UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

"Evaluación De La Calidad Espermática Y Del Daño Al ADN En Espermatozoides Humanos Expuestos A Compuestos Organofosforados"

T E S I S

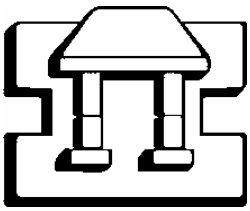
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

BIOLOGO

PRESENTA:

SALAZAR ARREDONDO ELSA

DIRECTORA: Dra. Ma. Betzabet Quintanilla Vega



Estado de México, 2006

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se llevó a cabo en la Sección Externa de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, bajo la dirección de la Dra. Ma. Betzabet Quintanilla Vega. Durante el desarrollo de este trabajo se contó con el apoyo económico del CONACyT a través del donativo No. 44643, otorgado a la Dra. Quintanilla.

AGRADECIMIENTOS

Son tantas las emociones que hoy siento, que me es difícil proyectar las palabras de agradecimiento que ustedes se merecen.

Habría querido en esta ocasión expresarme libremente, sin un texto escrito, para dejar que la riqueza del lenguaje, la esencia de éste, estuviera contenida en mis palabras. El celebre decontructivista francés Jacques Derrida plantea que en la oralidad se está más cerca del pensamiento y por lo tanto de las emociones, de las ideas y de las intenciones del hablante.

He reservado estas páginas para decirles a ustedes que me he sentido muy orgullosa de haber podido compartir con ustedes una etapa de mí vida, un periodo que para ustedes y para mí ha sido un periodo de desarrollo personal y emocional.

Les agradezco a todos ustedes su generosidad, su permanente estímulo y por sobre todo, su entrega a este sueño que han compartido conmigo. En todos ustedes he sentido afecto, confianza y aprecio. Cada uno, desde el lugar que le corresponde, ha entregado lo mejor de sí para ayudarme a concretar esta tarea.

Las palabras del diccionario se agotan cuando queremos expresar lo que más profundamente anhelamos; las emociones y sentimientos que están en nuestro interior y que quieren emerger para compartir el mundo que nos une. Es por eso que solo puedo decirles gracias, muchas gracias, soy grandemente privilegiada al conocer a cada uno de ustedes sin preferencia ni distinciones.

Muy sinceramente agradezco la meritoria intervención brindada por mi directora de tesis la **Dra. Ma. Betzabet Quintanilla Vega** quien me ha facilitado en todo momento consejos y orientaciones brillantes, por todo el apoyo académico y moral que me brindó y por el impulsó de continuar hoy y en lo venidero.

Quiero mostrar mi agradecimiento a los estimables sinodales en la elaboración de la presente tesis **Dr. Martín Palomar Morales**, **Biol. José Del Carmen Benítez Flores**, **M. en C. Irma Delfín Alcalá** y **M. en C. Carmen Álvarez Rodríguez** por brindarme su tiempo, asesorías y sus aportaciones para este trabajo final.

A la **auxiliar M. en C. María de Jesús Solís Heredia** y a la **Dra. Aurora Rojas García** por el apoyo técnico; por ser mis guías experimentales, gracias por todas aquellas enseñanzas y llamadas de atención, por su amistad, ya que sin ustedes no hubiese efectuado este trabajo, mi más sincero agradecimiento.

A la **M. en C. Norma Pérez Herrera** y familia por que al formar parte de su equipo de investigación comprendí el valor del esfuerzo y la dedicación.

Al **Q.F.B. Víctor Hugo Rosales García** por su apoyo en el manejo del equipo de citometría de flujo, y sobre todo por su amistad y paciencia.

Al **técnico laboratorista Gerardo Martínez Aguilar** por su apoyo técnico, amistad y comprensión.

A la **M. en C. Belem Piña Guzmán** y familia (que ahora cuenta con una nueva integrante), gracias por ofrecer tan pertinentes y apreciables aportaciones orientados en la dirección del objeto de estudio y en otras áreas, por tu sensibilidad y por ser tan genuina.

A la **Dra. Isabel Hernández Ochoa** por su oportuna enseñanza y consejos para llevar a cabo la etapa de análisis estadístico del estudio.

A mis amigos y compañeros del laboratorio 5 de la Sección Externa de Toxicología-CINVESTAV: Dra. Betza, Belem, Isabel, Aurora, Mary, Norma, Mayrut, Gerardo, Hilda, Carlos, Juliana, gracias por su amistad y permitirme pasar gratos momentos en su compañía.

A los compañeros de la Sección Externa de Toxicología: Dr. Albores, Fabi, Paty, Don Raúl, Rosita, Don Humberto, Dr. Elizondo, Marco, Martha, Dr. Sierra, por tener siempre una sonrisa para mí.

Quisiera hacer mención de agradecimiento sin hacer referencia especial de quienes en esta hora sólo me llevó los buenos recuerdos y gratos momentos, mis amigos, complices y compañeros de la FES-Iztacala: Néstor, Alejandropsida, Samantoidea, Lisoettes, Chinotum, Miguel, Noé, Chava, Mónica, Marcelo, David, Lulú, Mónica, Ricardo, Israel, Tania, Becky, Diana, Héctor, Fabián, Mario, César, Carlos, Osvaldo(Zarigüeya), , guajolotas, Julio, Moisés, David, Ivette, Keyla y Fany. Y del CCH-Azcapotzalco: Isis, Janette, Mauro, Rocío, Beatriz, Vladis, Ricardo, Poncho, Zaida, Tony, Miguel, Roberto, Beto, Ismene, Norma y Luis.

No quisiera acabar el apartado de agradecimientos sin hacer mención especial de quienes nunca se han apartado de mí y quienes me han aportado lo mejor de si mismos "mi familia": Roberto, Gloria, Gerardo, Aurelio, Delia, Jaime, Caro, Bruno, Gigi, Lalo, Leticia, Gloria, Lalin, Paty, Vicente, Luisito, Gaby, Erika, Israel, Michelle, Hanis, Mir, Miri, Luis-ex, puchi y soda.

Por supuesto, a mí querida UNAM particularmente a la Facultad de Estudios Superiores Campus Iztacala por todo el soporte intelectual y las herramientas para concluir una etapa de mi carrera académica.

Al CINVESTAV –IPN por brindarme sus instalaciones, así como amigos excelentes.

Al CONACYT por el poyo económico brindado.

Al grupo de secretarias Carmelita, Cristina, Noemí e Ivonne por su apoyo tras los telones.

Todos me han brindado y proporcionado desinteresada y generosamente toda la ayuda que he requerido, han alimentado mi curiosidad personal, me han nutrido intelectualmente y me han acompañado en todo cuanto he necesitado. Sus consejos y orientaciones sabias han facilitado mi desarrollo académico, profesional y personal bajo la forma de profesores, tutores, amigos y la familia simbólica que han sido. Por sus valiosos intercambios de opinión, consejos y por haberse tomado la molestia de revisar este documento y como no, por su preocupación constante y su inestimable apoyo sobre todo en estos últimos meses.

DEDICATORIA

Con el grado académico universitario de Licenciada en Biología, quisiera honrar y dedicar tan preciado título a mi amantísimo Dios por que todos mis logros se los debo a él y por que tiene cuidado de mí vida a cada instante. A mis héroes de toda la vida mis Padres Roberto y Gloria quienes han invertido su esfuerzo en mi formación, gracias por amarme tanto. A mi nueva familia mi amado esposo Gerardo porque juntos estamos iniciando a forjar nuevas metas. A mis hermanos Delia, Lalo, Paty, Mirna, Erika y Miri, así como a sus respectivas familias, gracias por formar parte de este proyecto. A mi abuelito Aurelio y simbólicamente a todas aquellas personas que ya no se encuentran conmigo a mis abuelitos Francisca, Felisa y Teodulo.

Son muchos los nombres de tantos amigos y familiares a los que quisiera dedicar este trabajo, de los cuales no quisiera olvidar ninguno, tíos, primos, sobrinos, familia política, amigos de escuela, amigos del laboratorio, a mis profesores amigos, a mis profesores académicos y a todas aquellas personas tan significativas para mí quienes han sabido abordar con relatividad los acontecimientos de la vida cotidiana y enfocar la realidad con humor e ironía para que esta fuera más llevadera, gracias porque me han acompañado y facilitado su soporte, su apoyo alentador, su inspiración intelectual a lo largo de tantos momentos, sin los cuales, nunca hubiera podido llevar a término la presente tesis. Gracias por alimentar mi ilusión depositando su confianza, solidaridad, esperanzas y paciencia en el presente trabajo dejando al margen otras ocupaciones acaso más provechosas o lucrativas.

MUCHAS GRACIAS A TODOS USTEDES.

ÍNDICE

Agradecimientos……II
Dedicatoria……V
RESUMEN……VI
Índice de tablas……XI
Índice de figuras……XII
Lista de abreviaturas……XIII
1. INTRODUCCIÒN……1
1. 1. Plaguicidas……1
1.1.1. Usos e importância……1
1.2. Plaguicidas organofosforados (OF)……2
1.2.1. Estructura química……2
1.2.2. Categorías y usos……2
1.2.3. Toxicocinética de los OF……3
1.2.3.1. Absorción……3
1.2.3.2. Biotransformación……3
1.2.3.3. Distribución y almacenamiento……4
1.2.3.4. Eliminación……5
1.2.4. Efectos tóxicos de los OF……5
1.2.4.1. Efectos reproductivos……6
1.2.4.2. Efectos genotóxicos……6
1.3. Antecedentes de la población de estudio de la etapa *in vivo*……8
1.3.1. Exposición a plaguicidas……8
1.3.2. Daños a la salud por exposición a plaguicidas……9
1.3.3. Alteraciones en la progenie……10
1.4. JUSTIFICACIÓN……11
1.5. OBJETIVOS.……12
1.5.1. Objetivo general……12
1.5.2. Objetivos particulares……12
2. MATERIAL Y MÉTODOS……13
2.1. Reactivos……13
2.2. Diseño del estudio……13

2.2.1. Estudio *in vivo*……...13
2.2.1.1. Aplicación de cuestionarios…….14
2.2.1.2. Toma de la muestra……..14
2.2.1.3. Análisis de la calidad de semen……....14
2.2.1.3.1. Motilidad y concentración espermáticas……14
2.2.1.3.2. Morfología espermática…….…….15
2.2.1.3.3. Viabilidad espermática…….……..15
2.2.1.4. Evaluación de la condensación de la cromatina espermática……..15
2.2.1.4.1. Principio…….15
2.2.1.4.2. Procedimiento.....16
2.2.2. Estudio *in vitro*…….....18
2.2.2.1. Selección de las muestras de semen…….....18
2.2.2.2. Obtención y análisis de la muestra de semen.……...18
2.2.2.3. Preparación de las soluciones de los diferentes compuestos OF…..18
2.2.2.4. Incubación de los espermatozoides con los compuestos OF……18
2.2.2.5. Evaluación del daño a la cromatina espermática…….……..19
2.3. Análisis estadístico…….……19
2.3.1. Etapa *in vivo*…….……19
2.3.1.1. Variables de estudio…….…….19
2.3.1.2. Normalización de las variables…….……20
2.3.1.3. Análisis descriptivo…….……..20
2.3.1.4. Regresión lineal simple (análisis bivariado)…….……20
2.3.2. Etapa *in vitro*…….…….21
2.3.2.1. Variables de estudio…….....21
2.3.2.2. Análisis de varianza……...21
2.3.2.3. Regresión lineal simple (análisis bivariado)……..…21
2.3.2.4. Análisis de correlación no paramétrica de Spearman……..…..22
2.4. Preparación de soluciones….....23
3. RESULTADOS..…….…...24
3.1. Etapa *in vivo*…….…24
3.1.1. Características de la población de estudio…….……24
3.1.2. Uso de plaguicidas en la población estudiada……..…..24
3.1.3. Calidad de semen de la población estudiada……..……24
3.1.4. Estructura de la cromatina espermática de la población estudiada……....26

3.1.5. Asociación entre la exposición a plaguicidas OF y la calidad espermática y la estructura de la cromatina…….....…28
3.1.6. Asociación entre la estructura de la cromatina y la calidad de semen y las variables confusoras…..……..……..….29
3.2. Etapa *in vitro*……..….30
3.2.1. Citotóxicidad de los plaguicidas OF y sus oxones……30
3.2.2. Daño en la estructura de la cromatina espermática…….…...31
3.2.2.1. Efecto del diazinón y diazoxón……..…31
3.2.2.2. Efecto del clorpirifos y clorpirifos-oxón. …….....31
3.2.2.3. Efecto del metil paratión y paraoxón…….…33
3.2.2.4. Estimación de la concentración necesaria a la cual se puede generar un índice de fragmentación del ADN del 30%.....33
4. DISCUSIÓN……....38
4.1. La problemática respecto a la fertilidad masculina…….…....38
4.2. Efecto de los compuestos OF sobre la calidad de semen y citotoxicidad en los espermatozoides…….…..…38
4.3. Efecto de los compuestos OF sobre la estructura de la cromatina espermática……..…41
5. CONCLUSIONES..…….…....45
6. REFERENCIAS..……...…..46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Técnica de la tinción de Papanicolaou modificada para espermatozoides…….16

Tabla 2. Características de la población estudiada……25

Tabla 3. Listado de los diez plaguicidas con mayor frecuencia de uso por los trabajadores……...…...26

Tabla 4. Parámetros de la calidad de semen de la población estudiada…….27

Tabla 5. Parámetros de condensación de la cromatina espermática de la población estudiada……..27

Tabla 6. Efecto de la exposición a compuestos OF sobre la calidad espermática…….29

Tabla 7. Efecto de la exposición a compuestos OF sobre la estructura de la cromatina espermática……...30

Tabla 8. Análisis bivariado entre el parámetro de DFI% y las posibles variables confusoras……30

Tabla 9. Viabilidad espermática después de la incubación con los diferentes compuestos OF……32

Tabla 10. Relación entre los diferentes compuestos evaluados y el daño al ADN (DFI%)……....32

Tabla 11. Concentración estimada de los compuestos OF y de sus oxones para comprometer la fertilidad en humanos……...37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura1. Fórmula general de los compuestos organofosforados……...…2

Figura 2. Citograma que representa la fluorescencia roja *versus* la fluorescencia verde emitida por los espermatozoides de un individuo control……...17

Figura 3. Citogramas generadas por espermatozoides de un trabajador agrícola expuesto a plaguicidas (A) y una muestra de un individuo no expuesto a plaguicidas (B). ……..……..…….…...28

Figura 4. Efecto del diazinón y diazoxón sobre la estructura de la cromatina de los espermatozoides……...34

Figura 5. Efecto del clorpirifos y clorpirifos-oxón sobre la estructura de la cromatina de los espermatozoides……35

Figura 6. Efecto del paratión y paraoxón sobre la estructura de la cromatina de los espermatozoides…. ……36

RESUMEN

En México, uno de los grupos de plaguicidas de mayor uso en la agricultura es el de los organofosforados (OF), los cuales representan un problema de salud pública. Numerosos estudios describen un daño neurológico por la exposición a plaguicidas OF, debido a la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa por los metabolitos activos, los oxones, que se forman por la activación de los OF por enzimas del sistema de monooxigenesas (citocromos P450). Por otro lado, existen evidencias de que la exposición a plaguicidas OF altera la calidad de semen y se ha reportado que individuos expuestos a mezclas de estos plaguicidas presentan un aumento en la frecuencia de aneuploidías espermáticas y alteraciones en la estructura de la cromatina de los espermatozoides, siendo los espermatocitos y los espermatozoides en la etapa final de maduración epididimal las células blanco de los OF. En general, se ha establecido que los oxones son más tóxicos que los compuestos padres; sin embargo, se desconoce el potencial tóxico de los oxones en las células espermáticas. El objetivo del presente estudio fue evaluar la calidad de semen y el daño al ADN espermático en trabajadores agrícolas expuestos a plaguicidas OF, así como en un sistema *in vitro* en espermatozoides humanos expuestos a varios OF y sus correspondientes oxones. Se evaluó la calidad de semen (de acuerdo a la OMS) de las muestras proporcionadas por los trabajadores agrícolas (n=31, de 39 ±11 años de edad). En el estudio *in vitro,* tres donadores sanos proporcionaron las muestras de semen (con parámetros normales de calidad de semen e integridad de la cromatina), las cuales fueron incubadas con concentraciones de 50-900 µM de paratión, paraoxón, diazinón, diazoxón, clorpirifos y clorpirifos-oxón. La citotoxicidad se determinó por el porcentaje de viabilidad utilizando el método de exclusión de eosina-Y y el daño al ADN de acuerdo a la técnica de fragmentación *in situ* del ADN (SCSA, parámetro DFI%= DNA Fragmentation Index). Los resultados obtenidos indicaron que los trabajadores agrícolas presentaron parámetros anormales de la calidad de semen, principalmente en morfología, volumen y motilidad (100%, 36% y 21% de anormalidad, respectivamente); sin embargo no se asociaron con los indicadores de exposición a plaguicidas OF. En cuanto al daño genético, si se observó una asociación positiva entre los indicadores de exposición a OF y el daño al ADN espermático (parámetro DFI%), apoyando el potencial genotóxico de los OF. Por otra parte, en el sistema *in vitro,* considerando la concentración necesaria para generar un 30% de fragmentación del ADN (valor de DFI% al cual se compromete la fertilidad), se observó el siguiente orden de genotoxicidad: paraoxón> paratión> clorpirifos-oxón> clorpirifos> diazoxón>

diazinón. La diferencia del efecto entre los compuestos padres y sus oxones fue desde 15% más genotóxico el clorpirifos-oxón que el clorpirifos hasta casi 10 veces más tóxico el paraoxón que el paratión. El grado de citotoxicidad de los OF fue muy similar. Estos resultados indican que los oxones tienen mayor efecto cito- y geno- tóxico sobre los espermatozoides maduros que los compuestos padres y que el par paratión-paraoxón resultó el más tóxico de los compuestos evaluados. Nuestros resultados demuestran que aún la cromatina de los espermatozoides maduros es susceptible de sufrir daño por la exposición a plaguicidas OF, lo cual puede contribuir a los problemas de reproducción masculina que se observan en individuos expuestos a estos compuestos.

