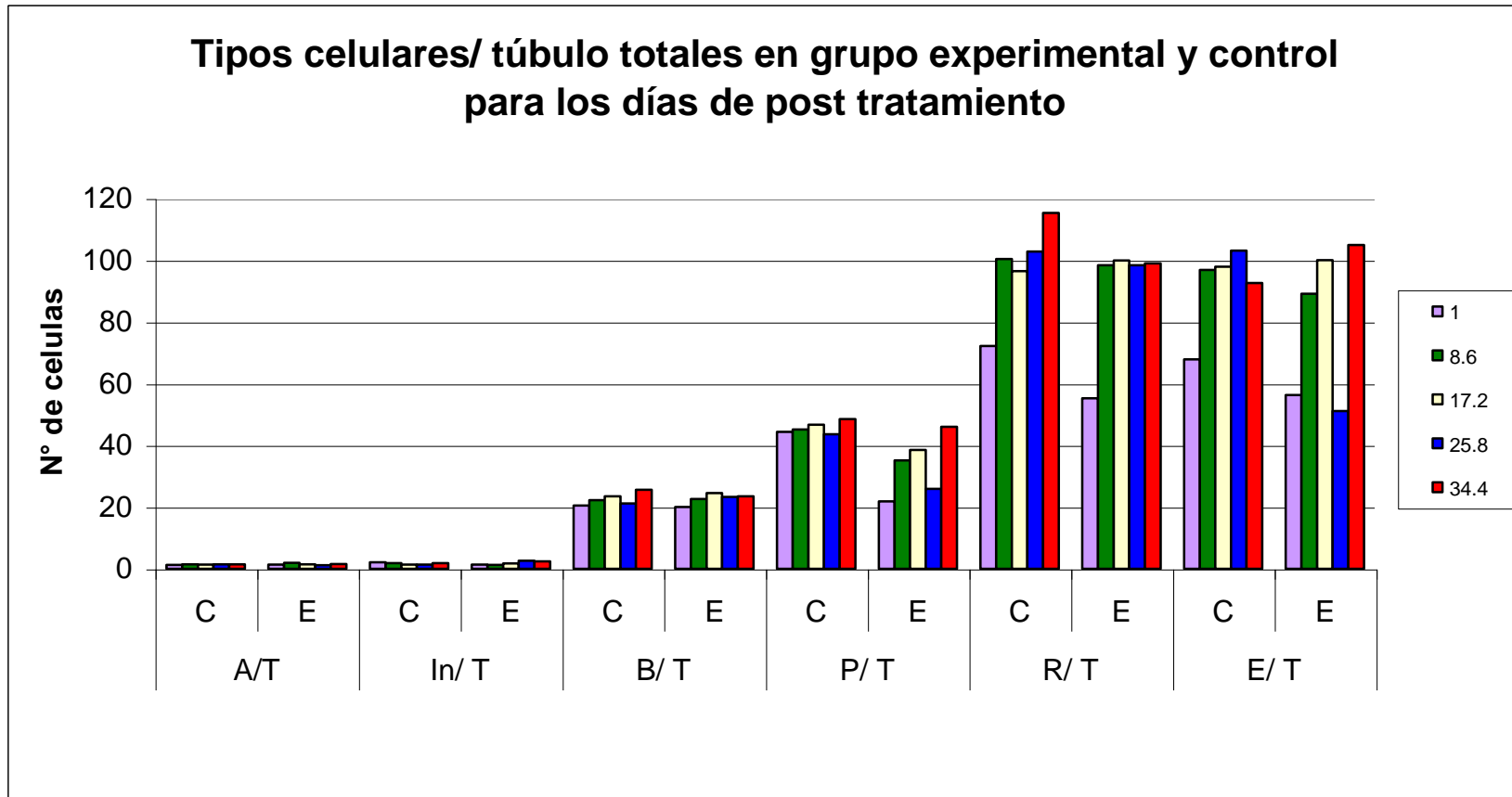
Los resultados anteriores se encuentran especificados en los gráficos 1 y 2.

Gráfico 1. Tipo celular/ célula de Sertoli en grupo experimental y control para los días post tratamiento



A= espermatogonia tipo A; **In**= espermatogonia tipo Intermedia; **B**= espermatogonia tipo B; **P**= Espermatocitos en fase de paquiteno; **R**= Espermatíidas redondas; **E**= Espermatíidas elongadas; **C**= Grupo control; **E**= Grupo experimental.

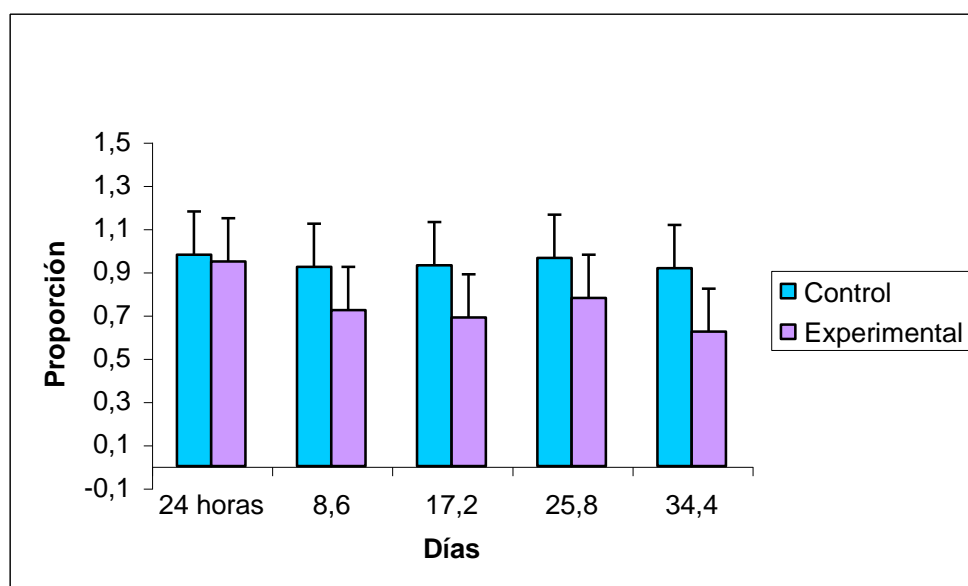
Gráfico 2. Tipo celular/ túbulo totales en grupo experimental y control para los días post tratamiento



A= espermatogonia tipo A; **In**= espermatogonia tipo Intermedia; **B**= espermatogonia tipo B; **P**= Espermatocitos en paquiteno; **R**= Espermatidas redondas; **E**= Espermatidas elongadas; **C**= Grupo control; **E**= Grupo experimental.

La presencia de espermatozoides en lumen tubular por túbulo totales, mostró una disminución en el grupo experimental estadísticamente significativa ($p < 0,01$) a partir del primer ciclo de la espermatogénesis, disminución que se extiende durante los tres ciclos posteriores, siendo más evidente al día 34,4, al completarse la onda espermatogénica (**Gráfico 3**).

Gráfico 3. Presencia de espermatozoides para los grupos control y experimental según días post tratamiento.



Proliferación celular del epitelio seminífero mediante detección del anti Ki 67 con anticuerpo monoclonal de conejo clone SP 6

1 día post inoculación

Transcurridas las primeras 24 horas post inoculación de ratones con CP, se observó una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) de las células inmunomarcadas en el grupo experimental en relación al grupo control.

