



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA – IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“EFECTO DE INSECTICIDAS Y HERBICIDAS SOBRE LA
MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS DE CERDO.”.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA

M. en C. Eduardo Casas Hernández

Tutor

Dr. Miguel Betancourt Rule

Asesores

Dr. Edmundo Bonilla González

Dr. Mario Altamirano Lozano

México D.F. Diciembre de 2011

Agradecimientos

Este trabajo se realizó en el laboratorio de biología Celular de la UAM Iztapalapa y fue parcialmente apoyado por CONACyT, México (financiamiento 5-37923-B) y PROMEP-UAM-CAC-11.

Gracias a Guadalupe González y Edgar Ulín por su apoyo técnico y al Rastro Los Arcos, Méx. por proveer de los ovarios.

Gracias al Comité tutorial y miembros del jurado por todo el apoyo brindado para la culminación de este proyecto.

Gracias a todos y cada uno de los miembros de la familia del Área de Biología Celular por ser partícipes de este proyecto de una u otra manera, y en especial al Dr. Miguel Betancourt, que antes que jefe, es un amigo incondicional.

Miembros del jurado del examen de grado, designados por el Posgrado en Biología Experimental para la Tesis “EFECTO DE INSECTICIDAS Y HERBICIDAS SOBRE LA MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS DE CERDO.”:

Presidente: Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz

Secretario: Dr. Mario Altamirano Lozano

Vocal: Dr. Edmundo Bonilla González

Vocal: Dr. Alfonso Efraín Campos Sepúlveda

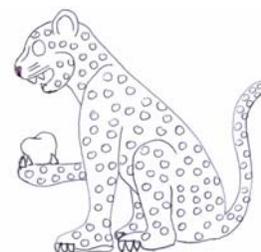
Para ti, mi viejo, mi querido viejo. ¡Lo logramos! ¡Misión cumplida!
Gracias infinitas.

“Cuando era niño, mi abuelo murió. Era escultor. era un hombre muy amable que tenía mucho amor para darle al mundo y ayudó a limpiar la maldad de nuestro pueblo; y él hizo juguetes para nosotros e hizo millones de cosas en su vida; siempre estaba con las manos ocupadas. y cuando murió, de repente me di cuenta que no lloraba por él, sino por todas las cosas que había hecho. Lloré porque él nunca podría hacerlas otra vez, nunca tallaría otra pieza de madera ni nos ayudaría a criar pichones y palomas en el patio trasero, ni tocaría el violín de la forma en que lo hacía, ni nos contaría chiste como él sabía hacerlo. Él era parte de nosotros cuando murió, todo lo que él hizo murió y no había nadie que pudiera hacerlo como él sabía. Él era único. Era un hombre importante. No me he recuperado de su muerte. A veces pienso en todas las maravillosas esculturas que nunca se harán porque él murió; en todos los chistes que el mundo había perdido y en todos los pichones que nunca serían tocados por sus manos.

Él le dio forma al mundo. Él hizo cosas por el mundo. El mundo perdió diez millones de buenas acciones la noche que murió...

Todos deben dejar algo al morir, decía mi abuelo. un niño o un libro o un cuadro o una casa o una pared o un par de zapatos. O un jardín. Algo que las manos de uno hayan tocado de algún modo. El alma tendrá entonces a dónde ir el día de la muerte, y cuando la gente mire ese árbol, o esa flor, allí estará uno. No importa lo que se haga, decía, mientras uno cambie las cosas. Así, después de tocarlas, quedará en ellas algo de uno. la diferencia entre un hombre que solo corta el césped y un jardinero depende del uso de las manos, decía mi abuelo. La cortadora de césped pudo no haber estado allí; el jardinero se quedará en el jardín toda una vida...”

Ray Bradbury. *Fahrenheit 451*.1953.



Y gracias, gracias mil, a todos aquellos que me han dejado tocar su corazón o su mente, aún
sin saberlo.
Mi alma estará allí...

Preferiría comprender una sola causa, que ser rey de Persia.
Demócrito de Abdera.
Filósofo griego, 460 – 370 a. C.

El cultivo de la mente, es un alimento para el alma humana.
Marco Tulio Cicerón

William James solía predicar “la voluntad de creer”. Yo por mi parte quisiera predicar “la voluntad de dudar”... Lo que se persigue no es la voluntad de creer, sino el deseo de descubrir, que es exactamente lo opuesto.
Bertrand Russell; *Sceptical Essays*. 1928.

La cosa más bella que podemos experimentar es lo misterioso. Es la fuente de toda verdad y ciencia. Aquel para quien esa emoción es ajena, aquel que ya no puede maravillarse y extasiarse ante el miedo, vale tanto como muerto: sus ojos están cerrados... Saber que lo impenetrable para nosotros existe realmente, manifestándose como la prudencia máxima y la belleza más radiante que nuestras torpes capacidades pueden comprender tan sólo en sus formas más primitivas... este conocimiento, este sentimiento, se encuentra en el centro de la verdadera religiosidad. En ese sentido, y sólo en ese sentido, pertenezco a las filas de los hombres religiosos devotos.
Albert Einstein; *Lo que creo*. 1930.

Resumen

La exposición a xenobióticos, como los plaguicidas, puede ser una causa importante de disfunción reproductiva en humanos y animales. La atrazina y el fenoxaprop-etil, dos herbicidas de amplio uso, y el malatión y el diazinón, dos insecticidas organofosforados, se consideran sólo como ligeramente tóxicos par los animales, pero existen evidencias de que pueden causar graves efectos en la función reproductiva. El objetivo del presente estudio fue la evaluación del efecto de estos plaguicidas en la viabilidad y maduración in vitro de ovocitos. Los gametos se maduraron en concentraciones crecientes de los plaguicidas para ser teñidos posteriormente con MTT para evaluar la viabilidad y bisbenzimidida para determinar el grado de maduración en el mismo ovocito. La atrazina no tuvo efecto sobre la viabilidad, pero la maduración se redujo significativamente, mientras que el fenoxaprop-etil afectó a ambos parámetros. Los insecticidas afectaron la viabilidad y la maduración, aunque en grados diferentes. Los cuatro plaguicidas mostraron un efecto más pronunciado en la maduración que en la viabilidad, debido a un bloqueo en el estadio de vesícula germinal.