1. Introducción

1.1. Plaguicidas

Los plaguicidas son sustancias químicas de origen natural o sintético, que se usan solos o en mezcla para combatir malezas, enfermedades o plagas (virus, bacterias, hongos, nemátodos, ácaros, moluscos, insectos, roedores, etc.), potencialmente capaces de causar efectos tóxicos en organismos (FAO, 1986; Hayes, 1991). Existen cientos de compuestos químicos que actúan como plaguicidas, los cuales pueden ser clasificados por diferentes criterios como son el tipo de organismo al que se desea controlar (insecticidas, acaricidas, funguicidas, rodenticidas, etc.), según su estructura molecular es común agruparlos en: organoclorados, carbamatos, organofosforados, piretroides, etc. Por otra parte, con base en el daño potencial que los plaguicidas pueden causar a la salud humana, es posible clasificarlos en uno o varios de los siguientes grupos: inhibidores de la colinesterasa, disruptores endocrinos y alteradores del sistema inmune (Rivero *et al*., 2001).

1.1.1. Usos e importancia

Actualmente, los plaguicidas sintéticos para el control de diversas plagas, tanto en el área agrícola como en la sanitaria, tienen una utilización masiva; esto ha traído beneficios para la población, pero ha provocado problemas de salud, así como contaminación del ambiente. En nuestro país, los plaguicidas presentan un amplio uso, ya que están incorporados en actividades de salud pública, siendo el sector agrícola donde más se utilizan (Hayes, 1991).

Debido al importante crecimiento poblacional, la producción y conservación de alimentos se ha convertido en una de las mayores preocupaciones de los gobiernos, en tanto que la población pide mejor calidad y cantidad de los productos que consume. El esfuerzo que se necesita para satisfacer ambas demandas se incrementa conforme la población solicita productos totalmente libres de bacterias y de apariencia agradable (Primo y Carrasco, 1990). Entre los factores que limitan la producción agrícola y la calidad de las cosechas, están las enfermedades y las plagas, las cuales pueden atacar a los cultivos desde que las plantas inician su crecimiento. Por otra parte, las enfermedades transmitidas por vectores son un problema importante de salud pública en el país (Albert, 1986).

En la actualidad, se usan más de 15, 000 tipos de plaguicidas en todo el mundo, de los cuales la mayor parte ha demostrado presentar toxicidad en los seres humanos (Hayes, 1991). El

impacto negativo a la salud ocasionado por la exposición a estos químicos, tanto a través del contacto físico directo durante la aplicación, como por medio de la ingestión de residuos en agua potable y hortalizas, ha sido ampliamente reportado en la literatura (OMS, 1990).

1.2. Plaguicidas Organofosforados (OF)

1.2.1. Estructura química

Los compuestos OF son ésteres, amidas o tioderivados de los ácidos fosfórico, fosforotioico o fosfonotioico (Figura 1) (OMS, 1990). Cuando el átomo que se une al fósforo con el doble enlace es el oxígeno, el compuesto se denomina "oxon", el cual es un potente inhibidor de la acetilcolinesterasa (AChE), aunque con el oxígeno en esta posición se favorece la hidrólisis del compuesto, especialmente bajo condiciones alcalinas. Para hacerlos más resistentes a la hidrólisis, se sustituye al oxígeno por un átomo de azufre, estos compuestos son llamados "tiones" y son pobres inhibidores de la AChE. Estos son convertidos a sus correspondientes oxones por acción de las enzimas microsomales del hígado (Hayes, 1991).

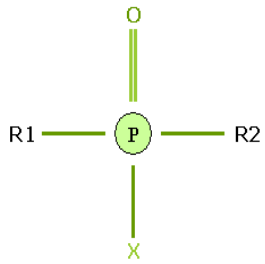


Figura 1. Fórmula general de los compuestos organofosforados.

1.2.2. Categorías y usos

Los OF se clasifican según su fórmula general en cuatro categorías, de acuerdo con el carácter del grupo sustituyente X: Categoría I (X contiene un nitrógeno cuaternario), constituido por la fosforilcolina, son los mas tóxicos y no se usan como insecticidas. Categoría II (X es flúor), constituido por los fluorofosfatos, son muy volátiles y son usados como gases de guerra. Categoría III (X es un grupo CN, OCN, SCN u otro halógeno que no sea flúor), utilizados también como gases de guerra y no como insecticidas. Categoría IV (X es otra molécula distinta de las anteriores), incluye a la mayoría de los compuestos utilizados como insecticidas, y estos a su vez se dividen en 8 subgrupos en relación con los sustituyentes R1 y R2.

En general, los compuestos OF tienen usos como insecticidas, nematicidas, herbicidas, funguicidas, plastificantes y fluidos hidráulicos (en industria) y como armas químicas (Hassall, 1990). Los insecticidas, son el grupo de plaguicidas de mayor uso y entre estos, los OF como el metil paratión, malatión, diazinón, clorpirifos, metamidofos, fenitrotión, diclorvos y propetamfos, se encuentran en las listas de mayor uso ocupacional (INEGI, 1990; OMS, 1991).

1.2.3. Toxicocinética de los OF

1.2.3.1. Absorción

Los OF se absorben por vías respiratoria, dérmica, digestiva y conjuntival. La velocidad de absorción dérmica depende de la región y superficie corporal expuesta y del tiempo de contacto con la piel, así como de las características lipofílicas y volátiles del compuesto y de la presencia de compuestos solventes que faciliten el proceso. La absorción dérmica es muy lenta, pero debido a que los OF son difíciles de remover, generalmente se prolonga; la absorción por esta vía aumenta a altas temperaturas y se incrementa con la presencia de afecciones como dermatitis, llagas, cortaduras o cualquier laceración en la piel. La exposición ocupacional es más frecuente por vía dérmica y pulmonar y la ingestión es más común en casos de envenenamiento accidental o por suicidio (Gallo, 1991; Jokanovic, 2001; OMS, 1986).

1.2.3.2. Biotransformación

Una vez absorbidos, los OF sufren una compleja pero rápida biotransformación que se lleva a cabo principalmente en el hígado por tres tipos de enzimas: a) oxidasas, constituidas por la familia del citocromo P450 (CYP450), b) hidrolasas y c) transferasas. La familia del CYP450 lleva a cabo reacciones de desulfuración oxidativa o monooxigenación (activación) del grupo tiofosfato, la cual da lugar a la transformación del compuesto padre a sus correspondientes ésteres de fosfato, generando metabolitos más tóxicos (oxones) que los compuestos originales, los cuales son responsables de la inhibición de la enzima AChE. Una vez formados los oxones, éstos son hidrolizados por A-esterasas (hidrolasas) a compuestos más hidrosolubles. Dentro de las A-esterasas se encuentra la paroxonasa (PON1). Este tipo de reacción es considerada como el mecanismo principal de desactivación de los OF. Por otra parte, las glutatión-S-tranferasas son un grupo de enzimas que llevan a cabo la conjugación del glutatión con el producto de la reacción de monooxigenación, o directamente con los compuestos padre (Jokanovic, 2001). En estudios

recientes se han descrito diversas isoformas del CYP450 que participan en la bioactivación de compuestos OF en humanos, entre ellas el CYP1A2, CYP3A4, CYP2B6, CYP2D6 y CYP2C19 (Buratti *et al*., 2003; Mutch *et al*., 2003). También, se ha propuesto que las enzimas del CYP450 aunque en menor proporción, pueden llevar a cabo reacciones de desarilación, generando los metabolitos p-nitrofenol y el ácido dietilfosfórico (Jokanovic, 2001).

Las reacciones de desactivación consisten básicamente en la ruptura de los enlaces en los que participa el fósforo con la liberación de grupos cargados negativamente y que son incapaces de inhibir a la AChE. En estas reacciones se forman metabolitos no tóxicos, los radicales acilo u otros que son liberados generalmente contienen grupos hidroxilo, amino o tiol que fácilmente pasan de la fase de activación a la fase de reacciones de conjugación, para ser excretados (Jokanovic, 2001). La desactivación de los oxones ocurre principalmente por reacciones de oxidación e hidrólisis por enzimas del tipo carboxilesterasas y fosfodiesterasas como la PON1. Esta es una enzima A-esterasa polimórfica que tiene como función participar en el metabolismo de los lípidos y al mismo tiempo, participa en el metabolismo de los OF, desactivándolos mediante su hidrólisis (Jokanovic, 2001; Sogorb y Vilanova, 2002).

1.2.3.3. Distribución y almacenamiento

Una vez que entran en el organismo, el tiempo de vida media de los OF y de sus productos de biotransformación es relativamente corto, aproximadamente de 12 a 100 h. Estos compuestos tienen un elevado volumen de distribución en los tejidos; en ratones, se ha observado una acumulación en la grasa cervical, paredes gástricas e intestinales, tiroides, bazo, pulmones y en glándulas salivales y en menor grado en hígado y riñón (Gallo, 1991). Un estudio realizado en un individuo de 48 años que falleció por la ingestión de paratión (250 ml) reporta la distribución de este compuesto en el humano: la grasa contenía la mayor concentración del insecticida (22.9 nmol/g de tejido húmedo), seguido del riñón (1.02 nmol/g de tejido húmedo), músculo (0.71 nmol/g de tejido húmedo), contenido ileal (0.45 nmol/g de tejido húmedo), cerebro (0.36 nmol/g de tejido húmedo), plasma (0.35 nmol/g de tejido húmedo), corazón (80.1 nmol/g de tejido húmedo) y pulmones (0.09 nmol/g de tejido húmedo). En el hígado no se detectó al insecticida (Eyer *et al*., 2003).

1.2.3.4. Eliminación

Durante el proceso de desactivación de los OF se da la formación de metabolitos específicos de cada compuesto y generalmente del tipo dialquilfosfatos, que pueden o no estar conjugados con glutatión o sulfato para finalmente ser excretados en su mayoría por medio de la orina, ya que en menor proporción son eliminados por heces fecales y por vía respiratoria (OMS, 1986).

1.2.4. Efectos tóxicos de los OF

La causa más frecuente de intoxicación por estos productos es por manipulación sin medidas de protección adecuadas en el medio laboral (en el proceso de fabricación, transporte, almacenaje, aplicación, etc.). Los casos graves de intoxicación se producen por vía oral tras ingesta voluntaria o accidental (en este caso por contaminación del alimento o del agua). Los OF desarrollan su acción tóxica sobre diferentes órganos y sistemas: sistema nervioso, hígado, corazón, riñón, médula ósea y pulmón (INEGI, 1990).

Los plaguicidas tienen efectos agudos y crónicos en la salud, entendiendo por intoxicaciones agudas, aquellas vinculadas a una exposición de corto tiempo, con daños sistémicos o localizados y por crónicas las manifestaciones o patologías vinculadas a la exposición a bajas dosis por largo tiempo (Hayes, 1991). La información acerca de los efectos crónicos en la salud por la exposición a plaguicidas no es concluyente, pero existe evidencia de que muchos plaguicidas son potentes compuestos carcinogénicos, causantes de daños en el sistema neurológico, expresados como neuropatías periféricas y trastornos neuroconductuales; daños en los sistemas inmunológico, respiratorio y dermatológico; e incluso, alteraciones a nivel del sistema reproductivo como esterilidad, malformaciones congénitas y mutagénesis (Ecobichon *et al.,* 1990; OMS, 1990).

Los daños a la salud ocasionados por los plaguicidas OF están relacionados principalmente con su capacidad para inhibir la actividad de las colinesterasas en las terminaciones nerviosas, específicamente la AChE, mediante inhibición competitiva por la fosforilación de un residuo de serina del sitio activo de la enzima, con manifestaciones diversas (Hassall, 1990). Esta inhibición en el tejido nervioso propicia signos y síntomas que mimetizan los efectos muscarínicos y nicotínicos de la acetilcolina. Existe una variación importante en la capacidad de los compuestos OF de inhibir a la AChE; se ha reportado que el grado de inhibición está relacionado con las características de partición agua-lípido de los OF (OMS, 1991).

1.2.4.1. Efectos reproductivos

Existe numerosos estudios sobre los daños neurotóxicos generados por los compuestos OF en los humanos, en contraste, hay muy poca información de los efectos de los OF sobre la salud reproductiva humana, específicamente la del sistema reproductivo masculino. Recientemente, se ha reportado el incremento de anomalías en el tracto reproductivo masculino y se cree que entre los factores que han desarrollado estos cambios, se encuentran los plaguicidas (Golden *et al.*, 1999).

Entre los escasos estudios de toxicidad relacionados con la salud reproductiva masculina por exposición a OF, encontramos estudios *in vitro* incubando espermatozoides humanos con diferentes concentraciones de paratión y su metabolito paraoxón. Estos estudios sugieren una acción directa de ambos compuestos sobre los parámetros morfológicos y funcionales de los espermatozoides; se observaron alteraciones en la viabilidad y motilidad espermáticas, en la condensación de la cromatina, en la capacidad de fertilización, incremento de anormalidades morfológicas espermáticas, además de alteración en la proliferación de las células germinales (Contreras *et al.,* 1999; Rodríguez y Bustos-Obregón, 2000). Existe evidencia de que los OF y otros plaguicidas pueden alterar la espermatogénesis (Mathew *et al.*, 1992; Pandey *et al.,* 1990; Russo y Levis, 1992). En el estudio de Mendívil *et al*. (2004) en trabajadores del control de plagas, evaluaron las características del líquido seminal y cuantificaron en el semen los plaguicidas de mayor frecuencia de uso, encontrando alterados principalmente los parámetros de motilidad, viabilidad y concentración espermáticas.

Estudios *in vivo* muestran los efectos causados por compuestos OF administrados en ratones: los estudios de Contreras *et al.* (1999), al igual que Sobarzo y Bustos-Obregón (2000), indicaron una disminución en el número de espermatozoides y alteraciones morfológicas en los mismos. De la misma forma, Piña-Guzmán *et al.* (2005) observaron una disminución en la viabilidad y motilidad de los espermatozoides, así como alteraciones de la morfología de los mismos en ratones expuestos al diazinón.

1.2.4.2. Efectos genotóxicos

La estructura de la cromatina espermática es un factor relevante en la reproducción, ya que la cromatina puede ser potencialmente dañada a lo largo de su desarrollo en cualquier parte del aparato reproductor masculino, comprometiendo así la fertilidad y al mismo tiempo, el desarrollo

de su descendencia. Durante los últimos estadios de la espermatogénesis de mamíferos, la estructura de la cromatina es completamente reorganizada en una serie de pasos consecutivos que incluyen la remoción de las histonas nucleares, siendo reemplazadas por las protaminas, proteínas básicas ricas en residuos de cisteína, que empaquetan al DNA (Balhorn, 1989). Durante el transporte de los espermatozoides por el epidídimo, ocurre la oxidación de los grupos tiol, formando puentes disulfuro que estabilizan a la cromatina en una estructura muy compacta (Bedford y Calvin, 1974). Diversos estudios han relacionado las alteraciones en la estructura de la cromatina espermática con una disminución de la fertilidad humana (Evenson *et al*., 2000; Spano *et al*., 1998). De esta manera, la alteración en la estructura de la cromatina espermática parece ser un indicador sensible de la función reproductiva masculina.