8,6 días post inoculación (primer ciclo espermatogénico)

Al analizar el primer ciclo espermático se evidenció una marcada disminución del recuento de células inmunomarcadas en el grupo experimental, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) **Fig. 11**.

17, 2 días post inoculación (segundo ciclo espermatogénico)

En el segundo ciclo ambos grupos experimentaron un aumento en el recuento de células inmunomarcadas, en comparación a las mediciones anteriores (1 día y 8,6 días). Sin embargo, en el grupo experimental este aumento fue mayor al recuento de células inmunomarcadas del grupo control, diferencia validada estadísticamente ($p < 0,05$) **Fig. 12**.

25,8 días post inoculación (tercer ciclo espermatogénico)

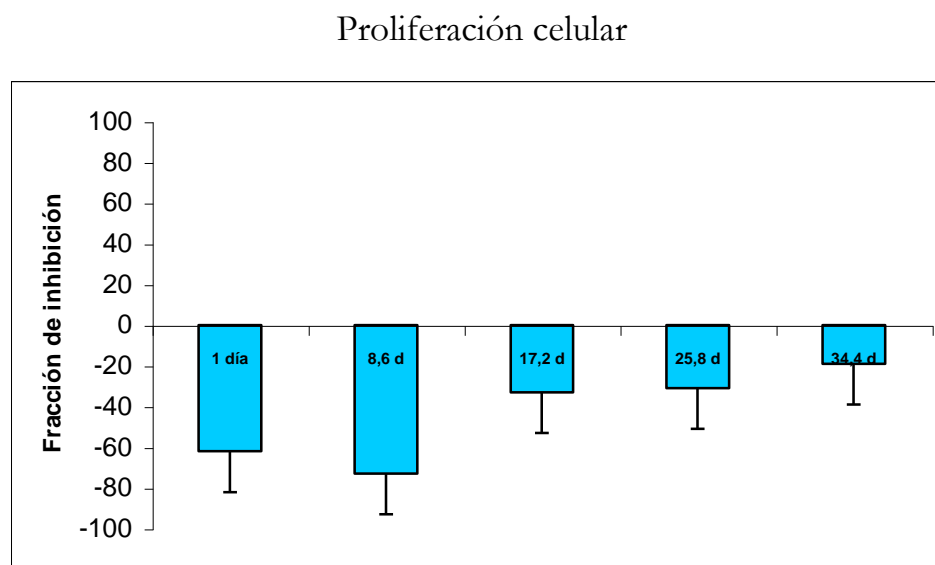
En el tercer ciclo espermatogénico no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las células inmunomarcadas del grupo experimental y las del grupo control.

34,4 días post inoculación (Onda espermática)

A los 34,4 días posteriores a la inoculación con CP se observó una proliferación celular menor en el grupo experimental con respecto al grupo de control, estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Los resultados de la proliferación celular para cada tiempo evaluado en el experimento se presentan en el gráfico 4:

Gráfico 4. Proliferación celular calculado según la fracción de inhibición.



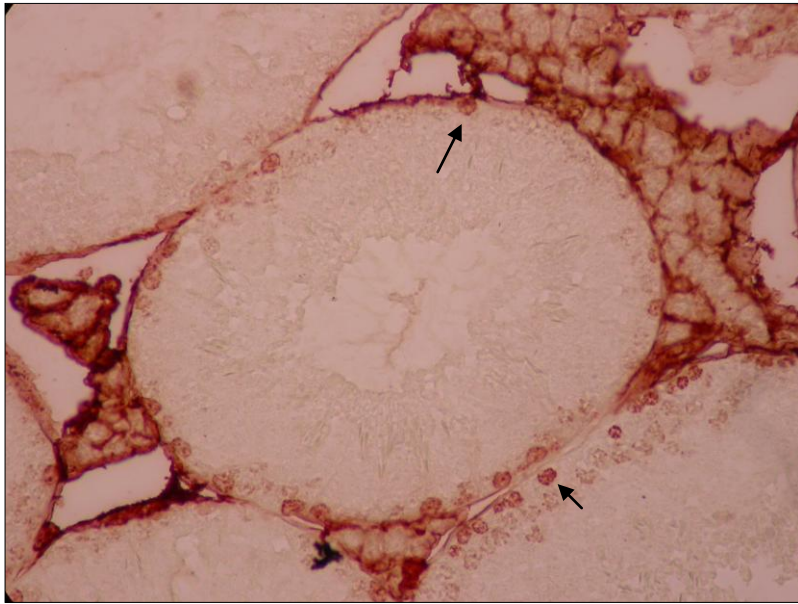


Figura 11. Microfotografía de un corte transversal de túbulo seminífero de ratón tratado con CP utilizando la reacción inmunohistoquímica Ki- 67 (400x). Las flechas indican las células inmunomarcadas.

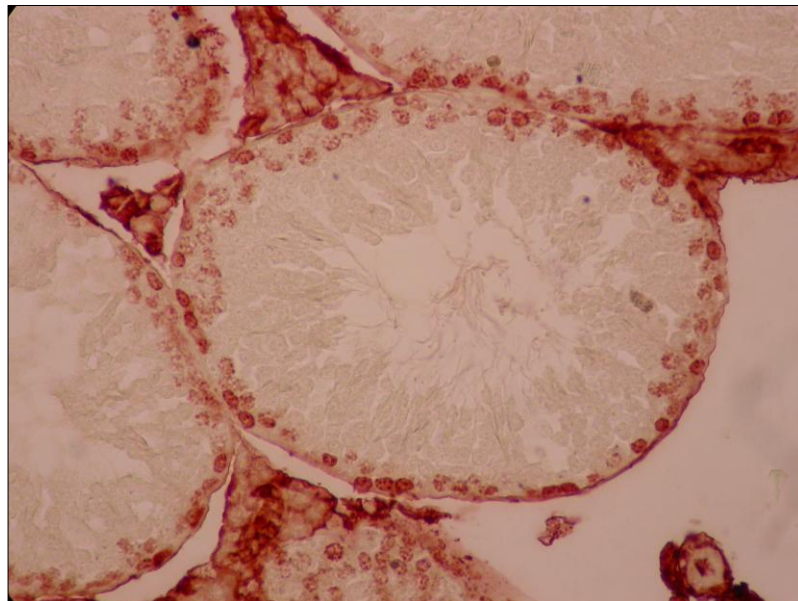


Figura 12. Microfotografía de un corte transversal de túbulo seminífero de ratón tratado con CP. Utilizando la técnica de inmunohistoquímica Ki-67, aumento 400x.

Alteraciones morfológicas del epitelio seminífero

1 día post tratamiento

Se observó un mayor número de túbulos con taponamiento tubular, discontinuidad y vacuolización epitelial, en comparación con los ratones controles, siendo más marcada la discontinuidad y la vacuolización que el taponamiento tubular, todas estadísticamente significativas ($p < 0,01$).

8,6 días post tratamiento

La discontinuidad y vacuolización del epitelio seminífero mostró un aumento en el grupo experimental estadísticamente significativa ($p < 0,01$). No se detectó taponamiento tubular en los grupos evaluados **Fig 13** y **14**.

17,2 días post tratamiento

La discontinuidad y vacuolización del epitelio seminífero observado fue mayor en el grupo experimental que en el control, diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$). No se observó taponamiento tubular en los grupos analizados.

