



SETAC – Brazil

Efecto de Malatión y de Maca (*Lepidium meyenii*) sobre la Espermatogenesis del Ratón (*Mus musculus*)

E. BUSTOS-OBREGÓN,^{1*} T. DIEDERICH,² F. COSTA DEL RÍO² & L. SARABIA¹

¹Laboratorio de Biología de la Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Chile,
Av. Independencia, 1027, Santiago de Chile

²Universidad Iberoamericana de Ciencias y Tecnología (UNICIT), Dieciocho 1680, Santiago de Chile

(Received August 21, 2006; Accepted November 24, 2006)

RESUMEN

El Malatión induce alteraciones testiculares ligadas a la disminución de fertilidad en distintas especies. Se utilizó el extracto de una planta (Maca) para analizar si ejerce un efecto antagónico a malatión, para lo cual se utilizaron 52 ratones de 12 semanas de edad, distribuidos en 4 grupos (Control, Maca, Malatión, Maca + Malatión) a los cuales se le administró Malatión o cloruro de sodio 0,9% vía intraperitoneal y/o Maca vía oral mediante sonda esofágica, con sacrificios a los días 1, 7, 14 y 21, en los que se determinó la frecuencia de los estados del ciclo del epitelio seminífero en cortes histológicos teñidos con Ácido Peryódico Schiff – Hematoxilina para la evaluación del acrosoma espermático. Los datos se analizaron con los test de ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis y análisis multivariable de Dunn. Al día 1 post tratamiento se observó con Maca y Malatión + Maca que aumenta el estadio XII y disminuye con Malatión. Por otra parte, al día 7 se observó aumento significativo del estadio VII en el grupo tratado con Malatión. Al día 14 se produjo aumento de los estadios VIII en el grupo tratado con Malatión, lo que fue evitado en el grupo tratado con Malatión + Maca, lo mismo ocurre al día 21 para el estadio IX. Los resultados sugieren que Malatión altera la frecuencia de estadios del ciclo en tanto que maca protege al túbulo seminífero de este daño.

Palabras claves: spermatogenesis, Maca, Malatión, túbulos seminíferos, epitelio seminífero.

ABSTRACT

Effect of Malathion and Maca (*Lepidium meyenii*) on spermatogenesis of mouse

Malathion induces testicular alterations related to decrease of fertility in different species. The extract of a plant (Maca) was utilized to analyze if it has an antagonistic effect to malathion. For this trial, for which 52 mice of 12 weeks of age were utilized, distributed in 4 groups (Control, Maca, Malathion, Maca + Malathion) and injected intraperitoneally with Malathion or NaCl 0.9% and/or Maca (given orally by means of an esophagic tube) mice were sacrificed at days 1, 7, 14 and 21. The frequency of the stages of the seminiferous epithelium was determined in histological sections stained with Peryodic Acid Schiff – Hematoxylin for the evaluation of the spermatid acrosomas. The data were analyzed with the non parametric test of ANOVA of Kruskal-Wallis, and multivariable analysis of Dunn. Al day 1 post treatment it was observed that the stage XII is more frequent with Maca and Malathion + Maca but diminishes with Malathion by day 7. A significative increase of the stage VII is found in the group treated with Malathion. Al day 14 an increase of the stage VIII is seen in the group treated with Malathion, which is not the case for group treated with Malathion + Maca, the same situations is found by day 21 in the stage IX. These results suggest that Malathion alters the frequency of stages of the cycle while Maca protects the tubules from this damage.

Key words: spermatogenesis, Maca, Malathion, seminiferous tubule, seminiferous epithelium.

*Corresponding author: Eduardo Bustos-Obregón, e-mail: ebustos@med.uchile.cl.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día gracias a un conocimiento más acabado sobre plaguicidas organofosforados, se han creado nuevas estrategias de aplicación para estos productos agroquímicos. En 1950, se describe el Malatión compuesto organofosforado, ampliamente utilizado en la agroindustria, en cultivos de frutas y hortalizas, siendo hoy uno de los que producen mayor número de intoxicaciones agudas a nivel mundial (Hu *et al.*, 1989).