Algunos plaguicidas o sus metabolitos electrofílicos (los oxones) originados en el proceso de biotransformación, pueden interactuar con los centros nucleofílicos del DNA y/o proteínas y ocasionar cambios en su estructura, formando aductos e intercalaciones. Si estas lesiones en el DNA no son reparadas adecuadamente, los daños después de una división celular pueden expresarse como mutaciones (Hoyos, 2001). Algunos compuestos OF han sido descritos como potentes agentes alquilantes del DNA (Eto y Ohkawa, 1970). Estudios *in vivo* han reportado alteraciones citogenéticas inducidas por plaguicidas OF, lo cual es una evidencia de que algunos de estos tóxicos pueden inducir alteraciones sobre el DNA y por consiguiente, en la expresión genética (Behera y Bhunya, 1989; Chen *et al.*, 1981; Salvadori *et al.*, 1988; Vijayaraghavan y Nagarajan, 1994; Wyrobeck y Bruce, 1975). En un estudio con cultivo de células de mamífero, se reportó que la exposición a OF se asocia con un aumento de intercambio de cromátides hermanas (ICH) (Chen *et al*., 1981). Por otro lado, en linfocitos humanos, se ha observado que la exposición a estos compuestos ocasiona un aumento de ICH y de aberraciones cromosómicas (AC) (Balaji y Sasikala, 1993). También existen estudios en los que no se han encontrado estas asociaciones (Rupa *et al*., 1990). Finalmente, se han estudiado los efectos genotóxicos de diferentes OF en células somáticas de mamíferos; sin embargo, la información sobre sus efectos en células germinales es muy limitada.

Se han llevado a cabo estudios sobre la genotoxicidad que causan los OF sobre los espermatozoides de trabajadores ocupacionalmente expuestos. El estudio realizado por Sánchez-Peña *et al.* (2004) sugiere que la cromatina del espermatozoide es blanco de la exposición a OF. Este estudio reportó que el 75% de las muestras de semen estudiadas presentaron un índice

incrementado de fragmentación del DNA de los espermatozoides (parámetro DFI% >30%). Por otro lado, Padungtod *et al.* (1999) llevaron a cabo un estudio en trabajadores chinos ocupacionalmente expuestos a plaguicidas OF, quienes presentaron un riesgo mayor de presentar aneuploidías en los espermatozoides respecto al grupo control; resultados similares fueron observados en el estudio de Recio *et al.* (2001), el cual se realizó con agricultores expuestos a OF en el área de La Comarca Lagunera, México, reportando la ausencia del cromosoma sexual o nulosomía, como la alteración más frecuente.

Por otro lado, en estudios realizados en poblaciones ocupacionalmente expuestas, incluyendo trabajadores de la industria manufacturera de agroquímicos, aplicadores de plaguicidas, floricultores y agricultores, se ha encontrado una asociación significativa entre la exposición ocupacional a mezclas complejas de plaguicidas y la presencia de AC, ICH y MN en linfocitos. Páldy *et al.* (1987) estudiaron a un grupo de trabajadores expuestos ocupacionalmente a 80 compuestos diferentes y encontraron un aumento de AC; resultados similares fueron observados por Dulout *et al*. (1985), quienes estudiaron a un grupo de floricultores expuestos a compuestos OF, OC y carbamatos. Sin embargo, existen estudios en los que no se ha encontrado esta asociación (Bolognesi, 2003; De Cassia *et al*., 1982).

1.3. Antecedentes de la población de estudio de la etapa *in vivo*.

1.3.1. Exposición a plaguicidas

En México, la utilización de plaguicidas se lleva a cabo principalmente en los cultivos de frutas y hortalizas, así como en el maíz, caña de azúcar, algodón y papas, para lo cual los fungicidas seguidos de los insecticidas son el tipo de plaguicidas mas utilizados, y dentro de estos encontramos a los compuestos de la familia de los OF, que son los de mayor aplicación para dichas actividades (FAO, 1986).

Una de las principales actividades económicas del estado de Yucatán es la agricultura, la cual requiere de la aplicación de productos químicos para mejorar la producción. Hasta hace apenas nueve años no existía un estatuto para el correcto uso de los agroquímicos, fue en 1997 cuando se dio a conocer el Programa Gubernamental Chaac, cuyo principal objetivo es fomentar el cultivo de cítricos y frutales (Paz, 1997).

En 1994, de los plaguicidas empleados en la horticultura y citricultura en las dos zonas más productivas de Yucatán, la región noreste y el "Cono Sur", el 62% de ellos estaban

registrados en la lista de productos químicos prohibidos publicada por la organización de las naciones unidas (ONU). El 46% de los horticultores fumigaba por lo menos una vez a la semana, el 38% los aplicaba dos veces por semana y el 16% tres veces o más veces por semana (Alvarado *et al.*, 1994). González y Alvarado en 1996, encontraron que los OF se encontraban entre los plaguicidas más utilizados por los horticultores del estado de Yucatán.

En el municipio de Muna, Yuc., se cultivan en su mayoría hortalizas y cítricos, los cuales son atacados por diferentes plagas en diversas estaciones del año; por ejemplo, la mosquita blanca se presenta en los meses de marzo a junio y disminuye en temporada de lluvias (julio a agosto), conservándose después baja hasta el mes de febrero; es combatida aplicando plaguicidas OF como el metil paratión, malatión, diazinón, clorpirifos y metamidofos. Aunque pareciera existir un ciclo agrícola en la región con periodos de máxima y mínima aplicación de plaguicidas, durante todo el año la mayoría de los trabajadores permanecen expuestos permanentemente a plaguicidas, entre estos los OF (Comunicación personal de los agricultores locales, 2005).

1.3.2. Daños a la salud por exposición a plaguicidas

El estudio de Alvarado y González (1993) realizado en el municipio de Muna (región perteneciente al "Cono Sur" del estado de Yucatán), reflejó que el 28% de los trabajadores agrícolas presentaba síntomas neurológicos de leves a moderados (razón por la cual no acuden al médico) y el 1.65% muestra intoxicación aguda severa por OF; el 4.9% presentó niveles de AChE 25% menores del nivel normal. Se ha descrito también un elevado porcentaje de horticultores con exposición crónica con cuadros de intoxicación aguda, esta exposición constante causa poca recuperación de la AChE.

Recientemente, Medina (2001) estudió el perfil clínico y epidemiológico de las intoxicaciones y encontró que de las intoxicaciones ocupacionales el mayor porcentaje correspondió a campesinos (25%), con el mayor número de casos en sujetos en edad reproductiva, de 18 a 55 años. Durán-Nah y Collín-Quintal (1999) reportaron que del 33% de los ingresos hospitalarios por intoxicación aguda por plaguicidas en el H. Hospital General "Agustín O'Horan" de la SSA en Mérida, Yuc., fue por OF, siendo el 21% de las intoxicaciones por exposición ocupacional.

1.3.3. Alteraciones en la progenie

En el estado de Yucatán, las malformaciones congénitas son la segunda causa de mortandad infantil (INEGI, 2003). En el municipio de Muna, González (1999) observó un aumento en la frecuencia de ICH en linfocitos de trabajadores agrícolas expuestos, comparado con un grupo control. Recientemente, en un estudio realizado en el municipio de Muna por Uh (2004), se encontró que el 36% de las esposas de los agricultores expuestos a OF había tenido al menos un aborto y el 41% presentó parto pre-término, comparado con el grupo control (11% y 6%, respectivamente); conviene mencionar que el 65% de los agricultores se encuentra en edad reproductiva (19-49 años).

1.4. Justificación

En México y América Latina, la información que existe sobre los efectos de los plaguicidas sobre la salud, entre ellas, la reproductiva masculina, es relativamente limitada. Actualmente, estudios epidemiológicos consideran a los insecticidas OF como uno de los principales responsables de las intoxicaciones agudas mortales. Asimismo, se ha sugerido que la exposición a plaguicidas OF, tanto ambiental como ocupacional, ha contribuido a disminuir la concentración y calidad espermática, incluyendo alteraciones en la estructura de la cromatina de los espermatozoides. Entre los efectos genotóxicos producidos por los plaguicidas OF en las células germinales masculinas se pueden citar, el aumento del índice de fragmentación del DNA y de la tasa de aneuploidías en espermatozoides, que se traducen en posibles daños congénitos irreversibles.

La agricultura es una actividad económica importante en México, por lo que el uso de plaguicidas tiene indudablemente un papel importante en la obtención de más y mejores cosechas. No obstante, el uso inadecuado de estos compuestos puede traducirse en riesgos de intoxicaciones severas y problemas en la salud. Al respecto, en Yucatán se han observado problemas de salud reproductiva en los trabajadores agrícolas expuestos a plaguicidas, entre ellos los OF, como abortos, partos pre-término y menor número de embarazos en las esposas de los trabajadores.

La exposición a plaguicidas y en particular a los compuestos OF, representa un riesgo potencial no sólo por los efectos a corto plazo, sino también por los efectos a largo plazo, como los genotóxicos, de los cuales aún no hay información suficiente. Por lo anterior, es importante evaluar el efecto de los plaguicidas, como los OF, sobre la calidad de semen y el DNA espermático, para conocer la participación paterna en los problemas de fertilidad y en la progenie.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

Evaluar la calidad espermática y el daño al DNA en espermatozoides humanos expuestos a compuestos OF.

1.5.2. Objetivos particulares

1.5.2.1 Evaluar la calidad espermática de trabajadores agrícolas expuestos a plaguicidas OF.

1.5.2.2 Determinar el daño al DNA de espermatozoides humanos por exposición ocupacional a plaguicidas OF.

1.5.2.3. Cuantificar el daño al DNA de espermatozoides humanos en un sistema *in vitro* con diferentes compuestos OF.

2. Material y métodos

2.1. Reactivos.

De Sigma Chemical, Co. (St Louis, MO, EUA) se compró: DMSO, glutaraldehído, albúmina sérica bovina, formaldehído, $CaCl•2H_2O$, eosina Y, estreptomicina, penicilina, EDTA, piruvato de sodio y sales de hepes. De J. T. Baker S.A. de C.V. (Ecatepec, Edo. de Mex.) se adquirieron: $NaHCO_3$ y KH_2PO_4. Los compuestos: NaCl, lactato de sodio, glucosa monohidratada, fosfato de sodio, ácido cítrico, KCl, NaOH, HCl y etanol fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania); el Tris-base se compró en BIO-RAD (Hércules, CA, EUA); el diazinón, diazoxón, clorpirifos, clorpirifos-oxón, paratión y paraoxón al 99% de pureza, grado técnico, de Chem Service (West Chester, PA, USA); la naranja de acridina de Amersham Life Science (CA, EUA); el colorante Papanicolaou OG-6 de Omnichem (Puebla, Pue); el colorante EA-50 y hematoxicilina de Harris (fueron donados generosamente por el IMSS, México, D.F.); el Triton-X100, de Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI, USA). El medio de montaje Cytoseal^{TM}60 de Richard-Allan Scientific (Apogent Suwanee, GA, USA).

2.2. Diseño del estudio.

Este estudio se realizó en dos etapas, una etapa *in vivo* en trabajadores agrícolas expuestos a plaguicidas OF y una segunda fase que constó de la exposición en un sistema *in vitro* de espermatozoides humanos a diferentes concentraciones de los compuestos OF metil paratión y paraoxón (500, 750 y 900 μM), clorpirifos y clorpirifos-oxón (300, 500, 750 y 900 μM), y diazinón y diazoxón (50, 300, 500 y 750 μM).

2.2.1. Estudio *in vivo*.

Se realizó un estudio de tipo transversal en los meses de febrero y marzo de 2005, invitando a participar a los trabajadores agrícolas del sexo masculino del municipio de Muna, Yuc., entre 18-55 años de edad. Los participantes firmaron una carta de consentimiento informado y posteriormente se les aplicó un cuestionario estructurado. El número de participantes que aceptaron participar y cumplieron con los criterios de inclusión (entre 18-55 años y que fueran trabajadores agrícolas) fue de 31. Los criterios de exclusión fueron: no estar dentro del rango de edad, haberse realizado la vasectomía y/o tener alguna enfermedad que limitara la toma de la muestra.

2.2.1.1. Aplicación de cuestionarios.

Previo a la recepción de las muestras, se aplicó un cuestionario estructurado por personal capacitado a los trabajadores agrícolas que aceptaron participar, para conocer la edad, hábitos alimenticios, historia laboral (uso y exposición a plaguicidas OF), historia clínica, historia reproductiva, características socioeconómicas, consumo de fármacos, tabaco y alcohol. Este estudio fue a probado por el Comité de Bioética para estudios en humanos del CINVESTAV (COBISH).

2.2.1.2. Toma de la muestra.

Se solicitó una muestra de semen de cada participante, obtenida por masturbación, cumpliendo con el requisito de tres días de abstinencia sexual y medidas de higiene para su obtención en un contenedor estéril (proporcionado para ese fin).

2.2.1.3. Análisis de la calidad de semen.

La muestra se evaluó durante la primera hora y media después de su colecta, una vez que la muestra licuó por completo. Se evaluaron los parámetros de tiempo de licuefacción, volumen del eyaculado, concentración espermática y los porcentajes de viabilidad, motilidad y morfología, según los criterios propuestos por la OMS (2002).

2.2.1.3.1. Motilidad y concentración espermáticas.

La motilidad y concentración espermáticas se evaluaron en un equipo automatizado “SQA IIC-P” (Medical Electronic System Ltd). El SQA IIC-P opera en base a la conversión de una fuente de luz en una señal eléctrica de la siguiente manera:

Paso 1: Se introduce un capilar (0.30 mm) con la muestra de semen en la cámara óptica del equipo. Cuando se inicia el análisis digitalmente, se activa una fuente de luz y pasa a través del capilar a un receptor óptico. La luz se transmite a continuación a un detector que convierte la luz en señales eléctricas.

Paso 2: Las señales eléctricas se digitalizan y se envían a una computadora interna que traduce estas señales con base en un algoritmo interno.

Paso 3: Reporte de los siguientes parámetros del semen:

- Concentración total de espermatozoides: el número de espermatozoides en millones/ml.

- Motilidad progresiva: porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva.

2.2.1.3.2. Morfología espermática.

Se realizó de acuerdo al método de Papanicolaou modificado para espermatozoides (OMS, 2002). Se realizó un frotis con 10 μL de la suspensión espermática y se fijaron las células con tres inmersiones en una solución de etanol-ácido acético (3:1, v/v) y posteriormente se realizó la tinción como se describe en la Tabla 1. Se evaluó la anormalidad de la cabeza, parte media y cola espermática contando 200 células por duplicado, con un CV < 5%.

2.2.1.3.3. Viabilidad espermática.

La viabilidad de los espermatozoides se evaluó en fresco por medio del método de exclusión de Eosina Y al 0.5% en solución fisiológica, el cual se basa en que las células muertas cuyas membranas plasmáticas están dañadas permiten la entrada del colorante. Se evaluaron 100 espermatozoides por microscopía de luz y se diferenciaron los espermatozoides vivos (no coloreados) de los muertos (coloreados). Los resultados se expresaron en porcentaje.

2.2.1.4. Evaluación de la condensación de la cromatina espermática.

Se utilizó la técnica de citometría de flujo descrita por Evenson y Melamed (1983) como *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA).

2.2.1.4.1. Principio.

La técnica SCSA consiste en someter a estrés químico a los espermatozoides por medio de una solución ácida y posteriormente incubarlos con el fluorocromo naranja de acridina (NA). El NA posee propiedades metacromáticas que le otorgan la característica de emitir fluorescencia verde o roja de acuerdo a su unión con el DNA: cuando el NA interactúa con la hebra doble del DNA emite una fluorescencia verde que representa al DNA no desnaturalizado, y cuando el NA interactúa con la hebra sencilla emite una fluorescencia roja que representa al DNA desnaturalizado. En la Figura 2 se muestra un citograma de una muestra de espermatozoides de un individuo control. En el presente estudio fueron analizados los parámetros relacionados con la desnaturalización del DNA espermático: el Índice de fragmentación del DNA (porcentaje y

media). En porcentaje (DFI% representa el daño al DNA) y la media (Media de DFI representa el grado de condensación de la cromatina).

Tabla1. Técnica de la tinción de Papanicolaou modificada para espermatozoides.