25,8 días post tratamiento

Se observó que la discontinuidad del epitelio está aumentada en el grupo experimental, mientras que en el grupo control no existe hallazgo de esta patología, diferencia analizada estadísticamente con un ($p < 0,01$). La vacuolización registró un aumento en relación al grupo control. ($p < 0,01$). No se observó taponamiento tubular en los grupos analizados.

34,4 días post tratamiento

Con valores muy similares a los observados en los recuentos realizados a los 25,8 días se mantiene la discontinuidad y vacuolización del epitelio seminífero con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) y ausencia de taponamiento tubular en relación al grupo control.

Tabla 2. Alteraciones morfológicas según grupos evaluados para todos los tiempos postratamiento.

| Histopatología | Días post tratamiento | | | | | | | | | |
|-----------------------|-----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| | 1 | | 8,6 | | 17,2 | | 25,8 | | 34,4 | |
| | C | E | C | E | C | E | C | E | C | E |
| Discontinuidad | 0,12 ($\pm 0,0$) | 0,96 ($\pm 0,2$)* | 0,0 ($\pm 0,0$) | 0,63 ($\pm 0,3$)* | 0,0 ($\pm 0,0$) | 0,96 ($\pm 0,1$)* | 0,0 ($\pm 0,0$) | 0,69 ($\pm 0,2$)* | 0,0 ($\pm 0,0$) | 0,68 ($\pm 0,2$)* |
| Vacuolización | 0,01 ($\pm 0,0$) | 0,63 ($\pm 0,1$)* | 0,0 ($\pm 0,0$) | 0,08 ($\pm 0,1$)* | 0,0 ($\pm 0,0$) | 0,28 ($\pm 0,1$)* | 0,0 ($\pm 0,0$) | 0,23 ($\pm 0,1$)* | 0,0 ($\pm 0,0$) | 0,29 ($\pm 0,2$)* |
| Taponamiento | 0,03 ($\pm 0,0$) | 0,16 ($\pm 0,1$)* | 0,0 ($\pm 0,0$) | 0,0 ($\pm 0,0$) | 0,0 ($\pm 0,0$) | 0,0 ($\pm 0,0$) | 0,0 ($\pm 0,0$) | 0,0 ($\pm 0,0$) | 0,0 ($\pm 0,0$) | 0,0 ($\pm 0,0$) |

C =Grupo control; E =Grupo experimental; (*) = diferencia estadísticamente significativa $p \leq 0,05$.

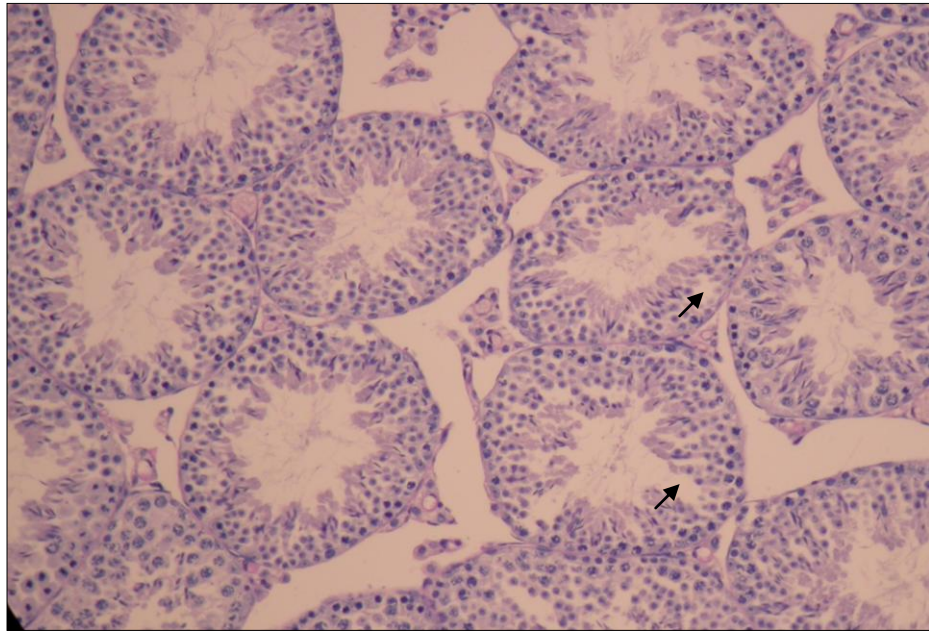


Figura 13. Microfotografía de un corte transversal de testículo de ratón tratado con Cipermetrina (200x). Método Reacción histoquímica Hematoxilina-PAS. Las flechas indican discontinuidad y vacuolización del epitelio.

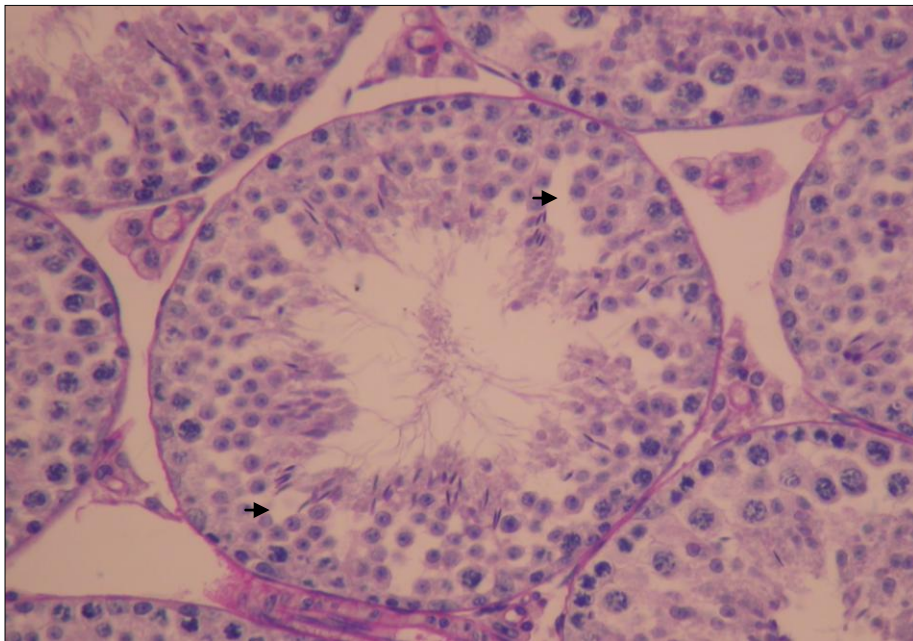


Figura 14. Microfotografía de un corte transversal de testículo de ratón tratado con Cipermetrina. Reacción histoquímica Hematoxilina-PAS (400x). Se observa discontinuidad de epitelio y vacuolización. Las flechas indican vacuolización y discontinuidad de epitelio

DISCUSION

Los efectos evaluados de CP sobre la proliferación celular en el testículo, para el primer ciclo de la espermatogénesis mostraron una disminución de las células inmunomarcadas tanto en grupo experimental como en el grupo control, siendo más severa en los animales experimentales. Este efecto fue revertido al segundo ciclo espermático donde aumentó la proliferación manteniéndose hasta completar una onda espermática. Este tipo de respuesta celular frente a un tóxico fue observada por van Keulen y de Rooij (1973), quienes administraron en ratas vía intraperitoneal, Busulfan (agente alquilante de ADN), observando que las espermatogonias tipo A, reaccionaban aumentando la proliferación pero en el período cercano a cumplirse un ciclo de la espermatogénesis. Resultados similares obtuvieron Bustos-Obregón y González-Hormazabal (2003), quienes administraron $1/12$ DL₅₀ de Malatión, un pesticida organofosforado en dosis única a ratones de la cepa CF1, observando una disminución de la proliferación y luego un aumento hacia el segundo ciclo espermático.