En Chile, existen antecedentes de importación de plaguicidas en el 2001, en el cual se importaron 17.942 toneladas, lo que llevó a un incremento de los casos de intoxicación, malformaciones e infertilidad principalmente en la población rural del país (MINSAL, 2002), por lo cual es importante evaluar su toxicidad y cómo los residuos de éstos contaminan el medio ambiente natural. Malathion por su alta liposolubilidad se acumula en tejidos grasos donde pueden ser liberados en forma de metabolitos activos (formas oxón). La intensidad y duración de los efectos farmacológicos dependen de su vía de administración, liposolubilidad y tiempo de degradación metabólica. Rodríguez & Bustos-Obregón (2000) demostraron que los organofosforados afectan la proliferación del epitelio seminífero disminuyendo la síntesis de ADN espermático. Atef *et al.* (1995) describen un efecto negativo sobre la masa testicular y motilidad espermática, induciendo aumentos en la mortalidad y en el número de anomalías morfológicas que presentan los espermatozoides.

Malatión se absorbe vía intestinal, respiratoria y dérmica, y el 90% de los metabolitos es excretado por vía renal, siendo el hígado el órgano reservorio por excelencia; su DL_{50} es variable según la vía de ingreso; Van Den Heuvel *et al.* (1990) reportan en ratones las DL_{50} por vía oral y dérmica de 1375 $mg\ kg^{-1}$ y 4400 $mg\ kg^{-1}$, respectivamente.

Maca (*Lepidium meyenii*) es una planta hipocotífla que se cultiva en los Andes Peruanos a una altura entre 3700 y 4500 m.s.n.m. (King, 1987), a la cual se le atribuyen acciones terapéuticas y nutricionales. Gonzáles *et al.* (2001) evaluaron su efecto en ratas sometidas a hipoxia hiperbárica, en las cuales incrementaron el recuento final de espermatozoides en los grupos tratados con Maca.

La espermatogénesis es un proceso complejo de división y diferenciación celular que conduce a la formación de espermatozoides, ésta comienza cuando los gonocitos se multiplican para producir diversas generaciones de espermatogonias y dan origen a espermatoцитos primarios, los cuales entran en meiosis y originan finalmente células haploides, las espermátidas. Luego de un proceso de citodiferenciación, darán origen a los espermatozoides que, liberados fisiológicamente del epitelio germinal en el momento de la espermiación, discurren por la vía seminal, donde experimentan cambios morfológicos y funcionales conocidos como maduración (Bustos-Obregón, 1999). Los estadios del ciclo de la espermatogénesis lo constituyen grupos de células en similares estados de desarrollo y que van evolucionando sincrónicamente, agrupadas en asociaciones más o menos fijas.

Hay 12 estadios en el ratón y 14 en la rata. Cada estadio ocupa pequeños segmentos a lo largo del túbulo seminífero y la serie completa de los estadios del ciclo del epitelio seminífero constituye un ciclo, que en el ratón equivale en tiempo a 8,45 días y para espermatogénesis completa es de 33 días.

La hipótesis para este estudio postula que Malatión, administrado en dosis subletales, daña el epitelio seminífero disminuyendo la espermatogénesis y, por otra parte, Maca (*Lepidium meyenii*), por sus cualidades estimulantes, disminuye el efecto adverso del Malatión.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 52 ratones machos (*Mus musculus*), cepa CF1, adultos con 12 semanas de edad y con peso que varió entre 30 y 32 gr., provenientes del bioterio del Laboratorio de Biología de la Reproducción de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Preparación del extracto acuoso de Maca

Por medio de la pulverización de las raíces secas hervidas en agua destilada por 30 minutos y posteriormente filtrada, se llega a una concentración de 333 $mg\ mL^{-1}$ de extracto de Maca seco en solución acuosa, se deja enfriar a temperatura ambiente para después ser almacenada en frascos y refrigerada a 4°C hasta su uso.

Los animales fueron distribuidos al azar en 4 grupos. Grupo 1 sólo se le administró Malatión 1/36 DL_{50} equivalentes a 80 $mg\ kg^{-1}$ de peso de ratón, vía intraperitoneal ($DL_{50} = 2880\ mg\ kg^{-1}$) solo una vez al día 0. Grupo 2 se trató solo con extracto de Maca en suspensión acuosa administrada diariamente por sonda esofágica en dosis de 666,6 $mg\ kg^{-1}$ de peso corporal. Grupo 3 recibió Malatión (solo una vez, vía intraperitoneal) y Maca diariamente en sus respectivas dosis y finalmente el cuarto grupo se usó como control, inyectando sólo suero fisiológico por vía intraperitoneal (solo una vez, día 0), para más tarde ser sacrificados (previa sedación con éter) a los días 1, 7, 14 y 21, respectivamente.