Abstract

Exposure to xenobiotics, as pesticides, may be a major cause of reproductive dysfunction in humans and animals. Atrazine and fenoxaprop-ethyl, widely used herbicides, and malathion and diazinon, organophosphate insecticides, are considered only slightly toxic to vertebrates; however, there is evidence of greater effects on reproductive function. The aim of this study was to evaluate the effect of these pesticides on oocyte viability and in vitro maturation. Gametes were matured in increasing concentrations of the pesticides and then stained with MTT to evaluate viability and bisbenzimidide to assess the maturation stage, in the same oocyte. Atrazine had no effect on viability but maturation was significantly reduced, while fenoxaprop-ethyl affected both parameters. The insecticides affected viability and maturation but to a different degree. The four pesticides showed a more pronounced effect on maturation than on viability, due to a blockage at germinal vesicle stage.

Índice

Agradecimientos.....	1
Resumen	5
Abstract.....	5
Índice	6
Introducción.....	7
Plaguicidas. Generalidades.....	7
Plaguicidas en México.....	9
Tipos de plaguicidas	11
Herbicidas.....	11
Atrazina.....	12
Fenoxaprop-etil.....	13
Insecticidas.....	14
Insecticidas organofosforados.....	15
Diazinón.....	17
Malatión.....	18
Plaguicidas como agentes tóxicos.....	20
Fuentes de intoxicación.....	22
Infertilidad producida por plaguicidas.....	23
Efecto de plaguicidas en la fertilización.....	25
Métodos de evaluación de toxicidad.....	27
Justificación.....	29
Hipótesis.....	29
Objetivo general	30
Objetivos particulares.....	30
Materiales y métodos.....	31
Obtención y maduración de ovocitos.....	31
Tratamiento con plaguicidas.....	32
Evaluación de la viabilidad y la maduración.....	33
Análisis estadístico.....	34
Resultados.....	36
Efecto de la atrazina en la viabilidad y maduración de los ovocitos.....	36
Efecto del fenoxaprop-etil (FE) en la viabilidad y maduración de los ovocitos.....	37
Efecto del diazinón en la viabilidad y maduración de los ovocitos.....	39
Efecto del malatión en la viabilidad y maduración de los ovocitos.....	41
Discusión.....	43
Referencias	52
Anexo	59
Estructura y mecanismo de acción de los plaguicidas atrazina, fenoxaprop-etil, diazinón y malatión.....	59
Atrazina	59
Fenoxaprop-etil.....	61
Diazinón y malatión	62
Mecanismo de acción de los organofosforados.....	66

EFFECTO DE INSECTICIDAS Y HERBICIDAS SOBRE LA MADURACION *IN VITRO* DE OVOCITOS DE CERDO.

Introducción

Plaguicidas. Generalidades

Los plaguicidas son compuestos que previenen, destruyen o repelen a las plagas y aunque a menudo se hace referencia sólo a los insecticidas, el término también se aplica a los herbicidas, fungicidas, rodenticidas y nematocidas entre otros agentes que inhiben la proliferación de las plagas.

Las plagas son una abundancia de organismos indeseados, que causan daños a los cultivos, a los animales o a los seres humanos y entre otros se incluyen a los insectos, los roedores, las malezas, los hongos y algunos microorganismos.

Entre los factores que limitan la producción agrícola se cuentan diversas enfermedades y plagas propias de las plantas, mientras que diversas patologías transmitidas a los humanos o animales por vectores como los insectos, son un importante problema de salud pública a escala mundial. Uno de los principales beneficios que se obtiene con el uso de los plaguicidas es la protección que confieren a los cultivos. Se han hecho estimaciones de que más de una tercera parte de los alimentos que se cultivan, se pierden por las plagas durante su producción, cosecha y almacenaje, y esta cifra puede alcanzar hasta un 40% en el caso de los países en desarrollo. Si la producción de plaguicidas se detuviera por completo, la producción de alimentos disminuiría hasta en un 50% (Yu, 2008).

El uso de plaguicidas a nivel masivo ha permitido controlar la proliferación de plagas y enfermedades en los cultivos agrícolas y el ganado, y por lo tanto reducir o evitar pérdidas en la producción de alimentos. Del mismo modo, han ayudado de manera importante al control de los insectos y arácnidos (garrapatas y ácaros) vectores de distintas enfermedades que afectan a los seres humanos (CICOPLAFEST, 2002; Saunders y Harper, 1994).

A partir de la Segunda Guerra Mundial comenzó la era de la agricultura moderna que dependía entre otros factores de la mecanización de la agricultura, el desarrollo de los monocultivos a gran escala y el uso extensivo de fertilizantes y plaguicidas (Breckenridge y Stevens, 2008).

Los plaguicidas modernos sintetizados por primera vez a fines del siglo XIX (el DDT se sintetizó en 1874), se han empleado recurrentemente desde 1939 y se han convertido en el grupo más grande de compuestos químicos, potencialmente tóxicos, que son introducidos de manera deliberada al medio ambiente con el propósito de incrementar la producción agrícola.

Los plaguicidas se agrupan de acuerdo a la acción que tienen sobre distintos organismos y en conjunto conforman un grupo muy diverso de compuestos, por lo que es difícil realizar generalizaciones acerca de su mecanismo de acción y su posible toxicidad. El espectro de toxicidad de estos compuestos puede variar desde aquellos que son altamente tóxicos por una exposición aguda (v. gr. organofosforados y carbamatos), pasando por aquellos que no representan riesgo por toxicidad aguda pero sí por toxicidad crónica potencial (fungicidas), hasta aquellos que son virtualmente inocuos para los mamíferos (fitorreguladores e insecticidas biológicos).

La Organización Mundial de la Salud estima que ocurren aproximadamente 500 000 envenenamientos por plaguicidas al año en todo el mundo, con un número de decesos mayor a

10 000, aunque aproximadamente el 90% de estos últimos son debidos a que el plaguicida fue empleado intencionalmente como método de suicidio (Saunders y Harper, 1994).