Existen subgrupos dentro de las espermatogonias tipo A, que difieren en su sensibilidad frente a agentes tóxicos: las espermatogonias de reserva (A_0), no proliferan en condiciones normales y son más resistentes que las espermatogonias de renovación o proliferantes denominadas A_1 , A_2 , A_3 , A_4 (Clermond y Leblond, 1968; de Rooij, 2001), en presencia de una noxa las A_0 experimentan mitosis continuando con la espermatogénesis (Lipshultz, 1991; Brinkworth y Handelsman, 1997; de Rooij, 2001). CP como un efecto tóxico directo podría haber depletado a las espermatogonias de renovación y haber estimulado a las espermatogonias de reserva a experimentar mitosis sucesivas. (Cotran *et al.*, 2000) postulan que la proliferación celular puede ser inducida por fenómenos como lesiones y muerte celular; regulada por factores de naturaleza química que se encuentran en el microambiente celular.

En el testículo, la proliferación espermatogonial esta regulada por inhibidores fisiológicos que actúan en diferentes etapas del ciclo celular de las espermatogonias del tipo A de reserva. Estos inhibidores se denominan chalonas y son producidas por células más diferenciadas del tipo espermatocitos primarios y las espermátides redondas (Bustos-Obregon, 1989), Al disminuir las espermatogonias en renovación disminuyen también las células que producen las chalonas y vía retroalimentación negativa estimularía a las espermatogonias a entrar en mitosis (Thuman y Bustos-Obregón, 1978).

La población celular más susceptible a la acción tóxica de CP, según los resultados, fueron las espermatogonias tipo A. Debido a su ubicación basal en el epitelio seminífero, quedando bajo la barrera hematotesticular más cerca del intercambio de sustancias transportadas por la sangre, las que no serían mediadas por las células de Sertoli si no que ingresarían por simple difusión hacia el compartimiento basal (Holstein *et al.*, 2003). De esta manera las células germinales diploides serían más vulnerables que sus equivalentes haploides a la muerte celular espontánea y posiblemente también a la apoptosis inducida por agentes tóxicos testiculares (Brinkworth y Handelsman, 1997).

La disminución de espermatocitos primarios y de espermátidas redondas a las 24 horas y a los 25,8 días posteriores a la administración de CP podría deberse a que en los espermatocitos I ocurre la primera profase meiótica y en ese momento a nivel de la cromatina hay modificaciones que la hacen más vulnerable a la interacción con otras macromoléculas (Lafuente-Indo, 1989). En las espermátides redondas se debe considerar, que durante la espermiohistogénesis, experimentan una transformación morfo genética, ultraestructural y de resistencia a agentes químicos y físicos, las proteínas nucleares, histonas son reemplazadas secuencialmente por proteínas intermedias y protaminas, de este modo las espermátides elongadas serían más resistentes que las espermátides redondas a la

acción de noxas debido a que se ha producido la compactación del material genético (Lafuente-Indo, 1989; Wouters-Tyrou *et al.*, 1998).

La espermatogénesis se establece y empieza a funcionar en forma continua y cada generación celular va adquiriendo un equilibrio en el tiempo dependiendo directamente de aquellas células que le han precedido (Brown *et al.*, 1987), entonces la disminución de la presencia de espermatozoides en el lumen tubular al completarse la onda espermatogénica puede deberse a la evolución de la alteración cuantitativa de las poblaciones celulares atribuible a la toxicidad de CP inducida cuatro ciclos antes en las células precursoras.

En los preparados histológicos observados se encontró un aumento de alteraciones morfológicas indicando que CP en la dosis utilizada fue capaz de inducir un efecto tóxico en la organización celular del testículo, modificando el desarrollo normal de la espermatogénesis.

La vacuolización del epitelio seminífero es una alteración morfológica común producida por una variedad de xenobióticos⁵, constituye la señal morfológica de daño testicular y la respuesta cardinal más temprana a tóxicos que alteran las células de Sertoli (de Kretser *et al.*, 1981). Estas alteraciones se atribuyen a la dilatación y fusión de la membrana citoplasmática que limita organelos como el retículo endoplásmico y vesículas, estas lesiones han sido observadas al tratar ratas con 2,5 hexanediona (Chapin *et al.*, 1983). Esta injuria celular fue revertida fisiológicamente en la medida que progresaba la espermatogénesis, se descartó la destrucción de los filamentos del citoesqueleto que sirven como anclajes uniendo la membrana plasmática al interior de la célula de Sertoli, debido a que este tipo de lesión es de carácter irreversible (Cotran *et al.*, 2000).

⁵ Xenobióticos son compuestos externos a un organismo vivo que interactúan con él, generalmente a través de alteraciones metabólicas.

La aparición de células inmaduras en el lumen tubular, se denomina taponamiento tubular o pseudoespermiación y se ha observado en el uso de tóxicos que provocan daños severos a las células de Sertoli, como por ejemplo exposiciones a compuestos nitroaromáticos (Foster *et al.*, 1986) y pftalatos (Creasy *et al.*, 1986).

La alteración morfológica tipo taponamiento tubular se observó como un daño agudo sólo a las 24 horas luego de tratar los ratones con CP y también fue observada en el grupo control, esto refleja una recuperación del epitelio a esta lesión morfológica. Una situación similar fue demostrada por Contreras y Bustos-Obregón (1999), que administraron Malatión a ratones cepa CF-1, que indujo teratozoospermia, taponamiento tubular y vacuolización. El taponamiento tubular podría deberse a un desprendimiento y pérdida apical de fragmentos de epitelio seminífero (Creasy *et al.*, 1986; Foster *et al.*, 1986)

A las 24 horas post tratamiento se evidencia la presencia de discontinuidad del epitelio en el grupo control y en el grupo experimental con valores más altos para las muestras tratadas con el pesticida, el que se mantuvo en los tiempos evaluados, por lo que no es posible establecer si existió una recuperación del epitelio, por este motivo se considera una lesión de carácter irreversible en las condiciones dadas de la investigación.

La discontinuidad de epitelio podría deberse a un defecto en la barrera hematotesticular por acción del pesticida sobre los filamentos de actina como la lesión observada al administrar citocalasina D, la cual compromete la integridad estructural y funcional de la barrera hematotesticular (Weber *et al.*, 1988).

A los piretroides se le ha demostrado actividad hormonal y han sido clasificados como disruptores endocrinos (Garey y Wolf, 1998). La interacción de un disruptor endocrino con hormonas puede ocurrir por diversos mecanismos involucrados en la liberación, síntesis, transporte, metabolismo o la excreción

(Greim, 2004). No obstante el mecanismo de acción aún no ha sido dilucidado (Kim *et al.*, 2004). En terminos de la regulación endocrina, es claro que la iniciación y la mantención de espermatogénesis depende del delicado equilibrio del eje hipotalamo-hipofisis-gónada (O`Donnell, 2001). CP podría actuar como disruptor endocrino e interferir en ese equilibrio y afectar indirectamente la actividad sexual causando una infertilidad de tipo pre-testicular (Brinkworth y Handelsman, 1997; Elbetieha *et al.*, 2001).