Evaluación histológica

Se fijaron los testículos en Bouin acuoso, e incluyeron en parafina. Posteriormente se realizaron cortes transversales ecuatoriales del testículo con un espesor de 5 μm , y teñidos con la técnica de ácido peryódico – Schiff y Hematoxilina, para luego ser observados al microscopio óptico con aumento de 1000. Se analizaron 200 túbulos por ratón, clasificándolos por estadios según la agrupación de células en el túbulo seminífero y determinando el grado de desarrollo del acrosoma.

Análisis estadístico

Se utilizó el test de ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de la comparación múltiple de Dunn, considerando el nivel $p < 0,05$ como significativo. Los resultados fueron expresados como promedios.

RESULTADOS

Día 1

Se observó una disminución de la frecuencia del estadio I en el grupo tratado con Maca al compararlo con el grupo tratado con Malatión + Maca también se observa una disminución del porcentaje en el estadio XII en los animales tratados con Malatión al compararlo tanto con el grupo control como al compararlo con el grupo Maca + Malatión (Figura 1).

Día 7

Siete días después del tratamiento se observa aumento significativo en la frecuencia del estadio VII en el grupo tratado con Malatión con respecto al control. Por otra parte, el estadio XII en el grupo tratado con Maca muestra disminución

significativa con respecto al control. Sin embargo, esta disminución es evitada en el grupo tratado con Malatión + Maca (Figura 2).

Día 14

Se observa aumento de la frecuencia de los estadios II y III en el grupo tratado con Malatión al compararlos con el grupo tratado con Maca + Malatión. Por otra parte, el estadio VIII aumenta significativamente su frecuencia en el grupo tratado con Malathion al compararlo tanto con el grupo control como con el grupo tratado con Malatión + Maca, en este último grupo se observa una inhibición del aumento de la frecuencia de este estadio encontrado en el grupo tratado solo con Malatión, lo que sugiere un efecto protector de Maca sobre la Integridad del epitelio seminífero (Figura 3).

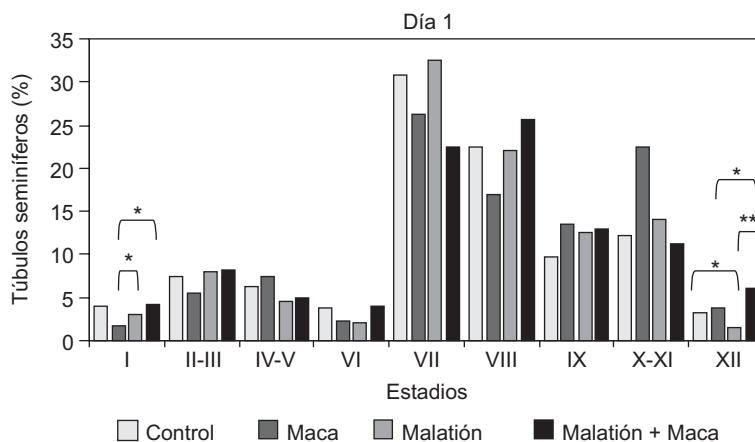


Figura 1 – Porcentaje de túbulos seminíferos de ratón cuantificados en microscopio óptico, día 1. Se observan diferencias al comparar los siguientes estadios. Estadios I Maca v/s Malatión y Maca v/s Maca + Malatión. Estadio XII Malatión v/s Control, Malatión v/s Malatión + Maca, Maca v/s Malatión + Maca. * p < 0,05; ** p < 0,01.