Solución	Inmersiones [a]
Etanol 80%	10
Etanol 70%	10
Etanol 50%	10
Agua destilada	10
Hematoxilina de Harris	3[b]
Agua corriente	3-5[b]
Etanol acidulado	2
Agua corriente	3-5
Solución de Scout	4[b]
Agua destilada	1
Etanol 50%	10
Etanol 70%	10
Etanol 80%	10
Etanol 95%	10
Naranja G6	2[b]
Etanol 95%	20
EA-50	5[b]
Etanol 95%	15
Etanol 99.5%	2[b]
Secar	5[c]

[a] Una inmersión corresponde aproximadamente a 1 seg. [b] Corresponde a minutos y [c] horas.
***** Después del tiempo de secado de las laminillas, se procede al montaje con resina.

2.2.1.4.2. Procedimiento.

Las muestras de semen almacenadas a -70°C se descongelaron a temperatura ambiente y se mantuvieron a 4°C. A alícuotas de $1x10^6$ células se les adicionó amortiguador TNE (ver sección 2.3.5.) para obtener un volumen final de 100 µl. Minutos antes del análisis, se adicionaron 200 µl de la solución permeabilizante (solución ácido-detergente, ver sección 2.3.5) para facilitar la

entrada del fluorocromo a las células, se agitó suavemente y se dejó reposar durante 30 seg/4ºC. Transcurrido este tiempo, se adicionó un volumen de 600 µl de la solución de tinción (ver sección 2.3.5.) y se dejó reposar durante 3 min/4ºC. Inmediatamente después, la preparación celular se filtró a través de tela de organza y se depositó en un tubo de polipropileno para su análisis en el citómetro de flujo (Citómetro *FACS Calibur*™).

El citómetro fue calibrado en cada sesión para que las medias de las fluorescencias verde y roja de la muestra de referencia (muestra evaluada día a día) estuvieran en 450 y 125 canales, respectivamente. Se analizaron 10,000 células por muestra a un flujo menor de 200 células/seg. Los datos fueron adquiridos en forma de "list-mode" y se analizaron con el programa SCSASoft® (SCSA Diagnostics, Inc., SD, E.U.A). Previo a cada sesión en el citómetro, se analizó por duplicado una muestra de referencia con valor promedio de 6% de DFI%, con un CV <10%.

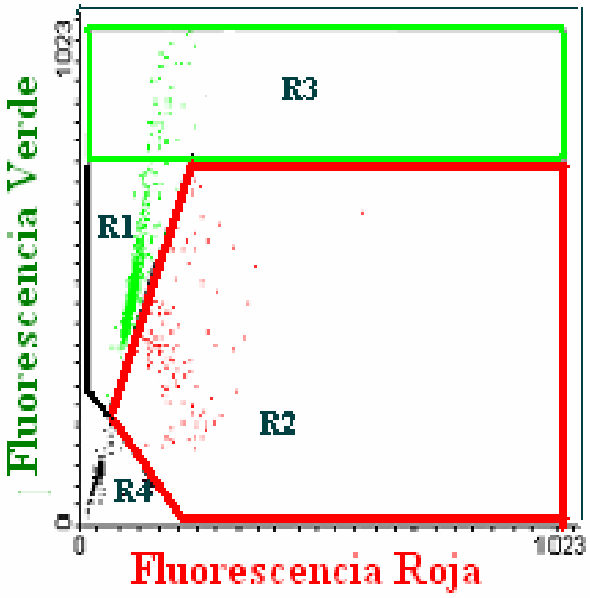


Figura 2. Citograma que representa la fluorescencia roja versus la fluorescencia verde emitida por los espermatozoides de un individuo control. R1 indica la población principal de espermatozoides sin alteración. R2 representa el porcentaje de células con DNA dañado. R3 representa las células con alta fluorescencia verde (mal condensadas) y R4 indica restos de células.

2.2.2. Estudio *in vitro.*

2.2.2.1 Selección de las muestras de semen.

Los participantes que aceptaron participar fueron previamente informados sobre los objetivos del estudio, así como sobre los criterios para ser considerados donadores. Dentro de los criterios se consideró que fueran sujetos sanos de entre 18 y 55 años de edad, que no consumieran drogas, bebidas alcohólicas, tabaco y/o algún medicamento y que proporcionaran inicialmente una muestra de semen con un periodo mínimo de tres días de no eyaculación, para evaluar que los espermatozoides no tuvieran daño (DFI% <15%), además de aceptar proporcionar las muestras biológicas necesarias hasta el término del estudio. Aceptaron donar muestras 3 sujetos con características normales de calidad de semen (con valores promedio de: concentración= $96x10^6$ espermatozoides/ml, motilidad= 87% y viabilidad= 93%) y estructura de la cromatina normal (DFI%<15, con valor promedio de 6.7%), con un CV <10% entre los individuos.

2.2.2.2. Obtención y análisis de la muestra de semen.

Las muestras de semen fueron obtenidas y analizadas de acuerdo a los apartados anteriores para la etapa *in vivo*.

2.2.2.3. Preparación de las soluciones de los diferentes compuestos OF.

Un día antes de los experimentos se prepararon soluciones 500 mM para cada uno de los compuestos OF, que se mantuvieron en frascos ámbar a -20ºC. Las concentraciones de trabajo de cada uno de los compuestos fueron las siguientes:

- Diazinón y diazoxón: 50, 300, 500 y 750 μM.
- Clorprifos y clorpirifos-oxón: 300, 500, 750 y 900 μM.
- Metil paratión y paraoxón: 500, 750 y 900 μM.

2.2.2.4. Incubación de los espermatozoides con los compuestos OF.

Alícuotas de $5x10^6$ espermatozoides se incubaron con las diferentes concentraciones de los compuestos OF, y como grupo control se tomó la incubación con el vehículo utilizado para disolverlos, dimetilsulfoxido (DMSO). Se realizaron tres experimentos independientes por sextuplicado para cada concentración de los compuestos evaluados; se les agregó un volumen de la solución de medio de capacitación (BWW) con albúmina, DMSO y el compuesto OF (ver

sección 2.4) para obtener un volumen final de 1 ml. Inmediatamente después, se incubaron las muestras durante 1 h, en ausencia de luz, con 5% de CO_2 y a una temperatura de 37°C. Posterior a la incubación, se evaluó la viabilidad de los espermatozoides después de cada uno de los tratamientos y los espermatozoides fueron lavados con medio BWW libre de albúmina. Finalmente, se prepararon alícuotas de $1x10^6$ células en un volumen final de 100 µl de la solución de tinción (TNE, ver sección 2.4) y fueron almacenadas a -70ºC hasta su análisis.

2.2.2.5. Evaluación del daño a la cromatina espermática

La evaluación de la estructura de la cromatina espermática se llevó a cabo por la técnica de citometría de flujo SCSA (ver sección 2.2.1.4).

2.3. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el uso del paquete Stata SE versión 8 (Stata Corporation, TX, EUA).

2.3.1. Etapa *in vivo*.

Inicialmente, los cuestionarios fueron revisados, codificados y capturados para construir la base de datos. Se realizó un análisis exploratorio para descartar posibles errores en la captura de las variables.

2.3.1.1. Variables de estudio.

Se consideraron como variables dependientes (aquellas que se desea estimar) a los parámetros de la calidad de semen (morfología, viabilidad, motilidad, volumen y concentración espermática) y los parámetros de la estructura de la cromatina (DFI% y Media de DFI) y como variables independientes a la exposición previa de 1 a 3 meses a OF y años de trabajar en el campo. Los posibles factores confusores fueron la edad, días de abstinencia sexual, intensidad de fumar, consumo de alcohol, consumo de cafeína y consumo de drogas.

2.3.1.2. Normalización de las variables.

Se sometió a cada variable de estudio a una evaluación para verificar que presentaran distribución normal, para lo cual se consideró el valor de la Kurtosis (pico de la forma Gaussiana en la distribución normal), el cual debe ser de 3, así como el valor de la Skewness (dirección y grado de simetría de las colas de la distribución normal) que debe ser de 2. Las variables dependientes que presentaron distribución normal fueron motilidad, morfología, volumen y concentración espermática, mientras que el resto de las variables dependientes tuvieron que ser transformadas por medio de alguna función matemática: se utilizó la elevación al cubo para viabilidad y la raíz cuadrada para DFI% y Media de DFI.

2.3.1.3. Análisis descriptivo.

El análisis descriptivo de las variables dependientes e independientes se realizó por las medidas de tendencia central (media aritmética y media geométrica) y medidas de dispersión (desviación estándar), así como la distribución de frecuencias y valores mínimos y máximos.

2.3.1.4. Regresión lineal simple (análisis bivariado).

Para predecir o estimar el valor de una variable (dependiente) que corresponde al valor dado por otra variable (independiente), se realizó un análisis de regresión lineal simple (bivariado). En este tipo de análisis se relacionan sólo dos variables, por lo tanto, cada uno de los parámetros de la calidad de semen (viabilidad, morfología, motilidad, volumen y concentración espermática) y de daño a la cromatina espermática (DFI% y Media de DFI) se relacionó con cada una de las variables independientes. Se aceptaron como asociaciones significativas aquellas que presentaron un valor de $p<0.05$. La relación entre ambas variables se describió a través del valor de β (pendiente de la recta), siendo positiva (relación o asociación directa), negativa (relación o asociación inversa) o nula (relación o asociación de valor escaso o nulo para efectos de estimación o predicción).

2.3.2. Etapa *in vitro.*

2.3.2.1. Variables de estudio.

Se consideraron como variables dependientes (aquellas que se desea estimar) los parámetros obtenidos de la evaluación de daño a la cromatina espermática (DFI% y Media de DFI). Las concentraciones de cada compuesto a las que se sometieron las muestras se consideraron como variables independientes (aquellas que explican la variación en la variable dependiente).

2.3.2.2. Análisis de varianza.

Se realizó un análisis de varianza y la prueba de comparación múltiple Bonferroni para evaluar la diferencia entre las concentraciones de OF utilizados. Se aceptaron como asociaciones significativas aquellas que presentaron un valor de $p<0.05$.

2.3.2.3. Regresión lineal simple (análisis bivariado).

Para predecir un posible comportamiento concentración-efecto y posteriormente estimar las concentraciones de los diferentes compuestos a los cuales se lograba un 30% de DFI en los espermatozoides (porcentaje de DFI considerado que compromete la fertilidad en el humano, Evenson y Jost, 2000), se estableció la relación entre las variables por medio de un análisis de regresión lineal simple (bivariado). En este tipo de análisis se relacionan sólo dos variables, por lo tanto, cada uno de los parámetros de daño a la cromatina espermática (DFI% y Media de DFI) se relacionó con las concentraciones de cada compuesto a las que fueron expuestos. La relación entre ambas variables se describió a través del valor de β (pendiente de la recta), siendo positiva (relación o asociación directa), negativa (relación o asociación inversa) o nula (relación o asociación de valor escaso o nulo para efectos de estimación o predicción). Se sometió a cada variable de estudio a una evaluación para verificar que presentaran distribución normal (ver apartado 2.3.1.2). Las variables que presentaron distribución normal fueron el DFI% y la Media de DFI del paratión y clorpirifos-oxón, el DFI% del diazinón y diazoxón, el DFI% del clorpirifos, mientras que el resto de las variables tuvieron que ser transformadas, como elevación al cubo para la Media de DFI del clorpirifos, diazinón y diazoxón, y a la raíz cúbica para el DFI% y la Media de DFI del paraoxón.

2.3.2.4. Análisis de correlación no paramétrica de Spearman.

El coeficiente de correlación de Spearman (rho), es una prueba no paramétrica que mide la asociación entre dos variables discretas. La interpretación del coeficiente de Spearman es igual que la del coeficiente de correlación de Pearson; oscila entre -1 y +1, indicándonos asociaciones negativas o positivas, respectivamente. Para conocer si existe alguna relación entre la concentración de cada uno de los compuestos evaluados y su efecto, se analizó el coeficiente de correlación de Spearman, que posee una potencia mayor.

2.4. Preparación de soluciones.

Solución ácido-detergente, pH 1.2: Se mezclaron 20 ml de HCl 2.0 N, 4.39 g de NaCl y 0.5 ml de Tritón X-100 y se llevaron a un volumen de 500 ml con agua desionizada (Milli-Q, 18.2 MΩ). Finalmente, se ajustó a pH 1.2 con HCl; para conservar esta solución al menos por tres meses se almacenó en frascos ámbar de vidrio a 4°C.

Solución de tinción (NA): Se preparó a partir de las siguientes soluciones: ácido cítrico 0.1 M, Na_2PO_4 0.2 M, EDTA 1 mM, NaCl 0.15 M, ajustando a pH 6.0 con lentejas de hidróxido de sodio. A 100 ml de esta solución se le adicionaron 600 µl de naranja de acridina (1 mg/ml disuelto en agua Milli-Q).

Buffer de TNE: Se utilizaron las siguientes soluciones: Tris-HCl 0.01 M, NaCl 0.15 M, EDTA 0.01 M, se ajustó a pH 7.4 con NaOH 2 N y se conservó a temperatura ambiente en frascos ámbar de vidrio.

Solución de fosfato: Se tomó 1 ml de solución de KH_2PO_4 10 mM en H_2SO_4 0.1 N y se llevó a un volumen final de 100 ml con agua Milli-Q.

HCl 0.1 N: Se tomaron 0.3 ml de HCl y se aforaron a 100 ml con agua Milli-Q.

Solución buffer equilibrante: Se mezclaron 400 µl de solución ácido-detergente y 1.2 ml de solución buffer de tinción.

Medio BWW: Se pesaron 0.21 g de $NaHCO_3$, 0.109 g de $C_6H_{12}O_6 \bullet H_2O$, 0.003 g de piruvato de sodio, 0.35 g de fracción V de sero-albúmina bovina, 0.006 g de penicilina (1658 U/mg), 0.01g de sulfato de estreptomicina y 0.953 g de sales de HEPES, se agregaron 0.37 ml de lactato de sodio al 60% y se llevó a un volumen de 100 ml con la solución madre. Se filtró el medio en un filtro millipore.

Solución madre: Se pesaron 5.54 g de NaCl, 0.356g de KCl, 0.25g de $CaCl_2 \bullet H_2O$, 0.162g de KH_2PO_4 y se llevó a un volumen final de 100 ml con agua Milli-Q.

Eosina Y al 0.5%: Se pesan 0.01 g de eosina Y, y se llevaron a 2 ml con agua Milli-Q.

Buffer de formaldehido: Se tomaron 50 g de $NaHCO_3$, 10 ml de formaldehído al 35% para aforar a un volumen final de 1000 ml con agua Milli-Q.

Solución de etanol acidulado: Se mezclan 300 ml de etanol al 99.5%, 2 ml de HCl concentrado y 100 ml de agua Milli-Q.

3. Resultados

3.1. Etapa *in vivo.*

3.1.1. Características de la población de estudio.

La población estudiada comprendió 31 individuos del sexo masculino, originarios del municipio de Muna, Yuc. Las características de los participantes se muestran en la Tabla 2. La edad promedio fue de 39 años. De acuerdo a los rangos de masa corporal establecidos por Pérez de Gallo y Marván-Laborde (1996) (normal: 20-25 y sobrepeso:>25), la mayoría de la población mostró sobrepeso (81%; n=25). Respecto al hábito de fumar, sólo 16 fumaban al momento del estudio (52%); 25 sujetos dijeron consumir bebidas alcohólicas (81%), por lo que se reporta el índice de consumo de alcohol, determinado por la suma del consumo por día de cerveza, vino, brandy o tequila. Para determinar el consumo de cafeína por día, se asumió que una porción de café o de refresco contenía la misma cantidad de cafeína. Ninguno de los participantes había consumido algún tipo de droga.

3.1.2. Uso de plaguicidas en la población estudiada.

En la Tabla 3 se enlistan los diez plaguicidas a los cuales estuvieron expuestos con mayor frecuencia los trabajadores participantes del estudio. El grupo químico de los OF destacó por ser el de mayor frecuencia de uso, seguido de los carbamatos, organoclorados, sales de amonio y bipiridilos. Por otra parte, el promedio de años de trabajar en el campo fue de 21 (Tabla 2). De los 31 participantes, 17 (60%) señalaron haber tenido algún síntoma (mareos, vómito, hemorragias, etc.) relacionado con la exposición a plaguicidas.

3.1.3. Calidad de semen de la población estudiada.

En la Tabla 4 se muestran los parámetros de la calidad de semen de los agricultores participantes. Los valores de la media obtenidos para cada parámetro se encontraron dentro de lo normal, de acuerdo a lo propuesto por la OMS (2002), a excepción de la morfología espermática, ya que el 100% de las muestras estuvo por debajo del porcentaje considerado como normal (>50% de formas normales). A pesar de que las medias de los parámetros analizados estuvieron dentro de los valores normales, se observó anormalidad en algunos individuos; así, el 35% de los sujetos presentó anormalidad en el volumen del eyaculado (11 sujetos con valores bajos), 20% presentó

valores bajos en la motilidad (6 sujetos), mientras que la viabilidad y la concentración espermáticas mostraron el 3% de anormalidad (1 sujeto).