La unión de un piretroide a una proteína transportadora como SBGH indica una similitud estructural con los andrógenos que normalmente se unen en ese sitio para ser transportados a otros tejidos, por lo cual puede ser la base para unirse al receptor de andrógeno, dejando la concentración no baja de andrógenos (Eil y Nisula, 1990; Brody y Loriaux, 2003).

La funcionalidad de la membrana biológica requiere que los lípidos se encuentren en estado líquido y las alteraciones en esta fluidez se ha demostrado que interfiere con sus funciones. Los piretroides son compuestos altamente hidrofóbicos y esto sugiere que su acción al interior de las membranas biológicas se podría relacionar con la asociación a proteínas integrales y con fosfolípidos (Michelangeli *et al.*, 1990). CP induce una disminución de la fluidez de la membrana que podría producir algunos cambios en las actividades y conformación de las proteínas de la membrana, como por ejemplo, los canales de sodio voltaje sensibles.

Kale *et al.*, (1999) demostró que CP indujo tensión oxidativa en eritrocitos. La generación de radicales libres produce la lipoperoxidación creciente de la membrana celular. CP producto de las reacciones metabólicas formaría aldehídos y otras conjugaciones lipofílicas que producen tensión oxidativa y contribuir a la toxicidad de CP.

Manna *et al.*, (2004) En un estudio en ratas tratadas vía oral, administrando α - cipermetrina⁶ en forma crónica, observó daño hepático reflejado en el aumento en suero de las enzimas AST, ALT, LDH y la disminución del citocromo P₄₅₀.

Por último se administró CP en dosis única vía intraperitoneal, esta ofrece una gran superficie de absorción aumentando la rapidez de la biodisponibilidad del tóxico, considerando que una vez inoculado el pesticida vía intraperitoneal se distribuye rápidamente hacia el hígado (Elliot, 1976; Miyamoto, 1976; Casida *et al.*, 1983; Grailot y Hoellinger, 1982) podría haber causado algún grado de lesión hepática e interferir con la normal detoxificación, acentuando sus efectos tóxicos.

⁶ α - Cipermetrina es un isomero de CP

CONCLUSION

El insecticida piretroide CP administrado en $\frac{1}{5}$ de la DL_{50} , en dosis única vía intraperitoneal a ratones machos adultos cepa CF-1, induce alteraciones en la citología testicular, manifestándose en las variables evaluadas temporalmente durante cada ciclo del epitelio seminífero hasta completar una onda de la espermatogénesis: i) modifica la proliferación celular, induce una disminución de las células que experimentan mitosis, efecto que se revierte en el transcurso de los 3 ciclos espermáticos posteriores, ii) altera la morfología testicular aumentando la frecuencia de presentación de discontinuidad y vacuolización epitelial, y en menor proporción, taponamiento tubular, iii) altera la frecuencia y evolución de las diferentes poblaciones celulares en el epitelio germinal.

BIBLIOGRAFIA

ADLER, I. 2000. Spermatogenesis and mutagenicity of environmental hazards: Extrapolation of genetic risk from mouse to man. *Andrología* 32(4-5): 233-237.

AMER, S.; IBRAHIM, A.; EL-SHEBENY, K. 1993. Induction of chromosomal aberrations and sister chromatid exchange in vivo and in vitro by insecticide cypemethrin. *J. Appl. Toxicol.* 13(5): 341-345.

AMORY, J.; BREMNER, J. 2003. Regulation of testicular function in men: implications for male hormonal contraceptive development. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 85(2-5): 357-361.

BAARENDS, W.; VAN DER LAAN, R.; GROOTEGOED, J. 2001. DNA repair mechanisms and gametogenesis. *Reproduction* 121(1): 31-39.

BACHA, W.; WOOD, L. 1991. Aparato reproductivo del macho. **In:** Atlas color de histología veterinaria. Inter-Médica S.A.I.C.I. Buenos Aires. Argentina

BENTH; HOOKS, F 1937. Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem. Texte: Atlas zur Pharmacopoea germanica, Volume 3 of 3. Rare books from the MBG library. [en línea] <<http://www.illustratedgarden.org/mobot/rarebooks/page.asp?relation=QK99A1K6318831914B3&identifier=0432>> [consulta:12-04-2006].

BRINKWORTH, M.; HANSELSMAN, D. 1997. Occupational and environmental influences on male infertility. **In:** Nieschlag E., Behre H. (Eds). *Andrology: male reproductive health and dysfunction*. 2nd ed. Heidelberg. Alemania. pp. 241-253.

BRODY, S.; LORIAUX, D. 2003. Epidemic of gynecomastia among Haitian refugees: exposure to an environmental antiandrogen. *Endocr. Pract.* 9(5): 370-375.

BROWN, D.; BUSTOS-OBREGON, E.; ARRAU, J. 1987. Estudio de la cinética de la preespermatogenesis y espermatogénesis en el hamster dorado (*MESOCRICETUS AURATUS* WATERHOUSE)(CRICETINAE). Gayana Zool. 51(1-4): 177-199.

BUSTOS-OBREGON, E. 1970. On Sertoli cell number and distribution on rat testis. Arch. Biol. (Liege) 81 : 99.

BUSTOS-OBREGON, E. 1989. Chlona espermatogonial G₁ . Arch. Biol. Med. Exp. 22(1): 15-23.

BUSTOS-OBREGÓN, E.; GONZÁLEZ-HORMAZÁBAL, P. 2003. Mice testicular damage elicited by malathion. Int. J. Morphol., 21(2): 155-159.

CASADEI, G. 2003. Breve historia de los insecticidas **In:** Aguayo, G.; Hepp, R. (Eds.). Bases para el manejo racional de insecticidas. Editorial Trama impresores S.A. Chillán. Chile. pp 19-27.

CASIDA, J. 1980. Pyrethrum flowers and pyrethroids insecticides. Environ. Health Persp. 34: 189-202.

CASIDA, J.; GAMMON, D.; GLICKMAN, A.; LAWRENCE, L. 1983. Mechanism of selective action of pyrethroids insecticides. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 23: 413-38.

CASIDA, J.; QUISTAD, G. 1998. Golden age of insecticides research: past, present, or future?. Annu. Rev. Entomol. 43: 1-16.

CHAPIN, R.; MORGAN, K.; BUS, J. 1983. The morphogenesis of testicular degeneration induced in rats by orally administrated 2,5- hexanedione. Exp. Mol. Pathol. 38(2): 149-169.

CHAUHAN, L.; AGARWAL, D.; SUNDARARAMAN, V. 1997. In vivo induction of sister chromatid exchange in mouse bone marrow following oral exposure to commercial formulations of alpha-cyano pyrethroids. *Toxicol. Lett.* 93(2-3): 153-157.

CHEEK, A.; MCLACHLAN, J.1998. Environmental hormones and the male reproductive system. *J. Androl.* 19(1): 5-10.

COOKE, H.; SAUNDERS, P. 2002. Mouse models of male infertility. *Nature Rev. Genetics* 3: 790-801.