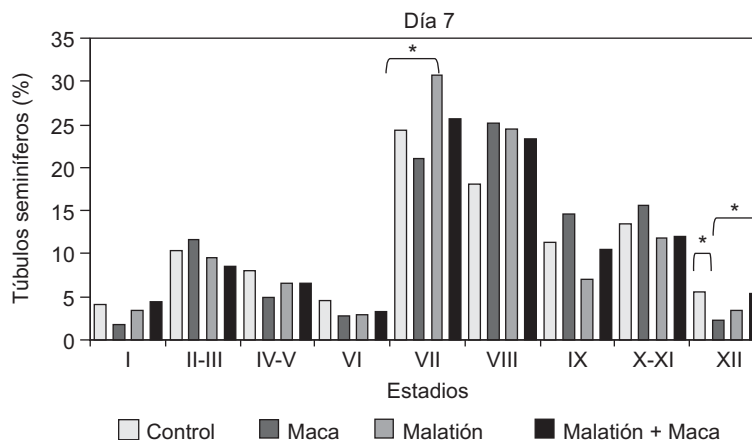


Figura 2 – Porcentaje de túbulos seminíferos de ratón cuantificados en microscopio óptico, día 7. Se observan diferencias al comparar los siguientes estadios. Estadio VII Malatión v/s control. Estadio XII Maca v/s control y Maca v/s Malatión + Maca. * p < 0,05.

Día 21

Se observa aumento de la frecuencia de los estadios II y III en el grupo tratado con Maca con respecto al grupo control como con el grupo Malatión + Maca, mostrando un efecto protector de Maca sobre este estadio, el grupo tratado con Malatión presenta aumento significativo con respecto al grupo Malatión + Maca, mientras que en el estadio VII se observa disminución de la frecuencia en el grupo tratado con Malatión

con respecto al control lo que no se observa en el grupo tratado con Malatión + Maca, sugiriendo un posible efecto protector de Maca sobre este estadio. El estadio IX muestra aumento en el grupo tratado con Malatión, lo que es evitado si se combina Malatión con Maca, y los estadios X y XI presentan aumento de la frecuencia en el grupo tratado con Maca en comparación al control, sugiriendo un efecto estimulador de Maca sobre este estadio (Figura 4).

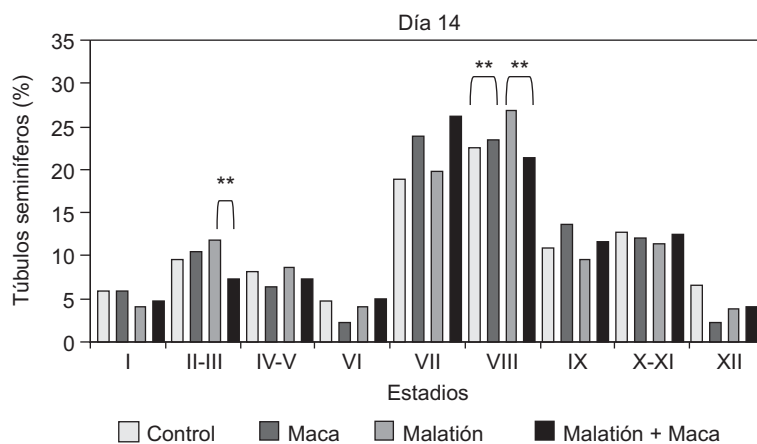


Figura 3 – Porcentaje de túbulos seminíferos de ratón cuantificados al microscopio óptico, día 14. Se observan diferencias al comparar los siguientes estadios. Estadios II y III, Malatión v/s Maca + Malatión. Estadio VIII, Malatión v/s Control y Malatión v/s o Malatión + Maca. ** $p < 0,01$.