Tabla 2. Características de la población estudiada.

Parámetro	Valor	Rango
Edad (años)[a]	39 ± 11	18 – 55
Peso (Kg) [a]	72.1 ± 8.9	52-90
Talla (m) [a]	1.63 ± 0.07	1.5-1.76
Indice de Quetelet [b,c]	28.1	23.1-34.5
Emanciación (%)	0	
Normal (%)	20	
Sobrepeso (%)	80	
Fumadores (%)	81	
Fumadores actuales (%)	52	
Intensidad de fumar [a, d]	71 ± 62	2 – 184
Consumidores de bebidas alcohólicas (%)	81	
Consumo nulo (%)	19	
Consumo bajo (%)	42	
Consumo medio (%)	32	
Consumo alto (%)	6.5	
Consumidores de drogas (%)	0	
Consumo de cafeína [b, e]	1.29	0-4.5
Tiempo de trabajo en el campo (años) [a]	21 ± 9	8-45

[a] Los datos se expresan en media aritmética ± DE. [b] Los datos se expresan en media geométrica. [c] El índice de Quetelet fue calculado como el peso entre la talla al cuadrado; se consideró emanciación <20%, normal en un rango de 20-25% y sobrepeso >25%. [d] Indica el número de cigarros fumados multiplicado por los años de fumar. [e] Consumo promedio por día de una porción de café y/o refresco de Cola. n = 31 sujetos.

Tabla 3. Listado de los diez plaguicidas con mayor frecuencia de uso por los trabajadores.

Ingrediente activo	Grupo químico	Nombre químico
Paraquat	Bipiridilo	1, 1´-dimetil-4, 4´bipiridilo
Metamidofos*	Organofosforado	O, S- dimetil fósforo-aminoditioato
Metomilo	Carbamato	S-metil-N [(metilcarbamoil) oxi] tioacetimidato
Clorpirifos etil*	Organofosforado	0, 0-dietil 0-(3, 5, 6 –tricloro- 2 pirimidil) fosforotioato
Glifosato	Fosfonometilglicina	Isopropilamina de N- (fosfometil) glicina
Malatión*	Organofosforado	0, 0-dimetil fosforoditioato de dietil mercapto succinato
Mancozeb	Carbamato	Coordinación del zinc con etilen- bis-ditio- carbamato de manganeso
Endosulfan	Organoclorado	6,7, 8, 9, 10, 10-hexacloro- 1, 5, 5a, 6, 9, 9a-hexahidro- 6, 9, metano-2, 4
Sevin	Carbamato	1-naftil metil carbamato
2, 4-D	Sales de amonio	Dimetilamina del ácido 2, 4-diclorofenoxiacético

* Indica los compuestos organofosforados.

3.1.4. Estructura de la cromatina espermática de la población estudiada.

La Tabla 5 muestra los parámetros de la estructura de la cromatina espermática. Los valores obtenidos de la media para cada parámetro muestran un promedio de 21% de DFI% y 244 unidades de fluorescencia para la Media de DFI. De acuerdo al valor considerado de bajo potencial de fertilidad (30% de DFI%; Evenson *et al*., 2002), una fracción importante de la población mostró un daño severo en la cromatina de los espermatozoides (40%; 12 sujetos) y un 17% (5 sujetos) presentó un daño moderado (15 < DFI% < 30). La Figura 3 muestra los datos generados en el análisis de SCSA de muestras representativas.

Tabla 4. Parámetros de la calidad del semen de la población estudiada.

Parámetro	Media geométrica	Rango	Anormalidad (%) [a]
Morfología (%)[b]	19.4 ± 8.3	7 - 36	100
Volumen (ml)[b]	1.9 ± 0.9	0.5-3.7	36
Motilidad (%) [b]	56.5 ± 11.3 [c]	32 – 81	21
Viabilidad (%) [c]	80.35	19-97.5	3
Concentración espermática [b] (x 10^6 células/ml)	95.5 ± 50.2[c]	1 – 220	3
Tiempo de liquefacción (min) [c]	49	15-180	19

[a] Se presenta el porcentaje de individuos con valores menores a los normales para cada parámetro de calidad de semen. [b] Los datos se expresan en media aritmética ± DE. [c] Los valores se expresan en media geométrica. Valores normales: Morfología ≥ 50% de formas normales, Volumen ≥ 1.5 ml, Motilidad ≥ 50% de espermatozoides móviles, Viabilidad ≥ 50% de espermatozoides vivos, Cuenta espermática ≥ 20 x 10^6 células/ml. n = 31 sujetos.

Tabla 5. Parámetros de condensación de la cromatina espermática de la población estudiada.

Parámetro	Media geométrica	Rango
DFI%	21	5.16-91.89
Normal *	43	
Daño moderado *	17	
Daño severo *	40	
Media de DFI	244.42	208.64-311.77

DFI= Índice de Fragmentación del ADN de los espermatozoides. *Se indica el porcentaje de individuos según su nivel de daño. Normal (≤15%); Daño moderado (16-29%); Daño severo (≥30%). n = 31 sujetos.

A B

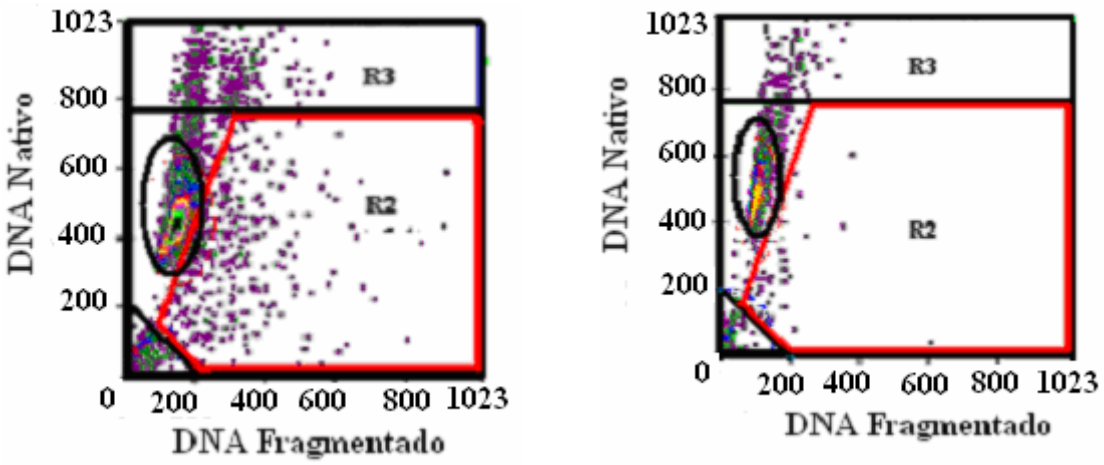


Figura 3. Citogramas generadas por espermatozoides de dos participantes. A) De un trabajador agrícola expuesto a plaguicidas y B) una muestra de un individuo no expuesto a plaguicidas. Dentro del óvalo se encuentra la población principal de espermatozoides. R2 corresponde a los espermatozoides con daño en el DNA (DFI%) y R3 a la alta fluorescencia verde (HDS).

3.1.5. Asociación entre la exposición a plaguicidas OF, la calidad espermática y la estructura de la cromatina.

Para analizar la asociación entre los indicadores de exposición y de efecto, se llevó a cabo un análisis bivariado (Tablas 6 y 7). Se consideró como indicadores de exposición los años de trabajar en el campo y se calculó un índice de exposición de 1 a 3 meses previos a la toma de la muestra de los 10 plaguicidas de mayor frecuencia de uso (ver Tabla 3). No se observó asociación con la exposición del primero, segundo o tercer mes previo respecto a los parámetros de calidad espermática, y tampoco considerando los años de trabajar en el campo (Tabla 6). Por otra parte, los parámetros evaluados de daño a la estructura de la cromatina espermática no se vieron afectados por la exposición en el tercero o segundo mes previo; sin embargo, considerando la exposición del mes previo a la toma de la muestra y los años de trabajar en el campo, se observaron asociaciones positivas con el daño al ADN (DFI%) (Tabla 7), sugiriendo que a medida que aumenta la exposición a plaguicidas, aumenta el daño genético en la cromatina espermática.

Tabla 6. Efecto de la exposición a compuestos OF sobre la calidad espermática.

Parámetro	Exposición							
	Años de trabajo en el campo*		3 meses [a]		2 meses [a]		1 mes [a]	
	ß	p	ß	p	ß	p	ß	p
Viabilidad	-375.658	0.931	-90.321	0.982	-3864.29	0.324	-2924.65	0.586
Motilidad	-0.1575	0.485	-0.123	0.549	-0.17210	0.399	-0.31300	0.261
Concentración	-0.3840	0.697	-0.444	0.623	0.18400	0.837	-1.66700	0.164
Morfología	-0.1710	0.296	0.0640	0.672	0.09100	0.545	-0.33400	0.096
Volumen	-0.0015	0.810	0.0010	0.937	-0.0111	0.477	0.00500	0.812
Días de abstinencia	-0.0054	0.870	-0.078	0.246	-0.0330	0.623	-0.02600	0.772

Se presentan los datos de ß (pendiente) y p. [a] Indica la exposición durante los meses previos a la toma de la muestra a los 10 plaguicidas OF de mayor frecuencia de uso. * Indica la exposición crónica. n=31.

3.1.6. Asociación entre la estructura de la cromatina, la calidad del semen y las variables confusoras.

Para analizar la asociación entre los posibles confusores y el efecto sobre la estructura de la cromatina y calidad de semen, se realizó un análisis de regresión lineal simple. Ninguna de las variables (edad, días de abstinencia sexual, consumo de tabaco, alcohol y cafeína) se asoció con los parámetros de la calidad de semen ($p>0.05$); por lo tanto, no resultaron factores confusores.

Por otra parte, los resultados del análisis de asociación entre los posibles confusores y el efecto sobre la estructura de la cromatina, también indicaron que ninguna variable se asoció significativamente (Tabla 8), por lo que se quedó el análisis bivariado (Tabla 7).

Tabla 7. Efecto de la exposición a compuestos OF sobre la estructura de la cromatina espermática.

Parámetro	Exposición							
	Años de trabajo en el campo*		3 meses [a]		2 meses [a]		1 mes [a]	
	ß	p	ß	p	ß	p	ß	p
DFI%[b]	-0.035	0.025	0.0005	0.754	0.001	0.286	0.006	0.004
Media de DFI[c]	0.179	0.071	-0.302	0.495	-0.35	0.426	0.719	0.022

Se presentan los datos de ß (pendiente) y p. [a] Indica la exposición durante los meses previos a la toma de la muestra a los 10 plaguicidas OF de mayor frecuencia de uso. [b] Los valores de DFI% fueron transformados por la función inversa de la raíz cúbica y [c] de Media de DFI por elevación al cubo. * Indica la exposición crónica. n=31.

Tabla 8. Análisis bivariado entre el parámetro de DFI% y las posibles variables confusoras.

Variable	ß	p	r^2
Edad	-0.004	0.78	0.002
Índice de alcohol	0.073	0.698	0.005
Intensidad de fumar	-0.00007	0.985	0.00001
Consumo de cafeína	0.192	0.215	0.054
Días de abstinencia sexual	-0.042	0.295	0.039

Se presentan los valores de ß, p y r^2. n=31.

3.2. Etapa *in Vitro*

3.2.1. Citotóxicidad de los plaguicidas OF y sus oxones.

En la Tabla 9 se muestra la viabilidad de los espermatozoides después de la incubación con los 6 diferentes compuestos OF, respecto a su grupo control. En general, los oxones fueron más citotóxicos que los compuestos padre; el orden de citotoxicidad fue el siguiente: paraoxón> paratión> clorpirifos-oxón> clorpirifos> diazoxón> diazinón.

3.2.2. Daño en la estructura de la cromatina espermática.

3.2.2.1. Efecto del diazinón y diazoxón.

Se observó un aumento significativo ($p<0.05$) en los parámetros de DFI% (que evalúa el daño al DNA) y Media de DFI (que evalúa la condensación de la cromatina) después de la incubación de los espermatozoides con el diazinón a partir de la concentración de 500 μM (Figura 4), mientras que con el diazoxón se observó un efecto a partir de la concentración de 300 μM. En relación al daño al ADN (DFI%), se observó un efecto concentración-dependiente con ambos compuestos: diazinón ($r= 0.96$) y diazoxón ($r= 0.954$), ambos con una $p<0.0001$ (Tabla 10).

3.2.2.2. Efecto del clorpirifos y clorpirifos-oxón.

En la Figura 5 se observa el efecto causado en la estructura de la cromatina de los espermatozoides maduros después de ser incubados con el clorpirifos y con su metabolito el clorpirifos-oxón. Ambos compuestos causaron un incremento significativo ($p<0.05$) en DFI% y Media de DFI con respecto al grupo control, a partir de la concentración de 500 μM. En relación al daño al DNA (DFI%), se observó un efecto concentración-dependiente con el compuesto padre ($r= 0.98$) y su metabolito ($r= 0.982$), ambos con una $p<0.0001$ (Tabla 10).

Tabla 9. Viabilidad espermática después de la incubación con los diferentes compuestos OF.

Concentración del compuesto (µM)	Viabilidad (%)					
	Paraoxón	Paratión	Clorpirifos -oxón	Clorpirifos	Diazoxón	Diazinón
0	97	96	95	96	92	98
50	NR	NR	NR	NR	91.5	97
300	NR	NR	91	93	91	94
500	77*	81*	83	86	83	92
750	71*	79*	80*	81*	82	88
900	62*	75*	78*	82.5*	NR	NR

Se presenta la media de tres experimentos independientes realizados por sextuplicado. NR: no realizado. * Estadísticamente significativo respecto al grupo control, $p<0.05$.

Tabla 10. Relación entre los diferentes compuestos evaluados y el daño al ADN (DFI%).

Compuesto	DFI %	
	r*	p
Paratión	0.9733	0.0001
Paraoxón	0.9733	0.0001
Clorpirifos	0.9803	0.0001
Clorpirifos-oxón	0.9820	0.0001
Diazinón	0.9606	0.0001
Diazoxón	0.9542	0.0001

*Se muestra el valor del coeficiente de correlación de Spearman (rho).

3.2.2.3. Efecto del metil paratión y paraoxón.

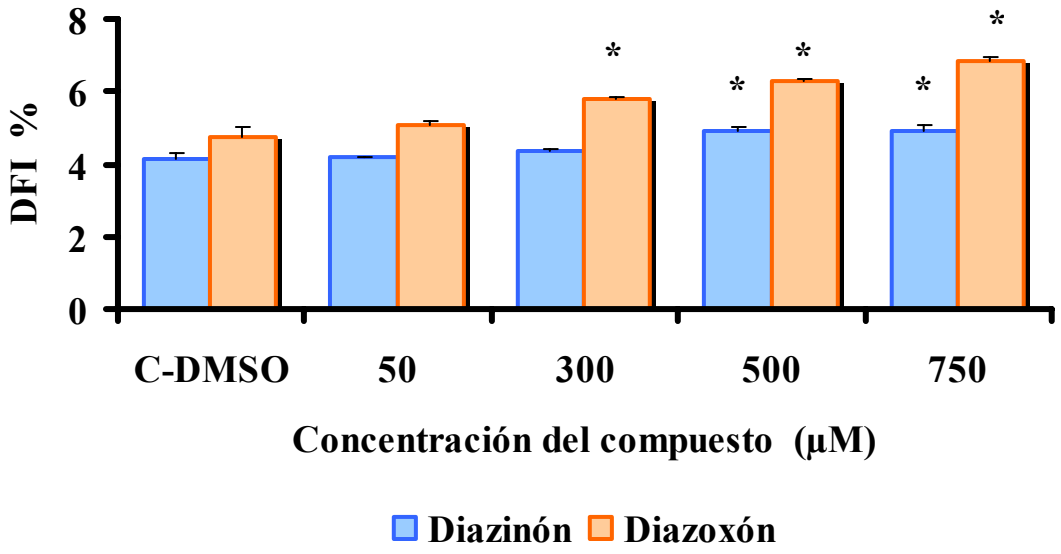
Los espermatozoides incubados con el metil paratión incrementaron significativamente ($p<0.05$) el parámetro DFI% (Figura 6 A) a partir de la concentración más baja de 500 µM (8.5% *vs* 6.1% del control). Asimismo, el daño causado por el metabolito paraoxón fue significativamente mayor ($p<0.05$) que el compuesto padre a esta concentración (58% *vs* 7% del control). Los resultados obtenidos para Media de DFI (Figura 6 B) indicaron un comportamiento similar al observado con DFI%. Por otro lado, en relación al daño al ADN (DFI%) se observó un efecto concentración-dependiente con el metil paratión ($r= 0.973$) y paraoxón ($r= 0.973$), ambos con una $p=0.0001$ (Tabla 10).