COTRAN, R.; KUMAR, V., COLLINS, T. 2000. Patología celular I: lesión y muerte celulares. **In:** Robbins patología estructural y funcional. 6ª Ed. Interamericana McGraw-Hill.. México DF. México pp 1-31.

CONTRERAS, H.; BUSTOS-OBREGON, E. 1999. Morphological alterations in mouse testis by a single dose of malathion. *J. Exp. Zool.* 284(3): 355-9.

CIUDAD, C. 1995. Actualidad y futuro del uso de plaguicidas. *Tierra adentro.* 1: 5-7.

CREASY, D; FOSTER, J; FOSTER, P. 1983. The morphological development of di-n-pentyl phtalate induced testicular atrophy in the rat. *J. Pathol.* 139:309-321.

CREMLYN, R. 1991. *Agrochemicals: preparation and mode of action.* John Wiley. Nueva York. USA. 396 p.

DATA SHEETS. KI67 (Clone SP6) Rabbit Monoclonal Antibody. Labvision C°, California, 2000.

DYM, M.; FAWCETT, D. 1970. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol. Reprod.* 3(3): 308-326.

EI-KHALEK, M.; RAHMY, N., HALEEM, H. 1999. Effect of the pyrethroid insecticide cypermethrin on fertility in male rats. *Vet. Med. J. Giza* 47(3): 295-305.

GABBIANELLI, R.; FALCIONI, G.; NASUTI, C.; CANTALAMESSA, F. 2002. Cypermethrin-induced plasma membrane perturbation on erythrocytes from rats: reduction of fluidity in the hydrophobic core and in glutathione peroxidase activity. *Toxicology* 175(1-3): 91-101.

GAREY, J.; WOLFF, M. 1998. Estrogenic and antiprogestagenic activities of pyrethroids insecticides. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 251(3): 855-859.

GARTNER, L.; HIATT, J. 2002. Sistema reproductor masculino **In:** Texto atlas de histología. 2ª Ed.. Interamericana McGraw Hill México DF. México. pp 463- 483.

GENEROSO, W. 1994. The rodent dominant- lethal assay. *Environ. Mol. Mutagen.* 24(4): 332-333.

GENESER, F. 2000. Histología. 3ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 813 p.

GERDES, J.; LEMKE, H.; BAISCH, H.; WACKER, H.; SCHWAB, U.; STEIN, H. 1984. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody ki-67. *J. Immunol.* 133 (4): 1710-1715.

GIRI, S.; GIRI, A.; DUTT G.; BALI, S. 2003. Induction of sister chromatid exchanges by cypermethrin and carbosulfan in bone marrow cells of mice in vivo. *Mutagenesis* 18(1): 53–58.

GO, V.; GAREY, J.; WOLFF, M.; POGO, B. 1999. Estrogenic potential of certain pyrethroid compounds in the MCF-7 human breast carcinoma cell line. *Environ. Health. Perspect.* 107(3): 173-177.

GRAILLOT, C.; HOELLINGER, H. 1982. Binding of two pyrethroid isomers, cismethrin and bioresmethrin, to liver proteins. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 66(313-318): 313-318.

GREIM, H. 2004. The endocrine and reproductive system: adverse effects of hormonally active substances? *Pediatrics* 113 (4): 1070-1075.

GRISWOLD, M. 1995. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biol. Reprod.* 52(2): 211-216.

GUYTON, A; HALL, J. 2001. Funciones reproductoras y hormonales en el varón (y función de la glándula pineal). **In:** Tratado de fisiología médica: 10^a ed. Editorial Mc Graw Hill.. México DF. México. pp. 1101-1116.

EELLS, T.; BANDENTTINI, P.; HOLMAN, P.; PROPP, J. 1992. Pyrethroids insecticides- induce alterations in mammalian synaptic membrane potential. *J. Pharm. Therap.* 262(3): 1173-1181.

EIL, C.; NISULA, B. 1990. The binding properties of pyrethroids to human skin fibroblast androgen receptors and to sex hormone binding globulin. *J. Steroid. Biochem.* 35(3-4): 409-414.

ELBETIEHA, A.; DA'AS, S.; KHAMAS, W.; DARMANI, H. 2001. Evaluation of the toxic potentials of cypermethrin pesticide on some reproductive and fertility parameters in the male rats. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 41(4):522-528.

EL-KHALEK, M.; RAHMY, N.; HALEEM, H. 1999. Effect of the pyrethroid insecticide cypermethrin on fertility in male rats. Vet. Med. J. Giza 47(3): 295-305.

ELLIOTT, M. 1976. Future use of natural and synthetic pyrethroids **In:** Metcalf, R.; Mc kelvey, J. (Eds.) Advances in environmental sciences and technology. Editorial Wiley, New York. USA. pp 163-193.

FAWCETT, W.; JENSH, R. 1999. Aparato Genital Masculino **In:** Compendio de Histología: Editorial Interamericana McGraw-Hill. España. pp. 265-277.

FOSTER, P; SHEARD, C; LLOYD, S. 1986. Dinitrobenzene: a Sertoli cell toxicant? Excerpta Med. Int. Cong. Ser. 718:281-288.

de FRANCA, L.; HESS, R.; COOKE, P.; RUSSELL, D. 1995. Neonatal hypothyroidism causes delayed Sertoli cell maturation in rats treated with propylthiouracil: evidence that the Sertoli cell controls testis. Anat. Rec. 242(1): 57-69.

JUNQUEIRA, L; CARNEIRO, J. 2005. Histología básica: texto y atlas. 6^a ed. Masson. Barcelona. España. 488 p.

KEUNG, C.; LEUNG, P. 2005. Molecular biology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and their receptors in humans. Endocrine Rev. 26(2): 283–306.

van KEULEN, C.; de ROOIJ, D. 1973. Spermatogonial stem cell renewal in the mouse. II. After cell loss. *Cell. Tissue Kinet.* 6(4): 337-45.

KIM, I.; SHIN, J.; KIM, H.; LEE, S.; KANG, I.; KIM, T.; MOON, H.; CHOI, K.; MOON, A.; HAN, S. 2004. Assessing estrogenic activity of pyrethroids insecticides using in vitro combinations assays. *J. Reprod. Develop.* 50(2): 254-255.

de KRETZER, D.; KERR, J. 1988. The cytology of the testis. **In:** The physiology of reproduction. Knobil, N. Neill, J. (Eds) Raven Press. New York.. U.S.A. pp 1177-1290.

de KRETZER, D.; KERR, J.; PAULSEN, C. 1981. Evaluation of the ultrastructural changes in the human Sertoli cell in testicular disorders and the relationship of the changes to the levels of serum FSH. *Int. J. Androl.* 4:129-144.

MANNA, D.; BHATTACHARYYA, T.; MANDAL, D. 2004. Repeated dose toxicity of alfa-cypermethrin in rats. *J. Vet. Sci.*5(3): 241-245.

MICHELANGELI, F.; ROBSON, M.; EAST, J. LEE, A. 1990. The conformation of pyrethroids bound to lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1028(1): 49-57.

MILLER, K. 1996. Immunocytochemical techniques **In:** Bancroft, J.; Stevens, A. (Eds.) *Theory and practice of histological techniques.* 4th ed. Churchill-Livingstone. Edinburgh. England. pp 435-470.