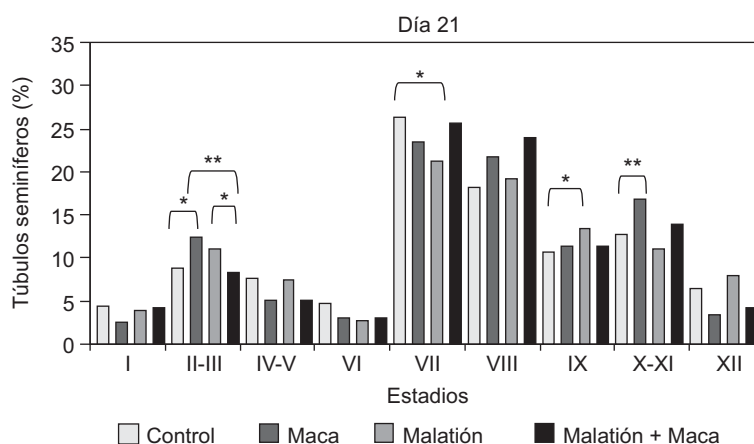


Figura 4 – Porcentaje de túbulos seminíferos de ratón cuantificados al microscopio óptico, día 21. Se observan diferencias al comparar los siguientes estadios. Estadios II y III Maca v/s Control y Maca v/s Malatión + Maca y el grupo tratado con Malatión v/s Malatión + Maca. Estadio VII Malatión v/s Control. Estadio IX Malatión v/s Control. Estadios X y XI Maca v/s control, presentan diferencias significativas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

DISCUSIÓN

Los compuestos organofosforados pueden tener efectos gonadotóxicos, induciendo una serie de alteraciones en la calidad del semen de algunos animales y del hombre, generándose de esta forma una acción deletérea sobre la espermatogénesis (Bustos-Obregón & Valenzuela, 1998). Motivados por estos antecedentes y el uso masivo de estos compuestos se planificó y realizó el presente trabajo experimental en ratones asociando un componente (Maca) que disminuiría tal efecto. Otros estudios indican que Maca (*Lepidium meyenii*) tendría un efecto protector sobre el daño gonadal provocado por diversos agentes físicos, como quedó demostrado en la investigación en ratones sometidos a hipoxia de altura, donde se evaluó la frecuencia relativa de los estados del ciclo del epitelio seminífero por la técnica de transiluminación (Bustos-Obregón *et al.*, 2005) y que se corroboran en nuestro estudio en donde Maca evitó la disminución del estadio XII producido por Malatión al día siguiente del tratamiento. La frecuencia relativa del estadio VIII fue aumentada de manera dosis dependiente en ratas tratadas con Maca considerando que la exposición a la altura redujo la espermiación (estadio VIII) en el grupo de animales que no fue tratado con Maca. En conclusión, el tratamiento de ratones con Maca previno la interrupción de la espermatogénesis inducida por la hipoxia. Otro estudio en relación con agentes físicos fue realizado en ratones sometidos a hipoxia hipobárica simulada en 4100 MSNM, confirmandose que la hipoxia ejerce efecto inhibitorio sobre las poblaciones celulares en división, en la espermatogénesis (Bustos-Obregón *et al.*, 2005).

Hay agentes químicos que se utilizaron en investigaciones de gran interés, como factores productores de daño gonadal, debido a uso masivo para distintas áreas, como ejemplo de esto tenemos los pesticidas organofosforados, que son elaborados artificialmente y aplicados para controlar las plagas de insectos. Sus características principales son su alta toxicidad, su baja estabilidad química y su nula acumulación en los tejidos, característica ésta que lo posiciona en ventaja con respecto a los organoclorados de baja degradabilidad y gran bioacumulación. Malatión es usado extensamente en todas partes del mundo, a pesar de que no se han estudiado todos sus efectos reproductivos. Bustos-Obregón & González-Hormazabal (2003) evaluaron el recuento epididimario de espermatozoides, teratozoospermia y nivel plasmático de testosterona, concluyendo que Malatión interfiere con la función testicular del ratón provocando una disminución del recuento espermático epididimario y en los niveles de testosterona y alteraciones estructurales en la morfología de las células germinales. Bustos-Obregón *et al.* (2005) utilizaron la técnica de transiluminación que consiste en observar de manera longitudinal una serie de túbulos seminíferos frescos montados "in toto", permitiendo de esta forma determinar las frecuencias relativas de los estadios

del ciclo del epitelio seminífero. Los resultados de ambos trabajos indican que algunos estadios se ven más alterados, lo que está en directa relación con aquellos que representan eventos importantes en el transcurso del ciclo espermatogénico; como lo es el estadio VIII donde se produce la espermiación, esto también ocurrió en el grupo tratado con Malatión. Sin embargo, Maca fue capaz de evitar el aumento de frecuencia en el estadio VIII a los 14 días después del tratamiento con el pesticida, lo que nos sugiere que se produce una espermiación normal.

También fue evaluado tejido testicular de ratones de 7 días de edad, tratados con el organofosforado Paratión, demostrando la disminución del peso corporal y testicular y un daño temprano de las células germinales de efecto reversible donde la recuperación se presenta a intervalos largos post-inyección (Sobarzo, 2000).