3.2.2.4. Estimación de la concentración necesaria a la cual se puede generar un índice de fragmentación del DNA del 30%.

Se estimó la concentración que se requiere de cada compuesto para generar un índice de fragmentación en el DNA del 30% (valor de DFI% al cual se compromete la fertilidad en humanos; Evenson *et al*., 2000), con el uso de la ecuación del modelo de regresión lineal simple ($y = ßx + b$), proporcionada por la relación entre los compuestos OF y el daño al DNA (evidenciado por el parámetro DFI%) (Tabla 11).

De acuerdo a las concentraciones estimadas, se requiere de una menor concentración de paraoxón, con respecto a los demás compuestos, para causar un incremento $\geq$ 30% en el parámetro DFI%. La diferencia del efecto entre los compuestos padre y sus correspondientes oxones fue desde 15% más tóxico el clorpirifos-oxón que el clorpirifos, hasta cerca de 10 veces más tóxico el paraoxón que el paratión (Tabla 11). Asimismo, los oxones fueron más genotóxicos que los compuestos padres con el orden: paraoxón> metil paratión> clorpirifos-oxón> clorpirifos> diazoxón> diazinón.

A)



B)

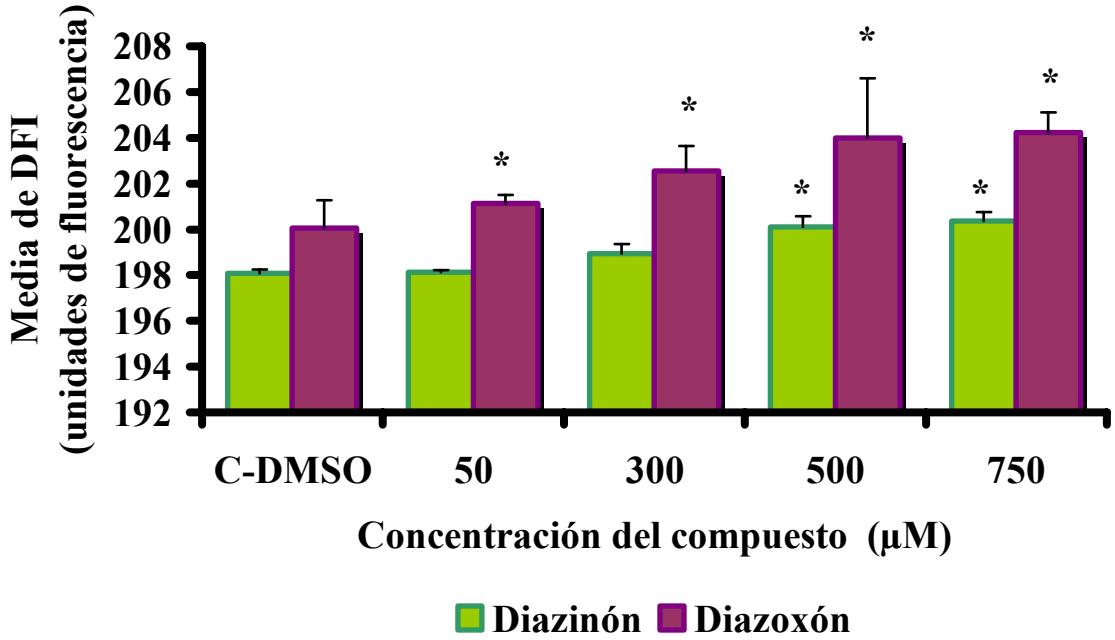
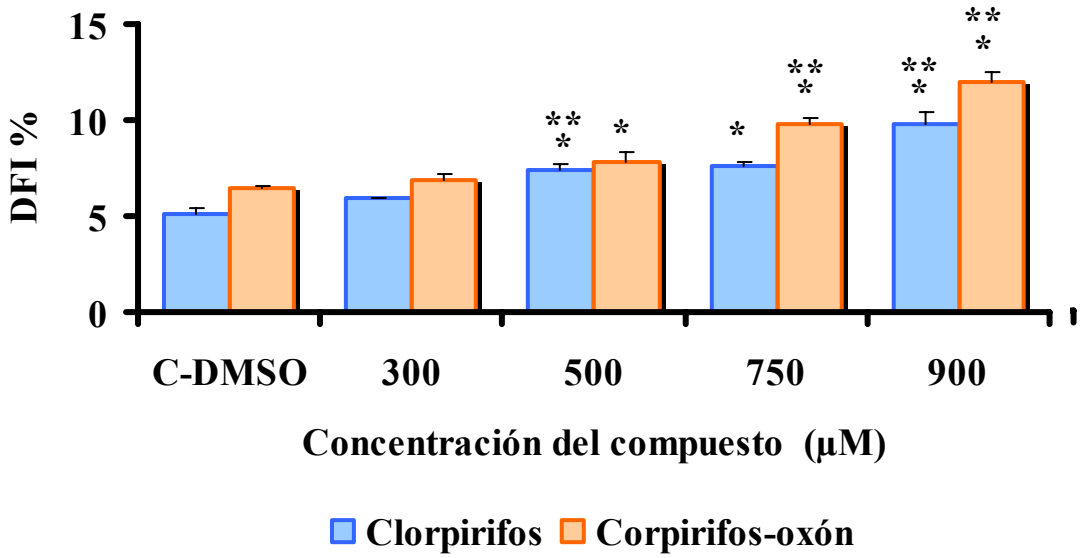


Figura 4. Efecto del diazinón y diazoxón sobre la estructura de la cromatina de los espermatozoides. A) DFI% y B) Media de DFI. Cada barra representa la media ± DE de tres experimentos independientes realizados por sextuplicado. *p<0.05 con respecto al grupo control adicionado con DMSO correspondiente, de acuerdo al análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación múltiple Bonferroni. C-DMSO= Grupo control adicionado con DMSO.

A)



B)

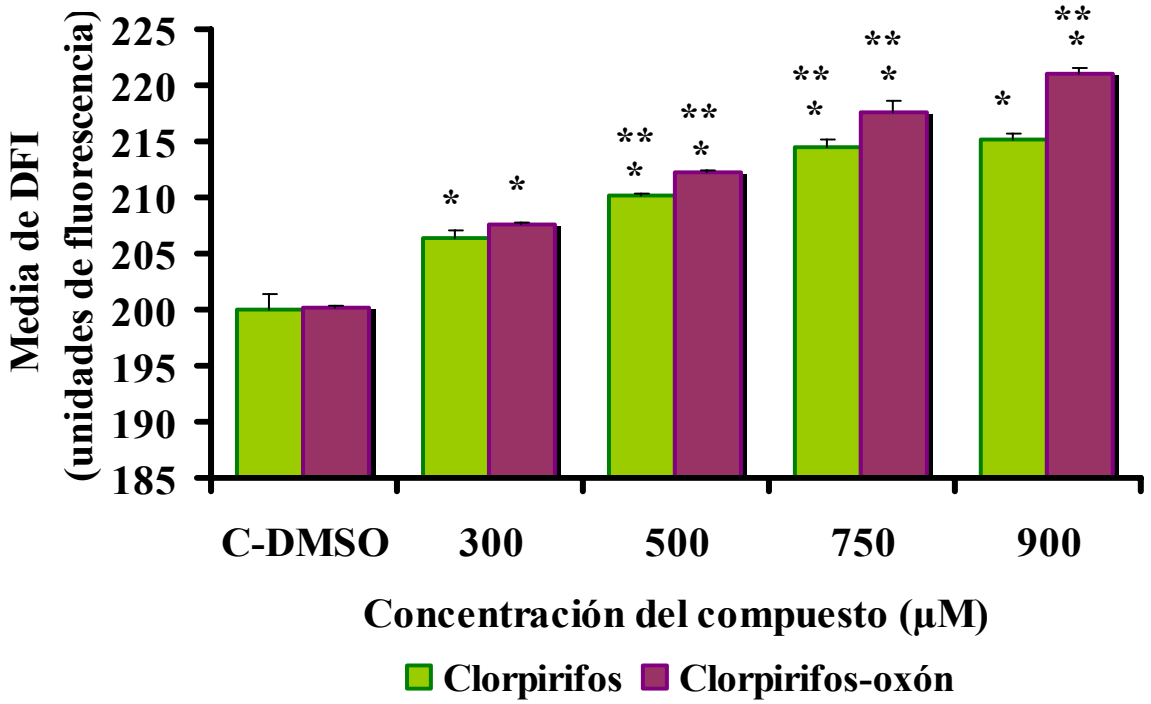
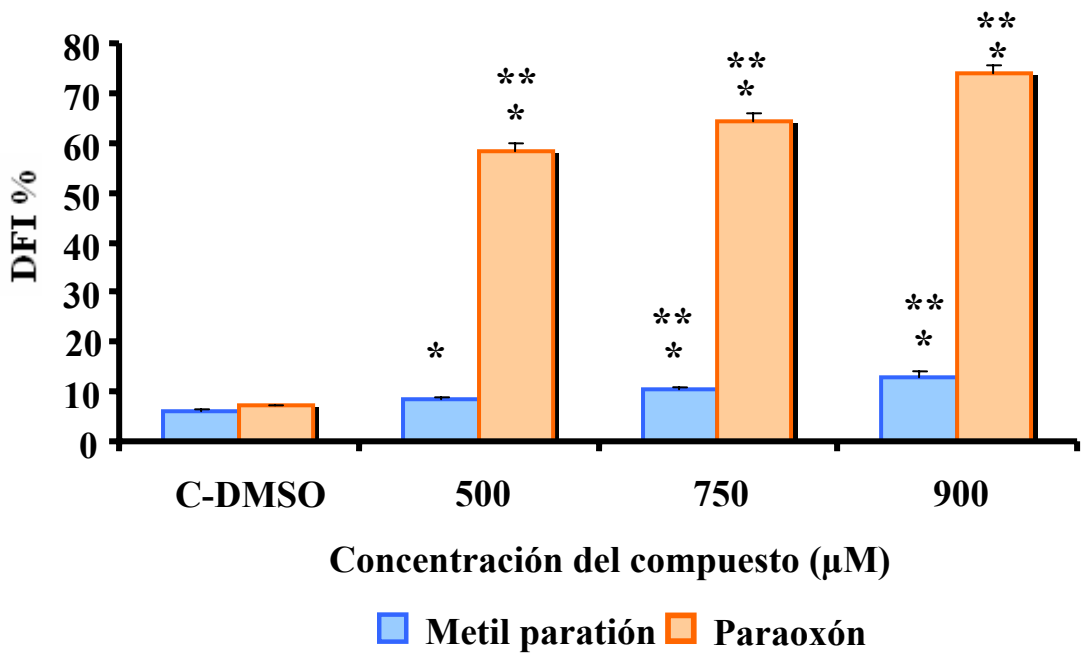


Figura 5. Efecto del clorpirifos y clorpirifos-oxón sobre la estructura de la cromatina de los espermatozoides. A) DFI% y B) Media de DFI. Cada barra representa la media ± DE de tres experimentos independientes realizados por sextuplicado. *p<0.05 con respecto al grupo control adicionado con DMSO correspondiente y **p<0.05 comparado con la concentración más baja del mismo compuesto, de acuerdo al análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación múltiple Bonferroni. C-DMSO= Grupo control adicionado con DMSO.

A)



B)

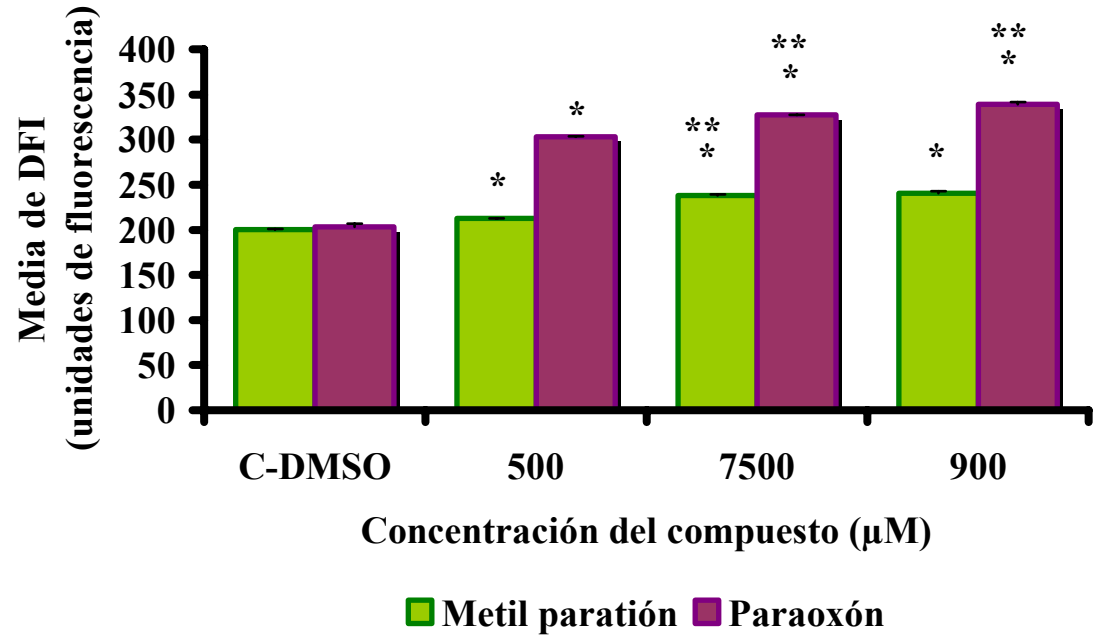


Figura 6. Efecto del paratión y paraoxón sobre la estructura de la cromatina de los espermatozoides. A) DFI% y B) Media de DFI. Cada barra representa la media ± DE de tres experimentos independientes realizados por sextuplicado. *p<0.05 con respecto al grupo control adicionado con DMSO correspondiente y **p<0.05 comparado con la concentración más baja del mismo compuesto, de acuerdo al análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación múltiple Bonferroni. C-DMSO= Grupo control adicionado con DMSO.

Tabla 11. Concentración estimada de los compuestos OF y de sus oxones para comprometer la fertilidad en humanos.

Compuesto	Concentración estimada para causar un 30% de DFI% (mM)
Paratión	3.113
Paraoxón	0.271
Clorpirifos	4.098
Clorpirifos-oxón	3.568
Diazinón	9.607
Diazoxón	6.056

Se realizó la prueba de regresión lineal simple, tomando X= [OF].

4. DISCUSIÓN

4.1 La problemática respecto a la fertilidad masculina.

Varios reportes han sugerido una disminución en la calidad de semen durante los últimos 50 a 60 años (revisión Auger *et al*., 1995). Un compendio de 61 estudios encabezado por Carlsen *et al*. (1992) mostró por primera vez la disminución significativa en la concentración espermática ($113x10^6$/ml a $66x10^6$/ml) y el volumen del eyaculado (3.4 ml a 2.75 ml) en el periodo de 1938-1990. En lugares como Europa y América del Norte, la disminución de la calidad espermática fue de alrededor del 50%. Estos resultados han atraído la atención de los investigadores y han estimulado hacia una extensiva investigación sobre posibles causales. Esto centra los estudios actuales en diversos contaminantes químicos, naturales o sintéticos, que interactúan directamente con los sistemas reproductivo y endocrino (Monoski *et al*., 2002). Por otro lado, el problema de la infertilidad a nivel mundial afecta a más del 15% de la población sexualmente activa y en el 41% de los casos, está involucrado un factor masculino (OMS, 1999).

Básicamente, existen 4 mecanismos por los cuales los compuestos químicos pueden alterar la función reproductiva masculina: por que ejercen un efecto gonadotóxico sobre los testículos, por alteración en el eje hipotálamo-pituitaria-gónada, por deterioro eyaculatorio y de la función eréctil, y por disminución del líbido (Thompson, 1994).

4.2 Efecto de los compuestos OF sobre la calidad de semen y citotoxicidad en los espermatozoides.

En el presente estudio se evaluó la posible participación de la exposición a plaguicidas OF sobre el daño en la calidad espermática y citotoxicidad en los espermatozoides humanos. Nuestros resultados mostraron alteraciones en los parámetros de calidad espermática en el siguiente orden: morfología> volumen> motilidad (100%, 36% y 21% de anormalidad, respectivamente) (Tabla 4). Sin embargo, no se encontró una asociación entre estos parámetros y los indicadores de exposición a plaguicidas, tanto de exposición reciente (1-3 meses), como de exposición crónica (años de trabajar en el campo). De igual manera, no se encontró asociación con alguna de las potenciales variables confusoras (edad, consumo de alcohol, tabaco o drogas).