MIYAMOTO, J. 1976. Degradation, metabolism and toxicity of synthetic pyrethroids. *Environ. Health Perspect.* 14:15-28.

MRUK, D.; CHENG, C. 2002. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol. Rev.* 82: 825- 874.

MRUK, D.; CHENG, C. 2004. Sertoli–Sertoli and Sertoli–germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocrine Rev.* 25(5): 747–806.

LAFUENTE-INDO, N. 1989. Acción cito y genotóxica de algunos contaminantes ambientales sobre la espermatogénesis. *Arch. Biol. Exp.* 22: 69-75.

LAUWERYS, R. 1994. Pesticidas. **In:** Toxicología industrial e intoxicaciones profesionales. Editorial Masson. Barcelona, España. pp. 487-539.

LEBLOND, C.; CLERMONT, Y. 1952. Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the “periodic acid-fuchsin sulfurous acid” technique. *Am. J. Anat.* 90(2): 167-215.

LILLIE, R. 1965. *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry*. 3rd edition, McGraw Hill, New York, USA. 715 p.

LUTY, S.; LATUSZYNKA, J.; HALLIOP, J.; TOCHMAN, A.; OBUCHOWSKA, D.; PRZYLEPA, E.; KORCZAK, E. 1998. Toxicity of dermally applied alpha-cypermethrin in rats. *Ann. Agric. Environ. Med.* 5(2): 109-115.

OAKBERG, E. 1956. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stage of the cycle seminiferous epithelium. *Am. J. Anat.* 99(3): 507-516.

O'DONNELL, L; KIRSTEN M. ROBERTSON, K; JONES, E; SIMPSON, E. 2001. Estrogen and Spermatogenesis. *Endocrine Rev.* 22(3): 289–318

PASCUAL-VILLALOBOS, M. 1996. Plaguicidas naturales de origen vegetal: estado actual de la investigación. Instituto nacional de investigación y tecnología agraria y alimentaria. Madrid. España. 36 p.

PERGER, G.; SZADKOWSKI, D. 1994. Toxicology of pyrethroids and their relevance to human health. *Ann. Agric. Environ. Med.* 1: 11-17.

RATHGEB, W. 2000. Pesticidas orgánicamente aprobados. *Chile Agrícola* 25 (246): 228-229.

RODRIGUEZ, C.; SILVA, G.; DJAR, J. 2003. Breve historia de los insecticidas **In:** Aguayo, G.; Hepp, R. (Eds.). Bases para el manejo racional de insecticidas. Editorial Trama impresores S.A.Chillán. Chile pp 89-111.

de ROOIJ, D. 2001. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* 121(3): 347-354.

ROOSEN-RUNGE, E. 1962. The process of spermatogenesis in mammals. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 37: 343-377.

SAITO, K.; TOMIGAHARA, Y.; OHE, N.; ISOBE, N.; NAKATSUKA, I.; KANEKO, H. 2000. Lack of significant estrogenic or antiestrogenic activity of pyrethroid insecticides in three *in vitro* assays based on classic estrogen receptor α - mediated mechanism. *Toxicol. Sci.* 57(1): 54-60.

SCHLATT, S.; MEINHARDT, A.; NIESCHLAG, E. 1997. Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. *Eur. J. Endocrinol.* 137(2): 107–117.

SETCHELL, B. 1978. Spermatogenesis. **In:** The mamalian testis. Cornell Univ. Press. Nueva York. U.S.A. pp. 181-232.

SHAFER, T.; MEYER, D.; CROFTON, K. 2005. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. *Environ. Health Perspect.* 113(2): 123-136.

SHAN, G.; HUANG, H.; STOUTAMIRE, D.; GEE, S.; LENG, G.; HAMMOCK, B. 2004. A sensitive class specific immunoassay for the detection of pyrethroid metabolites in human urine. *Chem. Res. Toxicol.* 17(2): 218-225.

SIU, M.; CHENG, Y. 2004. Extracellular matrix: Recent advances on its role in junction dynamics in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 71(2): 375–391.

THOMSON, W. 1998. Agricultural chemicals, book I: insecticides, acaricides and ovicides. 14th ed. Fresno. California. U.S.A. pp. 79-80.

THUMANN, A.; BUSTOS-OBREGON, E. 1978. An “in vitro” system for the study of rat spermatogonial proliferative control. *Andrología* 10: 22-25.

VALLEBUONA, C. Ed. 2003. El vigía 21: Vigilancia intoxicaciones agudas por plaguicidas. [En línea] <<http://epi.minsal.cl/epi/html/elvigia/VIGIA21.pdf>> [consulta: 12-04-2006].

VERDUGO, G. 1983. El piretro, una flor que produce insecticida. *Chile Agrícola* 8(77):6-7.

VERLY, W.; DESCHAMPS, Y; PUSHPATHADAM, J; DESROSIERS, M. 1971. The hepatic chalone I. Assay method for the hormone and purification of the rabbit liver chalone. *Canad. J. Biochem* 49:1376-1381.

WEBER, J.; TURNER, T.; TUNG, K.; RUSSELL, L. 1988. Effects of cytochalasin D on the integrity of the Sertoli cell (blood-testis) barrier. *Am. J. Anat.* 182: 130-147.

W.H.O.; F.A.O.(WORLD HEALTH ORGANIZATION; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION), 1989. Data sheet on pesticides No.58 Cypermethrin[enlinea].<http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest58_e.htm> [consulta:12-04-2006].

WILKS, M. 2000. Pyrethroid-induced paresthesia—a central or local toxic effect? *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 38(2): 103–105.

WOUTERS-TYROU, D.; MARTINAGE, A.; CHEVAILLIER, P.; SAUTIERE, P. 1998. Nuclear basic proteins in spermiogenesis. *Biochimie* 80(2): 117–128.

WROBEL, K. 1998. Male reproductive system. **In:** Dellmann, H.; Eurell, J. *Textbook of veterinarian histology*. 5th ed. William and Wilkins. Baltimore. U.S.A. pp. 226-246.

ZAHODIAKIN, P. 1999. EPA considers cypermethrin as prototype to assess risks of other synthetic pyrethroids. *Pest. Toxic Chem. News.* 27: 1-2.

ZLOTKIN, E. 1999. The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides. *Annu. Rev. Entomol.* 44:429–55.

ANEXO 1

Reactivos y equipos

Reacción histoquímica Hematoxilina- PAS

Soluciones

- Bouin Alcohólico (Fijador Dubosq-Brasil).

Para un volumen final de 225 ml.: Etanol al 80%, 150 ml, Formol 36 - 40%, 60 ml, Ácido Acético Glacial 15 ml y Ácido Pícrico 1 g.

- Agua sulfurosa:

A 100 ml de agua destilada agregar 5 ml de ácido clorhídrico 1 N y 5 ml de metabisulfito de potasio (10%).

- Reactivo de Schiff

Disolver 1 g de fucsina básica en 200 ml de agua destilada hirviendo, dejar enfriar a 50 °C, filtrar se adicionan 20 ml de Ácido clorhídrico 1 N, enfriar a 25 °C agregar 1 g de metabisulfito de sodio o potasio 0,2 g de carbón activado, dejar reposar la solución en la oscuridad durante 24 h, agregar 0,2 g de carbón activado, luego agitar, filtrar y almacenar bien cerrado en un frasco ámbar.