Debe destacarse, que a pesar de su gran importancia económica al incrementar los volúmenes de las cosechas, la aplicación indiscriminada de los plaguicidas ocasiona serios daños al medio ambiente incluyendo el deterioro a la flora y la fauna, la contaminación de los cuerpos de agua y de los suelos, así como la eventual generación de plagas más resistentes. Aunado a todo lo anterior, estos agentes pueden resultar sumamente peligrosos para los humanos por las intoxicaciones de grado diverso y por los efectos nocivos que se pueden presentar a mediano o largo plazo tales como carcinogénesis, teratogénesis, esterilidad, mutagénesis y otros (CICOPLAFEST, 2002).

El uso indiscriminado o descuidado y la falta de un conocimiento mínimo de todos los riesgos potenciales para la salud y el medio ambiente, ha conducido a episodios espectaculares de envenenamiento en humanos, como la intoxicación por exposición accidental a metilisotiocianato en Bophal, India en 1984 que arrojó miles de víctimas, o la intoxicación crónica por DDT, que aunque se dejó de emplear desde hace 20 años en la mayoría de los países, constituye un serio problema por su capacidad de perdurar durante lapsos muy prolongados en los tejidos de diferentes organismos y al que se le ha relacionado con casos de cáncer de mama (Brusick, 1987, Saunders y Harper, 1994).

Plaguicidas en México

De la gran variedad de plaguicidas desarrollados en el mundo es común que los más antiguos, no patentados, más tóxicos, más persistentes en el medio ambiente y por todo lo

anterior más baratos, sean los de uso más frecuente en las naciones en desarrollo (Ecobichon, 2001).

Parte de esta problemática se sufre en México, que es considerado como la zona agrícola con los daños a la salud más elevados para su población causados por los plaguicidas, y varios estados mexicanos pueden ser considerados como zonas de riesgo debido a la contaminación por plaguicidas. Esta situación produce un serio efecto que deteriora la salud de las personas expuestas a estos agroquímicos y en algunos casos, las conduce a la muerte (Valdez-Salas et al, 2000). Por esto, en nuestro país, se han realizado diversos estudios que incluyen la identificación y cuantificación de plaguicidas organoclorados en sedimentos y organismos acuáticos en el lago de Catemaco (Calderón et al, 2001) y en sistemas lagunares del Estado de Chiapas (Rueda et al, 1997), el efecto de plaguicidas organofosforados (OP) en trabajadores industrialmente expuestos (Palacios et al, 1999), o, a nivel experimental, el daño genético en diferentes organismos (Flores et al, 1999).

En México, durante 2008, se comercializaron más de 93 000 toneladas de plaguicidas para uso agrícola (INEGI, 2009). Este volumen corresponde a 112 diferentes insecticidas y 78 herbicidas registrados (CICOPLAFEST, 2002), todos ellos con un potencial altamente tóxico para la salud humana y animal.

Estos principios activos son comercializados en diversas formulaciones de acuerdo con el fabricante (Yañez et al, 2002) y así, por ejemplo, se puede mencionar que en el mercado existen 4 formulaciones distintas para Fenoxaprop-etil, 34 para Atrazina, 65 para Diazinón y 94 para Malatión, sin contar todas aquellas formulaciones en las que el principio activo mencionado se encuentra mezclado con otros de efecto semejante (CICOPLAFEST, 2002).

Tipos de plaguicidas

Aunque la definición literal de un plaguicida incluye a cualquier compuesto o agente que mate a alguna plaga, esto no es estrictamente correcto en todos los casos, ya que algunos de ellos controlan la población de organismos considerados como una plaga sin llegar a matarlos necesariamente.

Los plaguicidas se pueden clasificar de acuerdo al mecanismo de acción, a la familia de compuestos químicos a la que pertenece el compuesto activo o más comúnmente de acuerdo con el organismo blanco sobre el que actúan. Dentro de esta última clasificación se pueden incluir entonces a los acaricidas, fungicidas, herbicidas, insecticidas, molusquicidas, rodenticidas y termiticidas por mencionar solo a los más importantes (Ware, 1991).

Herbicidas.

Son plaguicidas diseñados para ser tóxicos únicamente para las plantas, y las diferencias fisiológicas o anatómicas entre las distintas especies permite producir herbicidas selectivos. Aunque es difícil producir herbicidas que sean completamente seguros para los animales, por regla general tienen baja toxicidad para los mamíferos (Saunders y Harper, 1994).

En los últimos 50 años, el uso de herbicidas químicos se ha extendido enormemente, en especial en aquellos países con prácticas de agricultura extensiva y mecanizada. Actualmente, los herbicidas comprenden la mitad de los aproximadamente 2 mil millones de toneladas de ingredientes activos para plaguicidas empleados anualmente en todo el mundo (Tominack, 2000).

Antes de la aparición de estos agentes, el control de malezas en los cultivos se realizaba manualmente y aún actualmente, se emplea más energía a escala global para desyerbar cultivos que para cualquier otra actividad humana. Además de los empleados para la eliminación de malezas o malas hierbas en los cultivos, los herbicidas son empleados para áreas recreativas o para los bordes de los caminos (Ware, 1991).

Los herbicidas presentan una gran diversidad en cuanto a su composición química y pueden actuar sobre su organismo blanco de muy diversas maneras. Algunos de los grupos más importantes de estos plaguicidas son las ureas y sulfonilureas, nitrilos, bipyridilos, carbamatos, triazinas, arilfenoxipropionatos, ácidos fenoxicarboxílicos, entre otros (Breckenridge y Stevens, 2008).

Atrazina.

La atrazina (figura 1), una triazina, es uno de los herbicidas más efectivos, baratos y es muy empleada para el control de malezas en cultivos, y es ampliamente utilizada a pesar de que en algunos países se ha prohibido su uso (Sass y Colangelo, 2006). Fue registrada para su uso comercial en 1958, y es un herbicida empleado para el control pre- y post-emergente de malezas en cultivos de maíz, sorgo, caña de azúcar y piña.