Estudios tanto *in vivo* como *in vitro* han encontrado una asociación entre la exposición a ciertos compuestos OF (paratión, paraoxón, diazinón, malatión, etc.) con alteraciones en la capacidad de fertilización, el ciclo espermatogénico y la calidad de semen, incluyendo alteración

en la proliferación de las células germinales, concentración, morfología, viabilidad y motilidad espermáticas (Chou y Cook, 1994; Contreras *et al*., 1999; Ferrari *et al.* 1989; Piña-Guzmán *et al*., 2005, 2006; Rodríguez y Bustos-Obregón, 2000; Sobarzo y Bustos-Obregón, 2000). El efecto de los OF sobre la calidad de semen se puede deber a que estos compuestos alteran el proceso de la espermatogenesis en el testículo (Contreras y Bustos-Obregón, 1999), la maduración espermática en el epidídimo (Piña-Guzmán *et al*., 2005, 2006), así como la función de las glándulas sexuales accesorias (Yousef *et al*., 1995).

Debido a que el presente trabajo forma parte de un estudio multidisciplinario que está en curso, dirigido a evaluar la salud reproductiva de los trabajadores agrícolas de la comunidad de Muna, Yuc., durante dos estaciones del año (invierno y verano), no podemos descartar aún que la exposición ocupacional a compuestos OF pueda reducir la calidad de semen, ya que los resultados presentados en este trabajo corresponden solamente a la época de invierno. Se han reportado resultados positivos comparando los efectos reproductivos entre épocas del año; en un estudio realizado por Kamijima *et al*. (2004) evaluaron la calidad de semen en trabajadores ocupacionalmente expuestos a plaguicidas OF durante las estaciones de verano e invierno. Los daños observados sobre la calidad espermática esencialmente durante la estación de verano, fueron principalmente motilidad baja y alteraciones en la morfología, evidenciadas por defectos en la cabeza de los espermatozoides.

La ausencia de asociación entre los parámetros de calidad de semen y los índices de exposición evaluados se pueden deber a que en el presente estudio no se observó un gradiente de exposición, ya que hubo poca diferencia en la magnitud de la exposición a los plaguicidas durante la época de invierno en la que se realizó el muestreo (época de baja aplicación de plaguicidas), por la similitud de las condiciones de exposición de los trabajadores, y por la poca diferencia entre las actividades realizadas (chapeo, preparación de la mezcla, aplicación de plaguicidas, etc.).

Otros estudios muestran que la exposición ambiental a plaguicidas en la población en general también puede alterar la función reproductiva masculina. En el estudio realizado por Mendívil *et al*. (2004) en trabajadores del control de plagas, evaluaron las características del líquido seminal y cuantificaron en el semen los plaguicidas de mayor frecuencia de uso. Principalmente se encontraron alterados los parámetros de motilidad, viabilidad y concentración

espermáticas y se observaron asociaciones significativas entre los porcentajes de viabilidad y los niveles de metil paratión, diazinón y clorpirifos (r^2= 0.39, 0.29 y 0.50, respectivamente).

Por otro lado, en el estudio *in vitro*, en el cual la disminución en el porcentaje de células viables se consideró como índice de toxicidad, las concentraciones utilizadas de cada uno de los compuestos OF (50-900 μM) tuvieron un efecto diferencial entre pares de compuestos (diazinón- diazoxón, clorpirifos- clorpirifos-oxón y paratión- paraoxón), siendo más citotóxicos los metabolitos comparados con los compuestos padre correspondientes. Nuestros resultados proponen el siguiente orden de citotoxicidad: paraoxón> paratión> clorpirifos-oxón> clorpirifos> diazoxón> diazinón.

Los metabolitos (oxones) de los compuestos OF derivan de la oxidación de los compuestos padre, en donde un átomo de azufre es reemplazado por oxígeno, generando una molécula altamente electrofílica (Jokanovic, 2001). Estos metabolitos activos de los OF son moléculas altamente reactivos, que pueden atravesar la membrana del espermatozoide y provocar alteraciones como la pérdida de propiedades como la selectividad y regulación osmótica (Contreras *et al*., 1999; Petroianu *et al*., 1997), evidenciado por el decremento en el porcentaje de viabilidad.

Existe un solo trabajo *in vitro* en el que se ha evaluado el efecto del paratión y su metabolito el paraoxón a diferentes concentraciones (50, 100, 200, 400 y 800 μM) sobre parámetros de calidad espermática, entre ellos la viabilidad (Contreras *et al*., 1999). Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por estos autores, los cuales reportaron valores significativamente diferentes a las concentraciones de 400 y 800 μM comparados con el grupo control.

Comparando nuestros resultados con trabajos realizados en animales, en los estudios de Piña-Guzmán *et al.* (2005, 2006), en que se evaluó el efecto de dosis únicas de diazinón y metil paratión (1/3 a 1/20 de las DL_{50}) en ratones adultos, observaron que los espermatozoides maduros obtenidos del epidídimo son blanco del daño citotóxico de los plaguicidas, ya que la viabilidad disminuyó. Los autores proponen que la disminución en la viabilidad espermática se debe probablemente a la alteración en los componentes de la pieza media que están relacionados con la producción de energía, los cuales entran en contacto directo con los plaguicidas. Por otro lado, Petroianu *et al.* (1997) reportaron que bajas concentraciones de paraoxón inhiben de manera dosis-dependiente la actividad de la fosfolipasa A_2 (PLA_2), disminuyendo la actividad de la

membrana y posiblemente la reacción acrosomal. Debido a sus propiedades electrofílicas, estos compuestos tóxicos pueden enlazarse directamente a otras proteínas de la membrana plasmática, a la zona receptora del espermatozoide, a receptores, canales de Ca^{++} y otros mecanismos, desactivando la reacción acrosomal (Longo, 1997; Meizel y Turner, 1991; Petroianu *et al.*, 1997).

4.3 Efecto de los compuestos OF sobre la estructura de la cromatina espermática.

Varios estudios han vinculado la disminución en la fertilidad masculina con cambios en la estructura de la cromatina espermática (Evenson *et al*., 1999; Spano *et al*., 1998), y se ha observado que el incremento en la frecuencia de anormalidades congénitas se asocia con varias ocupaciones paternas, entre ellas la exposición a plaguicidas (Olshan y Schnitzer., 1994; Polednak y Janerich., 1983). Estudios epidemiológicos han reportado que la exposición ocupacional a mezclas de plaguicidas, incluyendo los OF, incrementa el daño en los cromosomas (Padungton *et al.*, 1999; Recio *et al.*, 2001) y reportes en animales también han mostrado el potencial genotóxico de los OF (Balaji y Sasikala, 1993; Behera y Bhunya, 1989; Vijayaraghavan y Nagarajan, 1994).

Nuestros resultados, tanto del estudio *in vivo* como *in vitro*, demostraron que los OF pueden interactuar directamente con los espermatozoides humanos maduros, ya que se observaron alteraciones en la estructura de la cromatina y daño en el ADN espermático asociados a la exposición a OF, siendo los metabolitos activos (oxones) los que poseen mayor potencial genotóxico. Los compuestos OF entran principalmente al organismo por vía oral, dérmica y respiratoria, son transportados por la sangre, para ser metabolizados en el hígado y en otros órganos como los del tracto reproductivo masculino (Jokanovik, 2002; Soranno y Sultatos, 1992), en donde la barrera hematotesticular no parece impedir su paso y por lo tanto, los OF puede actuar directamente sobre las espermatogonias, células de Sertolli y células de Leydig (Contreras *et al*., 1999; Mathew *et al*., 1992; Piña-Guzmán *et al*., 2005, 2006).

Los resultados del estudio realizado por Sánchez-Peña *et al*. (2004) en trabajadores agrícolas de la Comarca Lagunera en México, expuestos a una mezcla de plaguicidas (metil paratión, metamidofos, endosulfan, dimetoato y diazinón), sugirieron por primera vez que la estructura de la cromatina espermática es blanco de la exposición a OF. Un posible mecanismo que se propuso fue la fosforilación de las protaminas nucleares, ya que los OF tienen la habilidad de fosforilar proteínas, entre ellas la AChE (Gallo y Lawryk, 1991) y las proteínas PKC (Kadavil

et al., 2001). Así, recientemente, se demostró que el plaguicida OF, diazinón, es capaz de fosforilar a las protaminas nucleares de los espermatozoides, sugiriendo que esto promueva la mala condensación de la cromatina y eventualmente facilita el daño al DNA espermático (Piña-Guzmán *et al*., 2005). Estos resultados previos demostraron que los compuestos OF pueden actuar durante las últimas fases de maduración del espermatozoide en el epidídimo, ya que las células que al momento de la exposición se encontraban en su paso por el epidídimo las que fueron alteradas por la exposición al diazinón; esta sensibilidad de las células germinales maduras fue confirmado con los resultados del estudio *in vitro* obtenidos en este trabajo. Por otro lado, Sega (1991) también sugirió que el ADN de las células de los últimos estadios de la espermatogénesis puede sufrir daño, por la unión de compuestos químicos a los grupos sulfhidrilo de las protaminas, previendo así la condensación normal de la cromatina dentro del núcleo del espermatozoide.

El daño genético en células espermáticas ha sido demostrado en estudios epidemiológicos por Padungton *et al*. (1999) y Recio *et al*. (2001) al observar un incremento en la frecuencia de aneuplodías en espermatozoides de agricultores expuestos a mezclas de plaguicidas, entre ellos el metil y etil paratión y el diazinón, y en modelos animales por Mathew *et al*. (1992) y Piña-Guzmán *et al*. (2005, 2006) quienes observaron daño al ADN de los espermatozoides de ratones expuestos al diazinón y metil paratión. Por otro lado, la capacidad genotóxica de los OF ha sido reconocida por ser considerados como agentes alquilantes de sitios nucleofílicos del DNA (Eto y Ohkawa, 1970), lo cual puede alterar la estructura de la cromatina e inducir daño genético. La fragmentación del ADN espermático es relevante en términos de calidad espermática, potencial de fertilidad, y en la correcta transferencia genética (Aravindan *et al*., 1997; Gorczyca *et al*., 1993; Lopes *et al*., 1998; Sega, 1991).

Otro probable mecanismo de daño al ADN es el estrés oxidativo, el cual es un estado de la célula en el cual se encuentra alterada la homeostasis de óxido-reducción intracelular; hay un desequilibrio entre los sistemas oxidantes y antioxidantes, produciendo un aumento de los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Sikka, 1996). El espermatozoide de mamíferos fue la primera célula en la cual se demostró la generación de ROS (Tosic y Walton, 1946), las cuales tienen un papel importante en la función espermática, como durante la capacitación y reacción acrosomal (De Lamirande y Gagnon, 1997). Sin embargo, el espermatozoide es particularmente susceptible al daño oxidativo por dos razones: 1) por su alto contenido de ácidos grasos

poliinsaturados, los cuales son muy susceptibles de sufrir daño peroxidante; y 2) porque las enzimas citoplásmicas antioxidantes son muy limitadas en el espermatozoide (Aitken y Fisher, 1994). La producción de niveles elevados de ROS, por espermatozoides anormales o por la exposición a contaminantes ambientales, se ha asociado con problemas de infertilidad en humanos, alterando la funcionalidad de los espermatozoides por lipoperoxidación (LPO) (Aitken y Fisher, 1994; Cummins *et al.*, 1994). El estrés oxidativo no solo disminuye la capacidad de fertilización del espermatozoide, sino también altera la integridad del DNA (Aitken, 1999), ya que el espermatozoide tiene un sistema antioxidante muy limitado y porque carece de capacidad para reparar el daño genético (Aitken y Fisher, 1994).

Muy recientemente, nuestro grupo de trabajo evaluó la generación de LPO en un modelo de ratones expuestos a metil paratión a dosis únicas (3-20 mg/kg/i.p) o repetidas (6 y 12 mg/kg/i.p/5 días consecutivos). Los primeros resultados indicaron un incremento en el daño peroxidativo en los espermatozoides de manera dosis-dependiente en ambos esquemas de exposición, el cual se asoció con el daño ocasionado en el material genético (Piña-Guzmán *et al*., 2006; Uriostegui-Acosta, 2006). Esto sugiere que el estrés oxidativo está involucrado en el daño genético ocasionado por la exposición a plaguicidas OF.

En este estudio se ha reportado por primera vez el potencial genotóxico y citotóxico de los oxones sobre las células espermáticas, demostrando que son aún más tóxicos que los compuestos padre y que el grado de toxicidad depende del compuesto OF. Este potencial de los oxones de dañar al DNA fue recientemente observado por nuestro grupo en linfocitos humanos que se expusieron a metil paratión, evaluando la presencia de micronúcleos como indicador de genotoxicidad (Rojas-García *et al.*, 2006).

Finalmente, en el presente estudio no se encontraron diferencias significativas entre los parámetros de daño al ADN y los parámetros convencionales de calidad de semen, lo cual apoya que la alteración a la cromatina espermática es una evaluación independiente y complementaria al análisis de semen (Evenson *et al*., 1991; Sánchez-Peña, *et al*., 2004).

En resumen, es importante evaluar el daño al ADN en las células germinales masculinas asociado a la exposición a compuestos tóxicos, ya que es blanco de contaminantes ambientales, para explicar la mala calidad de semen, la subfertilidad, el incremento de abortos espontáneos en las esposas de los trabajadores y alteraciones en la progenie por exposiciones ocupacionales particulares. Igualmente, esto ayudará a comprender las alteraciones que pudieran presentarse en

las siguientes generaciones, debidas a exposiciones paternas consideradas de riesgo (ej. exposición a plaguicidas).

5. CONCLUSIONES.

- Los plaguicidas OF alteran la estructura de la cromatina espermática y causan daño en el DNA de los espermatozoides humanos maduros, probablemente por una interacción directa con las células germinales.
- El grado de toxicidad por la incubación con los compuestos OF evaluados fue mayor con los metabolitos (diazoxón, clorpirifos-oxón y paraoxón), con respecto a los compuestos padre correspondientes (diazinón, clorpirifos y paratión), indicando el siguiente orden de cito- y geno-toxicidad: paraoxón> paratión> clorpirifos-oxón> clorpirifos> diazoxón> diazinón.
- El presente estudio es el primero que ha reportado el potencial genotóxico y citotóxico de los oxones sobre las células espermáticas, demostrando que son aún más tóxicos que los compuestos padres y que pueden ser el metabolito tóxico en exposiciones en humanos.
- Dentro de los mecanismos propuestos para explicar los efectos de los compuestos OF sobre la estructura de la cromatina espermática se encuentran: 1) la fosforilación de protaminas nucleares, 2) la capacidad alquilante de sitios nucleofílicos del DNA, y 3) el estrés oxidativo, los tres están siendo estudiados en el laboratorio.
- Se observó una disminución en la calidad de semen de los trabajadores agrícolas participantes; sin embargo, no fue posible observar una asociación con la exposición ocupacional a compuestos OF. Esto probablemente se pueda apreciar mejor al completar la evaluación del efecto sobre la calidad de semen durante la época de verano (lo cual está en curso), época en la cual se incrementa el número de plagas y por consecuencia, el uso de plaguicidas.

LISTA DE ABREVIATURAS

FAO	Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación
OMS/WHO	Organización Mundial de Salud
OF	Organofosforados
AChE	Acetilcolinesterasa
INEGI	Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática
CYP450	Citocromo P-450
PON	Paroxonasa
DAP	Dialquilfosfatos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ICH	Intercambio de Cromátides Hermanas
AC	Aberraciones Cromosómicas
MN	Micronúcleos
OC	Organoclorados
DFI	**D**NA **F**ragmentation **I**ndex
ONU	Organización de las Naciones Unidas
EDTA	Acido Etileno Diamino Tetracético
TNE	Buffer amortiguador de tinción
DMSO	Dimetilsulfóxido
NA	Solución de tinción Naranja de Acridina
COBISH	Comité de Bioética para estudios en humanos del CINVESTAV
SCSA	**S**perm **C**hromatin **S**tructure **A**ssay
SQA IIC-P	Analizador de calidad seminal IIC-P
FCM	Citómetro de flujo *FACS Calibur*™
C.V.	Coeficiente de Variación.
BWW	Medio de capacitación
HDS	Alta fluorescencia verde
HPG	Eje hipotálamo-pituitaria-gonadal
DL_{50}	Dosis Letal media
PLA_2	Fosfolipasa A_2
ROS	Especies reactivas de oxígeno
LPO	Lipoperoxidación

6. REFERENCIAS.

Aitken, R. J. (1999). The Amoroso Lecture. The human spermatozoon- - a cell in crisis? J. Reprod. Fertil. 115:1-7.