- Acido peryódico

A 100 ml de agua destilada se le agrega 0,5 g de Ácido peryódico

- Medio de montaje resinoso

Flotex

Inmunohistoquímica

Reactivos

- Citrato de sodio pH 6.0. 10 μ M.

Para un volumen final 1000 ml: 2,1 g de ácido cítrico agregar agua destilada 1000 ml. Ajustar pH con NaOH 2 M (aproximadamente 13 ml).

- Silanización de portaobjetos (3- aminopropiltriethoxisilano 2% en acetona):

Limpiar los portaobjetos con una solución de alcohol clorhídrico (etanol 95% y ácido clorhídrico 0,5%). Enjuagar los portaobjetos en acetona pura por 1 min, luego luego sumergirlos en una solución de 3- aminopropiltriethoxisilano al 2% en acetona durante 3 min, enjuagar en acetona por 15 segundos, secar rápidamente utilizando un secador de pelo, dejar secando durante 1 h en estufa a 60 °C.

- Anticuerpo monoclonal de conejo Ki-67 (clon SP6) Labvision Co. REF RM 9106-R7 Lot 9106R404D.
- Kit de revelado del anticuerpo monoclonal o sistema de detección I.H.Q. UltraVision Plus Detection System Anti-Polyvalent, HRP/AEC (Ready-To-Use).

1. Peróxido de hidrogeno: Hydrogen Peroxide block REF TA-015 HP, Lot AHP40616.
2. Anticuerpo secundario biotinilado: Biotinnylated goat anti polyvalent (plus) REF TP 015 BNX Lot BNX 40602.
3. Solución estreptavidina peroxidasa (Streptavidin peroxidase (plus)) REF TS 015 HAX, Lot HRX 40602.
4. Sustrato cromógeno amino- etil- carbazol A.E.C. Single solution REF TA-015-SA, Lot ASA 40824.

- Medio de montaje acuoso: Ultramount plus

Equipamiento

- Horno microondas marca Samsung modelo CE2933N
- Microscopio óptico: Nikon modelo Eclipse E 400 serie 677410
- Fotografía : Cámara Nikon modelo Coolpix MDC Lens
- Imágenes e ilustraciones: Adobe Photoshop 7.0.1

ANEXO 2

Protocolos

Reacción Inmunohistoquímica Ki 67 (Clon SP 6) DATA SHEETS, 2000.

- Desparafinar e hidratación de las muestras

Xilol 100% 3 min.

Xilol 100% 3 min.

Etanol 100% 3 min.

Etanol 95% 3 min.

Agua corriente

- 1.- Aplicar solución buffer fosfato salino (PBS) a pH 7,2 a T° ambiente por 2 min.
 - 2.- Aplicar solución peróxido de hidrógeno H₂O₂ al 3% 100 µl por 5 min.
 - 3.- Lavar con solución PBS pH 7,2 por escurrimiento.
 - 4.- Recuperación de antígenos con buffer citrato de sodio pH 6 (10 µM) en microondas por 20 min.
 - 5.- Dejar enfriar a T° ambiente durante 20 min.
 - 6.- Aplicar 100 µl del anticuerpo primario (Ki 67) incubar por 10 min.
 - 7.- Lavar con solución buffer PBS pH 7,2 por escurrimiento.
 - 8.- Aplicar 100 µl del anticuerpo 2° incubar por 10 min.
 - 9.- Lavar con solución buffer PBS pH 7,2 por escurrimiento.
 - 10.- Aplicar 100 µl de solución estreptavidina- peroxidasa e incubar durante 10 min.
 - 11.- Lavar con H₂O por escurrimiento.
 - 12.- Aplicar cromógeno (AEC) e incubar por 8 min.
- Aplicar tinción de contraste Hematoxilina de Mayer.

- 13.- Lavar las muestras con agua corriente.
- 14.- Montaje en medio hidrófilo Ultramount Plus.
15. Observar al microscopio óptico con aumento de 400x.

Método histoquímico Hematoxilina-PAS (Lillie, 1965).

- Desparafinar e hidratación de las muestras

Xilol 100% 3 min.

Xilol 100% 3 min.

Etanol 100% 3 min.

Etanol 95% 3 min.

Etanol 70% 3 min.

Lavar en agua corriente.

1.- Aplicar ácido periódico 1% por 10 min.

2.- Lavar con agua destilada (H₂O_d).

3.- Aplicar reactivo de Schiff a T° ambiente por 10 min.

4.- Lavar con agua sulfurosa por 5 min (3 veces).

5.- Lavar con agua corriente por 10 min.

6.- Aplicar Hematoxilina de Mayer por 10 min.

7.- Lavar con agua corriente.

8.-Deshidratar:

Alcohol 70% 10 min.

Alcohol 80% 10 min.

Alcohol 95% 10 min.

Alcohol 95% 10 min.

Alcohol 100% 10 min.

Alcohol 100% 10 min.

Xilol 100% 15 min.

Xilol 100% 15 min.

9.- Montaje en resina sintética (Flotex).

10. Observar al microscopio óptico con aumento de 400x.

ANEXO 3

Reacción de Inmunohistoquímica (Miller, 1996).

Se utilizó un anticuerpo monoclonal de conejo clone SP 6 (anticuerpo primario), contra la proteína antígeno Ki 67 de la célula, detectable exclusivamente en el núcleo –o en los nucleolos- durante las fases S, G₂, M, G₁ del ciclo celular y ausente en fase G₀ (Gerdes *et al.*, 1984). Se aplicó un segundo anticuerpo polivalente biotinilado, unido a una proteína biotina (vitamina H) la cual tiene afinidad por una proteína tetramérica de 60 kD la estreptavidina que une a una enzima peroxidasa la cual al incubarse con el sustrato cromógeno AEC (3,9, amino etil carbazol) y contrastado con hematoxilina de Mayer, produce una reacción coloreada y estable evidenciándose la inmunomarcación de células positivas de color rojo en fondo azul. Posteriormente, estas células son observadas por microscopía óptica y cuantificadas.

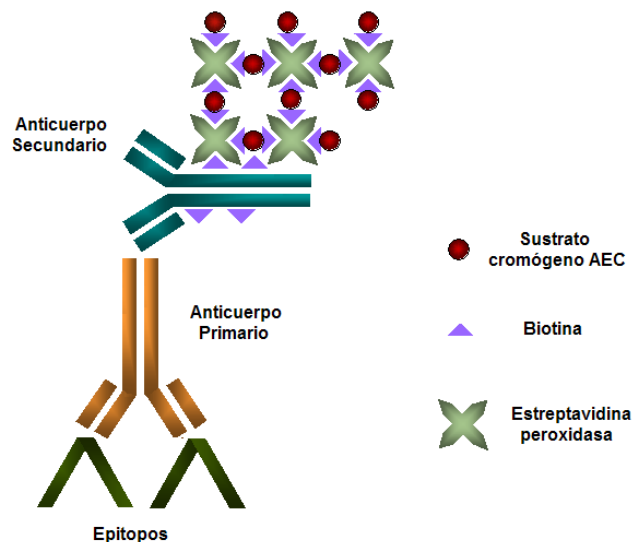


Figura 15. Reacción inmunohistoquímica método Streptavidin- Biotin- Complejo (SABC) Modificado de Dako. C°, California, 2000.