Al igual que ocurre con el resto de los herbicidas, y con muchos plaguicidas en general, es detectada frecuentemente en cuerpos acuáticos en los que puede afectar de manera importante a la fauna y flora (Graymore et al, 2001). Se ha detectado en concentraciones importantes, de hasta 40 µg por litro, en los escurrimientos provenientes de los campos agrícolas (Tennant et al, 2001).

Es considerada como ligeramente tóxica, y aunque se supone que no es mutagénica o teratogénica (Breckenridge y Stevens, 2008), existen estudios que muestran su efecto en el aparato reproductor. Por ejemplo, en ranas puede actuar como un disruptor del desarrollo sexual normal por una activación de la aromatasa (CYP19), lo que incrementa la conversión de testosterona a estradiol (Hayes et al, 2002; Freeman y Rayburn, 2004; Murphy et al, 2006). Se ha observado también un efecto negativo de este herbicida en el número y la calidad de los espermatozoides de rata (Abarikwu et al, 2009). Así también, se ha demostrado un efecto en la transcripción de genes mitocondriales relacionados con la producción de especies reactivas de oxígeno (Jin et al, 2010).

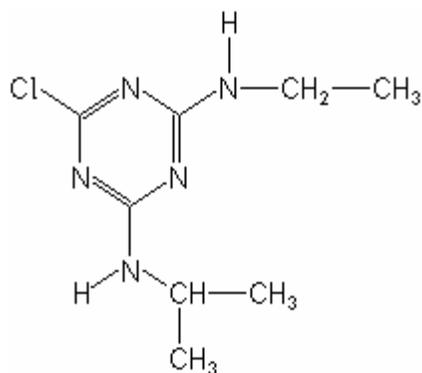


Figura 1. Estructura química de la atrazina.

Fenoxaprop-etil.

El fenoxaprop-etil (FE; figura 2), es un herbicida empleado para el control de malezas en trigo, arroz y cultivos de hoja ancha. Fue introducido al mercado, en 1980 por la compañía ICI.

Es un ácido arilfenoxialcanóico, que inhibe la biosíntesis de lípidos en los meristemas de las plantas, afectando a la acetil CoA carboxilasas (ACC) (Labrada et al, 1996; Waller et al, 2003). El FE no se considera como carcinogénico o mutagénico y no existen reportes de que pueda afectar la fertilidad o reproducción humanas (Peterson et al, 2001).

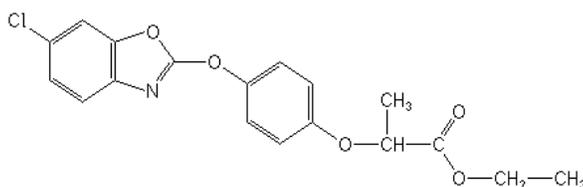


Figura 2. Estructura química del fenoxaprop-etil.

Insecticidas.

La mayoría de estos agentes ejercen su efecto por la intoxicación del sistema nervioso de los insectos, y aunque existen diferencias entre éste y el de los mamíferos, no hay que olvidar que el mecanismo de acción de los insecticidas es similar para ambos tipos de organismos. La selectividad en contra de las plagas se presenta en función de la dosis empleada, ya una que es letal para los insectos, normalmente está muy por debajo de los umbrales de toxicidad para los mamíferos. Sin embargo, no deja de existir un gran potencial de efecto tóxico para los humanos (Saunders y Harper, 1994).

Hasta antes de la Segunda Guerra Mundial los insecticidas de uso común eran aquellos basados en compuestos arsenicales, derivados del petróleo o azufre, cianuros o extractos de plantas tales como las piretrinas, la nicotina o la rotenona. Después de este período se crearon una infinidad de insecticidas químicos modernos, que pertenecen en su mayoría a cuatro grupos principales: los organoclorados (DDT, aldrin, lindano), los OP (paratión, malatión,

diazinón), los carbamatos (aldicarb, carbaril, propoxur) y los piretroides (cipermetrin, fenotrin) (Ware, 1991).

Insecticidas organofosforados.

De los grupos mencionados, los OP son los insecticidas más frecuentemente involucrados en casos de intoxicación, en comparación con cualquier otro grupo, siendo el paratión el más tóxico de ellos. Son un grupo muy grande de insecticidas, que incluye a los agroquímicos más seguros, pero también a los más peligrosos, y son en general relativamente simples en su estructura, en comparación con muchos otros plaguicidas.

Debido a su diversidad, es difícil generalizar acerca de sus propiedades físicas. Tienen una solubilidad en agua que va de moderada a considerable, lo mismo que la presión de vapor, y algunos son sumamente volátiles y fácilmente degradados por hidrólisis inducida por esterases. Esta combinación de propiedades, los hace insecticidas biodegradables y poco persistentes (Yu, 2008).

Son derivados del ácido fosfórico, y los hidrógenos pueden ser sustituidos por radicales orgánicos como metilo, etilo o fenilo. También, uno o más de sus oxígenos pueden ser reemplazados por azufre, carbono o nitrógeno.

Estos insecticidas interfieren con los impulsos nerviosos al inhibir a la enzima acetilcolinesterasa (AChE) presente en las sinapsis neuronales colinérgicas y las uniones neuromusculares de los insectos y mamíferos. Esta enzima, que se encarga de degradar al neurotransmisor acetilcolina (ACh), es inhibida por la interacción de los OP o sus metabolitos con la enzima, que ocasiona la fosforilación del sitio activo de ésta. Esta fosforilación puede ser revertida espontáneamente, aunque puede ocurrir después de días o semanas, por lo que se

considera que la inhibición es irreversible. La inactivación de la enzima conduce a una acumulación de la ACh en la hendidura sináptica produciendo una neuroexcitación excesiva.