Aitken, J., Fisher, H. (1994). Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. Bioassays. 16:259-67.

Alvarado, J., Cobos-Gasca, V., González-Navarrete, L. (1994). Insecticidas y herbicidas de mayor uso en los horticultores de Yucatán. Implicaciones a la salud y ambiente. Rev. Biomed. 5:180-90.

Alvarado, J., González R. (1993). Estudio epidemiológico sobre usos y efectos de los plaguicidas en trabajadores adultos y menores de una zona hortícola y otra citrícola del sur del estado de Yucatán. Informe técnico. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán. pp. 25-31.

Albert, L. A. (1986). Plaguicidas, salud y ambiente. Metepec, Edo. de México. ECO. pp. 143-5.

Aravindan, G. R., Bjordahl, J., Jost, L. K., Evenson, D. P. (1997). Susceptibility of human sperm to in situ DNA denaturated is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single cell electrophoresis. Exp. Cell. Res. 236:231-7.

Auger, J., Kutmann, J. M., Czyglik, F., Jouanett, P. (1995). Decline in semen quality of fertile men during the last 20 years. New Engl. J. Med. 332: 281-5.

Balaji, M., Sasikala, K. (1993). Cytogenetic effect of malathion in vitro culture of human peripheral blood. Mutat. Res. 301:13-7.

Balhorn, R. (1989). Mammalian protamines: structure and molecular interactions. En: Mol. Biol. of Cromosomes. Function. Adolph, KW (Ed.). Springer-Verlag, New York. pp. 366-95.

Bedford, C. T., Calvin, H. I. (1974). The occurrence and possible functional significance of –S-S- cross links in sperm heads, with particular reference to eutherian mammals. J. Exp. Zool, 188:137-55.

Behera, B. C., Bhunya, S. P. (1989). Studies on the genotoxicity of asataf (acephate), an organophosphate insecticide, in a mammalian in vivo system. Mutat. Res. 223: 287-93.

Bolognesi, C. (2003). Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. Mutat. Res. 543:251-72.

Buratti, F. M., Volpe, M. T., Meneguz, A., Vittozzi, L., Testai, E. (2003). CYP-specific bioactivation of four organophosphorothioate pesticides by human liver microsomes. Toxicol Appl. Pharmacol.1:186:143-54.

Carlsen, E., Giwerman, A. J., Keiding, N., Skakkebaek, N. E. (1992). Evidence for decresing quality of semn during past 50 years. Bio. Med. J. 305:609-13.

Chen, H.H., Hsueh, J. L., Sirianni, S. R., Huang, C. C. (1981). Induction of sister chromatid exchanges and cycles delay in cultured mammalian cells treated with eight organophosphorus pesticides. Mut. Res. 88:307-16.

Chou, K. C., Cook, R. M. (1994). Paraoxon inhibits fertilization of mouse gametes in vitro. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 53:863-68.

Contreras, H. R., Badilla, J., Bustos-Obregón. (1999). Morphofunctional disturbances of human sperm after incubation with organophosphorate pesticides. Biol. Cell. 23:135-41.

Cummins, J. M, Jequier, A. M, Kan, R. (1994). Molecular biology of human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics, and oxidative stress? Mol. Reprod. Dev. 37:345-62.

De Cassia, S. R., Becak, W., Gaeta, R, Rabellogay, N. M. (1982). Cytogenetic study of workers exponed to methyl-parathion. Mutat. Res. 103:71-6.

De Lamirande, E., Gagnon, C. (1997). Reactive oxygen species (ROS) and reproduction. Adv Exp. Med. Biol. 366: 185-97.

Dulout, F. N., Pastori, M. C., Olivero, O. A., Gonzalez-Cid, M., Loria, D., Matos, E., Sobel, N., De Bujan, E. C., Albiano, N. (1985). Sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations in a population exposed to pesticides. Mutat. Res. 143:237-44.

Durán-Nah, J. J., Collín-Quintal, J. (1999). Intoxicación aguda por plaguicidas. Salud. Pub. Méx. 42:53-5.

Ecobichon, D. J., Davies, J. E., Douli, J., Eric, M., Joy, R., McMillan, D., MacPhail, R., Reiter, L. W., Siikker, W., Wilson, H. (1990). Neurotoxic effects of Pesticides. En: The effect of pesticides on human health. Wilkinson, R, Baker, S. R. (Eds). Princenton, NJ: Princenton Scientific. Publ. pp. 131-99.

ECO/OPS/OMS. (1991). Ecología Humana y Salud. www.secretariadesalud.gob.mx.

Eto, M., Ohkawa, H. (1970). Alkylation reaction of organophosphorous pesticides: its chemical and biochemical significances. En: O´Brien, R. O., Yamammoto, I. (Eds.). En: Biochem. Toxicol. Insect. Academic Press. New York. pp. 33.

Evenson, D. P., Melamed, M. R. (1983). Rapid analysis and abnormal cell types in human semen and testis biopsies by flow cytometry. J. Histochem. Cytochem. 31:248-53.

Evenson, D. P., Jost, L. K., Baer, R. K., Turner, T. W., Schrader, S. M. (1991). Indivuduality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. Reprod. Toxicol. 5:115-25.

Evenson, D. P., Jost, L. (2000). Sperm chromatin structure assay for fertility assessment. Meth. Cell Sci. 22:169-89.

Eyer, F., Meischner, V., Kiderlen, D., Thiermann, H., Worek, F., Haberkorn, M., Felgenhauer, N., Zilker, T., Eyer, P. (2003). Human parathion poisoning. A toxicokinetic analysis. Toxicol. Rev. 22 :143-63.

FAO. (1986). International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 178p.

Ferrari, L., Lombardo, R. J., del Giorgio, P. L., Tortorelli, M. C., Hernández, D. A. (1989). Effects of formulated ethyl parathion on fertilization of the sea urchin pseudechinus magellanicus (Philippi). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 42:367-74.

Gallo, M. A., Lawryk, N. J. (1991). Organic phosphorous pesticidas. En: Hayes L., Laws W. J. (Eds.). Handbook of pesticides toxicology., vol. 2. Academic Press. San Diego., CA, pp. 917-1123.

Golden, A. L., Moline, J. M., Bar-Chama, N. (1999). Male reproduction and environmental and occupational exposures: A review of epidemiologic methods. Salud. Pub. Méx. 41:S93-S105.

González, R. L., Alvarado, J. A. (1996). Efectos tóxicos de los plaguicidas agrícolas en el estado de Yucatán. En: Albert L. A. y Saldívar L. (Eds). La Toxicología en México. Estado Actual y Perspectivas. SOMTOX. Xalapa, Ver.

González, A. M. (1999). Evaluación del daño genético, determinado por la prevalencia de ICH, en una población de horticultores expuestos laboralmente a plaguicidas, del municipio de Muna, en el estado de Yucatán. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán.

Gorczyca, W., Traganos, F., Jesionowska, H., Darzynkiewicz, Z. (1993). Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. Exp. Cell. Res. 207:202-5.

Hassall, K.A. (1990). The Biochemistry and Uses of Pesticides. 2nd Edition. VCH Publishers. New York.. 536 p.

Hayes, L. (1991). Handbook of Pesticide Toxicology. Academic Press Inc, San Diego California.

Hoyos, G. (2001). Genotoxicidad de los plaguicidas. En: Córdoba, PD. Eds. Toxicología, El Manual Moderno. Bogotá, Colombia. pp 1997-213.

INEGI. (2003). Anuario Estadístico de Yucatán INEGI. 2003.

Jokanovíc, M. (2001). Biotransformation of organophosphorus compounds. Toxicol. 166:139-60.

Kadavil, J. A., Katz, E. J., Eldefrawi, M. E. (2001). Modulation of protein phosphorylation and dephosphorylation in neuronal tissue by chlorpyrifos: a novel mechanism of OP toxicity. Toxicol. 60:243-51.

Kamijima, M., Hibi, H, Gotoh, M., Taki, K., Saito, I., Wang, H., Itohara, S., Yamada, T., Ichihara, G., Shibata, E., Nakajima, T., Takeuchi, Y. (2004). A survey of semen indices in insecticide sprayers. J. Occup. Health. 46:109-18.

Longo, F. J. (1997). The spermatozoon. En: Fecundation. Second edition. Publisher by Capman & Hall. The University Press, Cambridge. Geat Britain. pp. 5-22.

Lopes, S., Sun, J. G., Jurisicova, A., Meriano, J., Casper, R. F. (1998). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. Fertil. Steril. 69:528-32.

Mathew, G., Vijayalaxmi, K., Rahima, A. (1992). Methyl Parathion-induced sperm shape abnormalities in mouse. Mutat. Res. 280: 169-73.

Medina, F. L. (2001). Perfil clínico y epidemiológico en intoxicaciones del H. Hospital General "Agustín O'Horán" de la SSA., en el estado de Yucatán durante el año 2000. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yuc.

Meizel, S., Turner, K. O. (1991). Progesterona acts at the plasma membrane of human sperm. Mol. Cell. Endocrinol. 77:1-5.

Mendívil, G. C, Mada, G. C, Aldana, M. L, Silveira, G. M, Navarro, H. J, Reyes, B. L, González, E. R. (2004). Análisis de líquido seminal y cuantificación de insecticidas en trabajadores

del control de plagas en Hermosillo, Sonora. VI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Toxicología. Guadalajara, Jal.

Monozki, M., Nudell, D. M., Lipshultz, L. I. (2002). Effects of medical therapy alcohol, and smoking on male fertility. Contemp. Urology. 8:57-63.

Mutch, E., Daly, A. K., Leathart, J. B. S., Blain, P. G., Williams, F. M. (2003). Do multiple cytochrome P450 isoforms contribute to parathion metabolism in man?. Arch. Toxicol. 77:313-20.

Olshan, A. F., Schnitzer, P. G. (1994). Paternal occupation and birth defects. En: Olshan A. F., Mattison D. R. (eds.). Male-mediated developmental toxicity. New York. Plenum Press. p 153-67.

OMS. (1986). Organophosphorus insecticides: A general introduction. Geneva. Environ Health Crit.

OMS. (1990). Public Health Impact of Pesticides Used in Agriculture. Geneva: WHO.

OMS. (1991). United Nations Environment Programme. Public health impact of pesticides used in agriculture. En: Henao S, Corey G. Plaguicidas inhibidores de las colinesterasas. Metepec, México: ECOOPS.

OMS. (2002). Manual de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre semen y moco cervical. 4ª Ed. Editorial. Panamericana.

Padungtod, C, Hassold, T. J, Millie, E, Ryan, L. M, Savitz, D. A, Christiani, D. C, Xu, X. (1999). Sperm aneuploidy among Chinese pesticide factory workers: scoring by the FISH method. Am. J. Ind. Med. 36:230–38.

Páldy A., Puskas N., Vincze K., Hadhazi M. (1987). Cytogenetic studies on rural populations exposed to pesticides. Mutat. Res. 187:127-32.

Pandey, N., Gundeiva, F., Prem, A., Ray, P. (1990). Studies on genotoxicity of endosulfan, an organochloride insecticide, in mammalian germ cells. Mutat. Res. 242: 1-7.

Pérez de Gallo, A. B., Marván-Laborde, L. (1996). Evaluación del estado nutricional. En: Pérez de Gallo, A. B., Márvan-Laborde, L. (Eds.). Dietas normales y terapéuticas. Los alimentos y la nutrición en la salud y en la enfermedad. Ediciones científicas. La Prensa Médica Mexicana., S. A. de C. V., Méx., D. F. pp 121-127.

Petroianu, G., Helfrich, U., Schmitt, A., Bergler, W., Rufer, R. (1997). Dose-dependent inhibition of phospholipase A2 by paraoxon in Vitro: preliminary results. J. Appl. Toxicol. 17: 421-37.

Piña-Guzmán, A. B., Solís-Heredia, M. J., Quintanilla-Vega, B. (2005). Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines. Toxicol. Appl. Pharmacol. 202:189-98.

Piña-Guzmán, A. B., Solís-Heredia, M. J., Rojas-García, A. E., Uriostegui-Acosta, M., Quintanilla-Vega, B. (2006). Genetic damage caused by methyl-parathion in mouse spermatozoa is related to oxidativestress. Toxicol. Appl. Pharmacol. En prensa.

Polednak, A. P., Janerich, D. T. (1983). Uses of available record system in epidemiologic studies of reproductive toxicology. Am. J. Med. 4:329-48.

Primo, E. y Carrasco, J. M. (1990). Química Agrícola II. Plaguicidas y Fitorreguladores. Editorial Alhambra-Longman. Madrid. p 639.

Recio, R, Robbins, W. A, Borja-Aburto, V, Morán-Martínez, J, Froines, J. R, Hernández, R. M, Cebrián, M. E. (2001). Organophosphorous pesticide exposure increases the frequency of sperm sex null aneuploidy. Environ. Health Perspect. 109:1237-40.

Rivero, S. O., Rizo, R. P., Ponciano, R. G. (2001). Daños a la salud por plaguicidas. Ed. El Manual Moderno: Consejo de salubridad. General: UNAM, Facultad de Medicina. México. p 452.

Rodríguez, H., y Bustos-Obregón, E. (2000). An in vitro model to evaluate the effect of an organophosphoric agropesticide on cell proliferation in mouse seminiferous tubules. Andrology. 32: 1-5.

Rojas-García, A. E., Quintanilla-Vega, B., Sordo, M., Ostrosky-Wegman, P. (2006). Induction of micronucleus in human limphocytes treated with paraoxon and the role of the paraoxonase in the modulation of its genotoxic effects. En preparación.

Rupa, D. S., Reddy, P. P., Reddi, O. S. (1990). Cytogeneticity of quinalphos and methyl parathion in human peripheral lymphocytes. Hum. Exp. Toxicol. 9:385-7.

Russo, A., Levis, A. G. (1992). Detection of aneuploidy in male germs cells of mice by means of a meiotic micronucleus assay. Mut. Res. 281: 187-191.

Sánchez-Peña, L. C., Reyes, B. E., López-Carrillo, L., Recio, R., Morán-Martínez, J., Cebrián, M.E., Quintanilla-Vega, B. (2004). Organophosphorus pesticides exposure alters sperm chromatin structure in Mexican agricultural workers. Toxicol. Appl. Pharmacol. 196: 108-113.

Salvadori, D. M. F., Ribeiro, L. R., Pereira, C. A. B., Becak, W. (1988). Cytogenetic effects of malathion insecticide on somatic and germ cells of mice. Mutat. Res. 204: 283-87.

Sega, G. A. (1991). Adducts in sperm protamine and DNA vs. mutation frequency. Prog. Clin. Biol. Res. 372:521-30.

Sikka, S. C. (1996). Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. Front. Biosci. 1; 78-86.

Sobarzo, C, Bustos-Obregón, E. (2000). Sperm quality in mice acutely treated with parathion. Asian. J. Androl. 2:147-50.

Sogorb, M. A., Vilanova, E. (2002). Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethord insecticides through hydrolysis. Toxicol. Lett. 128: 215-28.

Soranno, T. M., Sultatos, L. G. (1992). Biotransformation of the insecticide parathion by mouse brain. Mutat. Res. 60:27-37.

Spano, M., Kolstad, H., Larsen, S. B.., Cordelli, E., Leter, G., Giwercman, A (1998). The applicability of the flow citometric sperm chromatin structure assay to epidemiological studies. Hum. Reprod. 13: 2495-505.

Thompson, S. T. (1994). Prevention of male infertility: an update. Phenothype. 21:365-76.

Tosic, J., Walton A. (1950). Metabolism of spermatozoo. The formation and elimination of hydrogen peroxide by spermatozoa and effects on motility and survival. Biochem. J. 47:199-212.

Uh, A. (2004). Relación entre la exposición a plaguicidas y sus efectos en la salud reproductiva en trabajadores agrícolas y sus familias de Muna, Yucatán. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yuc.

Uriostegui-Acosta. (2006). . Tesis de maestría. Secc. Ext. Tox. CINVESTAV. pp.

Vijayaraghavan, M., Nagarajan, B. (1994). Mutagenic potential of acute exposure to organophosphorus and organochlorine compounds. Mutat. Res. 321: 103-11.

Wyrobek, A. J., Bruce, W. R. (1975). Chemical induction of sperm abnormalities in mice. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 72:4425-29.

Yousef, M. I., Salem, M. H., Ibrahim, H. Z., Helmi, S., Seehy, M. A., Bertheussen, K. (1995). Toxic effects of carbofuran and glyphosate on semen characteristics in rabbits. J. Environ. Scj. Health. B. 30: 513:34.