En estudios posteriores fue evaluado el efecto de Malatión en ratones adultos donde se determinaron alteraciones en la frecuencia de los estadios del ciclo del epitelio seminífero provocando daño a nivel de las células germinales, más específicamente en las espermatogonias en renovación, desencadenando efectos posteriores en el desarrollo normal de la espermatogénesis donde se observó que algunos estadios fueron más vulnerables a la acción del pesticida (Bustos-Obregón *et al.*, 2005). En conclusión, se evidenció un efecto protector de Maca sobre estadios claves de la espermatogénesis en los grupos tratados con Malatión y un efecto estimulador al día 21 sobre los estadios II-III y X y XI. Ahora nos queda por aclarar el mecanismo molecular de tales efectos sobre el epitelio seminífero.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATEF, M., YOUSSEF, S., RAMADAN, A., NAWITO, M., EL-SAYED, M. & ABDEL-RAHMAN, H., 1995, Influence of Phoxim on testicular and seminal vesicle organs, testosterone and cholinesterase level and its tissue residues in male rats. *Dtsch. Tierärztl Wochenschr.*, 102: 1-5.
- BUSTOS-OBREGÓN, E., 1998, *Andrología*. 1. ed. Editorial Universitaria, Santiago de Chile, 21p.
- BUSTOS-OBREGÓN, E., GONZÁLEZ, J. & ESPINOZA, O., 2005, Melatonin as protective agent for the cytotoxic effects of diazinon in the spermatogenesis in the earthworm *Eisenia foetida*. *Ital. J. Anat. Embryol.*, 110(2): 159-165.
- BUSTOS-OBREGÓN, E., YUCRA, S. & GONZALES, G., 2005, *Lepidium meyenii* (Maca) reduces spermatogenic damage induced by a single dose of malathion in mice. *Asian J. Androl.*, 7(1): 71-76.
- BUSTOS-OBREGÓN, E. & GONZÁLEZ-HORMAZÁBAL, P., 2003, Mice testicular damage elicited by Malathion. *Int. J. Morphol.*, 21(2): 155-159.
- BUSTOS-OBREGÓN, E., VALENZUELA, M. & ROJAS, M., 1998, Agropesticides and testicular damage. Chapter 20. In: *Male reproduction. A multidisciplinary overview*. Edited by Martínez- García and Regadera. School of Medicine, Autonoma University, Madrid, Spain. Churchill Communications Europe España.

- GONZÁLES, G., GASCO, M., CORDOVA, A., CHUNGKIN, A., RUBIO, J. & VILLEGAS, L., 2001, Effect of *Lepidium meyenii* (Maca) roots on spermatogenesis of male rats. *Asian J. Androl.*, 3: 231-233.
- HU, H., COOK-DEEGAN, R. & SHUKRIL, A., 1989, The use of chemical weapons: conducting an investigation using survey epidemiology. *Am. J. Anat.*, 262: 640-643.
- KING, S., 1987, Four endemic andean tuber crops: Promising Food Resources for Agricultural Diversification. *Moun. Res. Develop.*, 7(1): 43-52.
- MINISTERIO DE SALUD DE CHILE (MINSAL), 2002, Departamento de Epidemiología. *Situación epidemiológica de las intoxicaciones por plaguicidas*. <http://epi.minsal.cl/epi/html/vigilan/revep/intox.1998.pdf>.
- RODRÍGUEZ, H. & BUSTOS-OBREGÓN, E., 2000, An *in vitro* model to evaluate the effect of an organophosphoric agropesticide on cell proliferation in mouse seminiferous tubules. *Andrologia.*, 32: 1-5.
- SOBARZO, C. & BUSTOS-OBREGÓN, E., 2000, Sperm quality in mice acutely treated with Parathion. *Asian J. Androl.*, 2(2): 147-150.
- VAN DEN HEUVEL, M., CLARCK, D., FIELDER, R., KOUNDAKJIAN, P., OLIVER, G., PELLING, D., TOMLINSON, N. & WALTER, A., 1990, The international validation of a fixed dose procedure as an alternative to the classical LD50 test. *Food Chem. Toxicol.*, 28: 469-482.