En los mamíferos, la estimulación excesiva de los receptores a ACh puede producir un síndrome colinérgico con efectos que se corresponden con la estimulación de distintos tipos de receptores en distintos órganos. Así, la estimulación de los receptores muscarínicos del sistema nervioso autónomo parasimpático en los ojos produce miosis y visión borrosa; en el tracto gastrointestinal provoca náuseas, vómitos, diarrea e incontinencia; en las glándulas exocrinas causa salivación, lagrimeo y sudoración excesivos; en el sistema respiratorio estimula la secreción bronquial excesiva causando edema, broncospasmos, broncoconstricción, tos y disnea; en el sistema cardiovascular se produce braquicardia e hipertensión; la estimulación de la vejiga urinaria produce incontinencia. La estimulación de los receptores nicotínicos en las terminaciones nerviosas simpáticas y parasimpáticas del sistema cardiovascular induce taquicardia e hipertensión, mientras que en las fibras nerviosas produce fasciculación, calambres, debilidad muscular generalizada en músculos periféricos y respiratorios, parálisis, temblores y ataxia. En el sistema nervioso central, la estimulación de los receptores de las neuronas colinérgicas produce somnolencia, letargo, fatiga, confusión mental, cefalea, debilidad generalizada, temblores, convulsiones, depresión de los centros respiratorios, cianosis y coma (Moreno, 2003; Yu, 2008).

Aún cuando la mayoría de los OP fosforilan principalmente a la AChE, algunas otras esterasas pueden ser fosforiladas por estos insecticidas. Así, por ejemplo, el diazinón, el dicrotofos y el paratión, son capaces de fosforilar a la kinurenina formamidasa (KFasa), que es una esterasa/amidasa involucrada en la síntesis de NAD, y cuya inactivación produce teratogénesis en las aves, o a la esterasa blanco de la neuropatía (NTE), que al inactivarse

ocasiona una neuropatía retardada e induce la degeneración de los axones de los nervios periféricos y las vías sensoriales y motoras de la médula espinal (Casida y Toia, 1992). Algunos otros, como el etefón (un OP que se usa como fitorregulador y generador de etileno), inhiben a las butirilcolinesterasas, o como el glufosinato, que inhiben a la glutamato sintetasa, o el glifosato, que inhibe la síntesis de aminoácidos aromáticos en las plantas (Yu, 2008).

Se ha sugerido que los insecticidas OP pueden inducir un estado de estrés oxidativo por la inhibición de la cadena de transporte de electrones (Spetale et al, 1977), relacionado con una disminución en la expresión de genes relacionados con la citocromo oxidasa (Salazar et al, 2007; Bonilla et al, 2008).

Diazinón.

El diazinón (figura 3) es un insecticida OP, originalmente utilizado para uso residencial, que es efectivo en contra de insectos chupadores y cortadores de hojas, en cultivos de frutales, hortalizas, y pastizales. Fue introducido al mercado en 1952 por la compañía Geigy. Es un insecticida de contacto para el suelo y para tratamiento foliar, con una baja actividad residual y una baja toxicidad para mamíferos (DL₅₀ en ratas: 108 mg/kg). Aunque tiene una baja persistencia en el suelo, con un tiempo de degradación de 2 a 6 semanas, su uso doméstico fue prohibido en los EUA en 2004, permitiéndose sólo para uso agrícola (US EPA, 2006). Sin embargo, en muchos otros países, incluyendo México, tiene un amplio uso. Se ha reportado que disminuye el peso de los testículos de la rata, reduciendo la viabilidad y movilidad espermática, e incrementando las anormalidades morfológicas de los espermatozoides (Abd el-Aziz et al, 1994), mientras que en el ratón se altera la estructura de la cromatina espermática (Piña-Guzman et al, 2005).

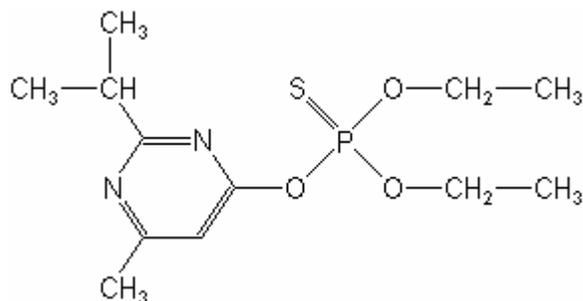


Figura 3. Estructura química del diazinón.

Malatión.

El malatión (figura 4) es otro de los insecticidas OP más comúnmente utilizado en todo el mundo (Pluth et al, 1998). Fue introducido en 1950 por la compañía American Cyanamid. Es un insecticida de contacto y fue el primero con un amplio espectro y una muy baja toxicidad para mamíferos (DL₅₀ en ratas: 1300 mg/kg). Se emplea para eliminar plagas de cultivos agrícolas, plantas ornamentales, invernaderos, graneros, bosques y jardines, así como del ganado. El efecto tóxico, como el de otros OP, se produce por la inhibición de la AChE que es fosforilada en residuos de serina del centro catalítico, incrementando los niveles de acetilcolina en las uniones neuromusculares y las sinapsis colinérgicas (Blasiak et al, 1999). Al igual que ocurre con otros organofosforados, el malatión sufre una transformación al oxón correspondiente por acción del citocromo P450 (CYP2B6 en mamíferos) (Seliskar y Rozman, 2007). Por medio de esta bioactivación, el malaoxón formado resulta mucho más tóxico para los animales que su precursor el malatión, que por sí mismo no afecta a la AChE.

Sin embargo, se sabe que para los mamíferos resulta sólo ligeramente tóxico porque es rápidamente degradado por las carboxilesterasas que hidrolizan al malatión y a sus metabolitos

en compuestos no tóxicos que pueden ser fácilmente eliminados (Jonakovic, 2001). La bioactivación por P450 es más significativa en insectos, mientras que la detoxificación hidrolítica, lo es en mamíferos, de allí su efecto selectivo sobre los primeros. A pesar de esto, existe preocupación por los efectos causados por el malatión en las funciones reproductivas de los vertebrados, especialmente alteraciones en las células germinales y somáticas (Bustos-Obregón y González-Hormazabal, 2003), y efectos negativos en la espermatogénesis *in vivo* (Choudhary et al, 2008; Uzun et al, 2009). También es capaz de inducir apoptosis en células mononucleares de sangre periférica y en células en cultivo (Masoud et al, 2003; Olgun et al, 2004; Tusch y Schwab, 2005; Ahmed et al, 2009).

En gran medida, la toxicidad del malatión se debe a la presencia de impurezas (isomalatión, malaoxón y otros relacionados) en sus formulaciones comerciales que son capaces de inhibir a las carboxilesterasas séricas y hepáticas, además de inhibir la acción de los linfocitos T citotóxicos y los linfocitos NK (“natural killers”), debilitando por lo tanto al sistema inmune (Yu, 2008).

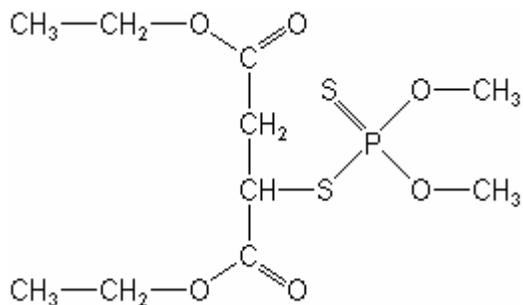


Figura 4. Estructura química del malatión.

Plaguicidas como agentes tóxicos.

Con el fin de incrementar la producción de alimentos, los plaguicidas se han utilizado de modo intensivo para el control de plagas y enfermedades, tanto en el ganado como en los cultivos. Además, con ellos se han logrado mejorar las condiciones de salud de las poblaciones humanas, al disminuir el número de diferentes vectores de enfermedades, principalmente insectos (Saunders y Harper, 1994; Kimmel et al, 1995).

Sin embargo, su uso indiscriminado produce daños importantes al medio ambiente (plantas animales, agua y suelos) y produce también resistencia de las plagas hacia dichos compuestos. Estos pueden resultar peligrosos para los humanos, ya que causan intoxicaciones agudas y crónicas, además de inducir delicados efectos indeseables como carcinogénesis, mutagénesis, teratogénesis o esterilidad (Saunders y Harper, 1994).

Aún cuando algunos plaguicidas han sido restringidos en su uso o se han prohibido por su alta toxicidad, pueden persistir en el ambiente durante mucho tiempo y constituir un peligro potencial para la vida silvestre y las poblaciones humanas, incluyendo a aquellas que dependen de los productos del mar para subsistir (Campagna et al, 2001, 2007).

Se ha demostrado que la exposición a estos agentes puede causar alteraciones en los patrones reproductivos y contribuir a incrementar problemas como subfertilidad, infertilidad, abortos (Auger et al, 1995; Zinaman et al, 1996), retardo en el crecimiento, muerte fetal y defectos al nacimiento en humanos (Shepard, 1986), o falla ovárica en el ganado (Pocar et al, 2003).

Incluso en poblaciones humanas como los Inuit de la región ártica, donde el uso de los plaguicidas no es común, se puede detectar la presencia de plaguicidas en cantidades importantes en la sangre y la leche materna. Los plaguicidas se dispersan en el medio y son

bioacumulados por los animales marinos y costeros, que constituyen el sustento de estas poblaciones (Campagna et al, 2002). Por otro lado, en las últimas décadas, la infertilidad humana se ha incrementado, y se estima que una de cada cinco parejas es infértil y se ha incrementado la incidencia de tumores gonadales, teniendo como causa probable a la exposición a estos contaminantes ambientales. (Nunziata, 1998).

Efectos de plaguicidas.

Se han realizado estudios en mamíferos, tanto domésticos como silvestres, centrándose en los efectos sobre la reproducción, el sistema nervioso o el sistema inmune.

Los efectos tóxicos de los plaguicidas en humanos se han estudiado en poblaciones ocupacionalmente expuestas o en exposiciones accidentales y se ha reportado una amplia variedad de efectos tanto agudos como crónicos, que van desde los sistémicos hasta la muerte (CICOPLAFEST, 2002).

Como ejemplo de esta variedad de efectos se puede mencionar al malatión, un insecticida OP que inhibe selectivamente a la AChE, pero que ha mostrado una multitud de efectos a nivel del desarrollo. A pesar de que es considerado como moderadamente tóxico, puede producir daños citogenéticos y genotóxicos tanto *in vivo* como *in vitro* (Contreras y Bustos-Obregón, 1999), además de que se le han atribuido propiedades mutagénicas en las células germinales (Giri et al, 2002).

Es común que los efectos tóxicos de algunos plaguicidas sean debidos no a ellos mismos, sino a alguno de los productos de su metabolismo. Así por ejemplo, se ha observado que el daño genotóxico del malatión se debe principalmente a su biotransformación en malaoxón, que puede inducir daños serios al DNA de un modo dosis-dependiente (Blasiak et

al, 1999). También se ha observado que el malatión en combinación con otro plaguicida no teratogénico, el molinato, causa una sinergia teratogénica en embriones de pollo (Jin y Kitos, 1996). Se le ha asociado también en la etiología del cáncer de mama por medio de la inducción de cambios en el epitelio de la glándula mamaria. Estos cambios parecen estar mediados por un incremento de la estimulación colinérgica en dicho tejido causada indirectamente por el insecticida (Cabello et al, 2001).

Fuentes de intoxicación.

Debido al amplio e indiscriminado uso que se hace de los plaguicidas, estos compuestos tóxicos están ampliamente distribuidos y son causantes de contaminación del aire, el agua y el suelo, así como también de alimentos, bebidas, medicamentos y enseres domésticos (Kovacic y Jacintho, 2001).

La intoxicación por estos agentes puede ocurrir por exposición laboral, por residuos en alimentos, por exposición accidental, por contacto con jardines y cultivos (Ratcliffe et al, 1993), e incluso se ha propuesto al polvo doméstico como una fuente muy importante de intoxicación al actuar como sumidero y reservorio para compuestos orgánicos semivolátiles como los plaguicidas. Esta última vía es considerada como la principal ruta de exposición de los infantes a los plaguicidas (Butte y Heinzow, 2002).

En el caso de los países del tercer mundo la exposición ocupacional a los agroquímicos, incluyendo a herbicidas e insecticidas, es muy común durante las actividades de producción, transporte, preparación y aspersión, y en los trabajadores dedicados a estas actividades la vía de intoxicación más frecuente es por contacto o inhalación (Hoyos-Giraldo, 2000).

Por otra parte, es común que las formulaciones comerciales de los herbicidas contengan agentes surfactantes u otros que favorecen la absorción por parte del organismo blanco, pero que al mismo tiempo favorecen la penetración por vía cutánea de los tóxicos. Inclusive en aquellos que presentan características hidrofóbicas se ha demostrado que pueden acumularse de modo importante en el estrato córneo de la piel o ser almacenado en el tejido adiposo (Brand y Mueller, 2002).

Se ha detectado que las enfermedades relacionadas con plaguicidas son una causa importante de morbilidad entre los trabajadores migratorios, principalmente de origen mexicano, en el estado de California, EUA. Los OP y carbamatos, así como los piretroides son los causantes de más de la mitad de casos de enfermedad aguda (Das et al, 2001).

Infertilidad producida por plaguicidas.

De todos los riesgos potenciales a la salud asociados con la exposición a agentes químicos, uno de los más preocupantes es la interferencia con la capacidad reproductiva.

Diversos estudios han reforzado la preocupación sobre las tendencias en la calidad del semen humano en los últimos 50 años. Se observa una disminución progresiva en la concentración espermática producida más que por factores genéticos, por factores ambientales entre los que se pueden contar los plaguicidas, los estrógenos exógenos y los metales pesados (Carlsen et al, 1992; Zenick et al, 1994; Sinclair, 2000; Veeramachaneni, 2000).

En los países desarrollados con población caucásica la incidencia de tumores gonadales ha aumentado considerablemente (Nunziata, 1998). También se ha observado que aproximadamente 3% de los recién nacidos presentan malformaciones congénitas o alguna variación morfológica o bioquímica (Shepard, 1986).

Del mismo modo se estima que en estos países una de cada cinco parejas es infértil y se considera que hasta el 80% de todas las concepciones no llega a término (Zenick et al, 1994; Zinaman et al, 1996). Algunos estudios realizados en parejas que recurren a clínicas de fertilidad, indican que las pérdidas recurrentes de los embarazos pueden estar relacionados en buena medida con la exposición a agentes tóxicos ambientales como los plaguicidas (Gardella y Hill, 2000).

Se han detectado grupos de agentes tóxicos, conocidos en conjunto como “disruptores endocrinos”, que interfieren en diversos puntos del eje hipotálamo-hipófisis-gónada alterando la homeostasis endocrina que puede inducir cambios importantes en la estructura o función sexual de machos y hembras, además de modificar el desarrollo embrionario. De acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental de los EUA (EPA, USA), un disruptor endocrino es cualquier agente exógeno que interfiere con la producción, liberación, transporte, metabolismo, unión, acción o eliminación de las hormonas naturales del cuerpo que son responsables de mantener la homeostasis y regulación del proceso de desarrollo (Kapp y Thomas, 2008). Este grupo de disruptores endocrinos incluyen a compuestos de origen antropogénico en su mayoría, como insecticidas organoclorados, alquil fenoles, ftalatos, bifenilos policlorados, dioxinas y éteres difenílicos polibromados, entre muchos, otros. Aún cuando estos disruptores se pueden encontrar en el ambiente en bajas concentraciones, están tan ampliamente distribuidos que pueden representar un riesgo importante para la salud (Rhind, 2002).

Existen múltiples estudios, realizados en diversas especies de anfibios o mamíferos, que muestran este efecto deletéreo de los disruptores endócrinos sobre los mecanismos reproductivos. Se ha mostrado que pueden reducir drásticamente el número de células

germinales en las gónadas (Tavera-Mendoza et al, 2002) o afectar directamente la producción de hormonas sexuales (Friedmann, 2002) y por lo tanto modificar algunos caracteres sexuales secundarios (Hayes et al, 2002). También se ha detectado que alteran el inicio de la pubertad (Stoker et al, 2002), causan un envejecimiento reproductivo acelerado (Ashby et al, 2002) o pueden inducir diversos tipos de tumores asociados con el aparato reproductor (Buranatrevedh y Roy, 2001).

Efecto de plaguicidas en la fertilización.

Se han encontrado concentraciones relevantes de plaguicidas en el fluido folicular, secreciones del tracto reproductor y en el semen de los humanos y otros animales (Campagna et al, 2001), por lo que ha resultado importante evaluar el efecto de estos agentes en la interacción de los gametos y el subsecuente desarrollo embrionario temprano.

La maduración de los ovocitos es un prerequisite crítico para los eventos posteriores de la fertilización y el desarrollo embrionario temprano, por lo que cualquier alteración de dicho proceso tiene un potencial considerable para alterar la reproducción humana. Dado que la foliculogénesis depende de varias hormonas reproductivas, la maduración de los ovocitos puede ser sensible a la acción de los plaguicidas ya sea por la interrupción de la producción o metabolismo de las hormonas o por una interferencia de la unión con sus receptores (Campagna et al, 2001).

Se ha mostrado que, por ejemplo, la exposición de ovocitos a compuestos organoclorados afecta negativamente la maduración y su subsecuente competencia para el desarrollo embrionario, disminuyendo la tasa y la calidad de los blastocistos obtenidos (Alm et al, 1998; Campagna et al, 2001).

Por otro lado, el momento de la fertilización provee de una oportunidad única al espermatozoide para llevar y descargar algún agente tóxico directamente al ovocito. Si el espermatozoide es expuesto a algún plaguicida durante su desarrollo en el testículo o durante su paso por el tracto genital femenino, puede unir a dicho agente en su membrana plasmática, el citosol o el núcleo, para liberarlo después durante la fertilización y actuar de manera directa o indirecta sobre el ovocito afectando su activación y/o posiblemente su material genético (Zenick et al, 1994). Este mecanismo de toxicidad ha recibido poca atención pero puede ser una fuente importante de daño en etapas previas al desarrollo embrionario. Por ejemplo, se ha demostrado que la cocaína se une fuertemente al espermatozoide humano, lo que puede ser una explicación para los defectos en el desarrollo que se presentan en hijos de personas farmacodependientes (Zenick et al, 1994).

El proceso reproductivo en las hembras adultas de los mamíferos es un proceso muy complejo, caracterizado por distintas fases que incluyen la ovogénesis, la fertilización y la embriogénesis y todas ellas se encuentran bajo el estricto control de hormonas esteroides (Betancourt et al, 2003). Por lo tanto para conocer los mecanismos por los que un xenobiótico produce algún daño reproductivo, es necesario estudiar cada fase por separado ya que cada agente químico puede tener distintos blancos y producir distintos efectos dependiendo del órgano o tipo celular involucrado.

Los ovocitos inmaduros, encerrados dentro del folículo ovárico, se encuentran detenidos en la profase de la primera división meiótica y para completar su maduración y liberación del folículo, es indispensable la participación de señales hormonales adecuadas (Eppig, 1993). Es por esto que la maduración es un evento crítico para la fertilización y el

desarrollo embrionario que ocurren a continuación y es un evento dentro del fenómeno reproductivo muy sensible a las agresiones de parte de distintos xenobióticos.

Métodos de evaluación de toxicidad.

De manera general, la mayoría de los estudios toxicológicos son descriptivos y se limitan a las observaciones de los efectos que tiene un tóxico sobre algunas características de los organismos, como peso corporal o histopatología de los órganos, y en el caso de aquellos compuestos que afectan la función reproductiva, los estudios se han enfocado a los efectos de la exposición *in utero* sobre el desarrollo embrionario y fetal (Brusick, 1987; Zenick et al, 1994). La mayor parte de la información sobre agentes que afectan la función reproductiva son derivados de estudios con animales, ya que es muy complicado realizar estudios epidemiológicos en humanos, debido principalmente a la dificultad de obtener una muestra de tamaño adecuado. Es por esto que los procedimientos de prueba estándar para determinar la toxicología aguda, subcrónica y crónica pueden no ser suficientes para detectar la toxicidad reproductiva o del desarrollo (Manson y Kang, 1994). También cabe aclarar que es común que estos estudios sean imperfectos, no necesariamente debido al diseño experimental, sino debido a múltiples variables fuera de control del investigador (Sharpe, 2000).

El interés por la evaluación de los efectos de agentes tóxicos en la integridad y competencia reproductivas de los humanos se ha incrementado, empleando para ello bioensayos analíticos que intentan descifrar el mecanismo de acción de los tóxicos y establecer en lo posible una relación entre el grado de exposición a un químico con el síndrome de toxicidad observado (Brusick, 1987). Con esto se pretende lograr que los métodos de evaluación para las sustancias reprotóxicas disminuyan sus costos y cuenten con protocolos

de menor duración que los actuales, ya que es práctica común que algunos de estos estudios sean multigeneracionales. Sin embargo, dada la gran cantidad de agentes tóxicos a los que estamos expuestos, y de los cuales sólo a un porcentaje muy bajo se le ha evaluado el riesgo reproductivo, se hace necesaria la utilización de sistemas *in vitro* que permitan una valoración rápida, económica y precisa del daño causado por dichos agentes.

Los estudios *in vivo* en animales experimentales, trabajadores ocupacionalmente expuestos y comunidades expuestas proveen información acerca de los efectos tóxicos de los plaguicidas. No obstante el uso de modelos *in vitro* puede proveer información valiosa para entender los mecanismos básicos de la toxicidad, lo cual es complicado de identificar en el organismo íntegro (Kimmel et al, 1995). Por esto es importante realizar estudios de toxicología reproductiva para dilucidar los mecanismos por los cuales los xenobióticos afectan a la gametogénesis, la fertilización y el desarrollo embrionario temprano.

En el laboratorio de Biología Celular de la UAMI, se han realizado diversos estudios con plaguicidas para determinar su efecto en procesos tales como la capacitación y reacción acrosomal (Maravilla-Galván et al, 2009), la movilidad espermática (Betancourt et al, 2006b), la maduración de ovocitos (Casas et al, 2010), la fertilización y el desarrollo embrionario temprano (Ducolomb et al, 2009, Salazar et al, 2007) y la ovogénesis temprana (Bonilla et al, 2008). Asimismo, se han desarrollado trabajos del efecto reprotóxico de metales (Aldama et al, 2001), antibióticos (González-Mandujano, A. 1998), plastificantes y antineoplásicos (Bonilla, 2000).

Justificación.

Dado el uso indiscriminado de los plaguicidas en nuestro país y para determinar el grado real de su efecto sobre la población y el medio ambiente, se han realizado algunos estudios que incluyen la identificación y cuantificación de plaguicidas organoclorados en sedimentos y organismos acuáticos en el lago de Catemaco (Calderón et al, 2001) y en sistemas lagunares del Estado de Chiapas (Rueda, et al, 1997), así como el efecto de plaguicidas OP en trabajadores industrialmente expuestos (Palacios et al, 1999).

Sin embargo, es poco lo que se sabe en nuestro país acerca del daño producido en el sistema reproductivo de los humanos y otros animales expuestos a plaguicidas. La importancia de los estudios de toxicología reproductiva a nivel básico radica en la necesidad de conocer los mecanismos por los cuales los plaguicidas afectan a los gametos durante su génesis y función, además de las repercusiones que puedan tener en la concepción y desarrollo de nuevos individuos, así como también los efectos producidos en su descendencia.

Hipótesis.

Se ha demostrado que los plaguicidas pueden tener efecto sobre organismos diferentes de aquellos contra los que son utilizados y actuar por mecanismos de acción diferentes a los descritos. Entre otros, se incluyen los efectos demostrados sobre el sistema reproductor de distintas especies de mamíferos menores.

En el presente estudio se esperan encontrar efectos similares que afecten a la maduración *in vitro* y a la viabilidad de ovocitos de cerdo expuestos a distintos plaguicidas.

Objetivo general

Evaluar el efecto a nivel celular de los insecticidas diazinón y malatión y los herbicidas atrazina y fenoxaprop-etil, durante la maduración de ovocitos de cerdo *in vitro*.

Objetivos particulares

1. Determinar el efecto de los plaguicidas antes mencionados en la viabilidad y la maduración nuclear de los ovocitos.
2. Correlacionar el efecto de cada plaguicida con ambos parámetros.

Materiales y métodos.

Todos los reactivos empleados fueron de la marca Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.), a menos que se indique lo contrario.

Obtención y maduración de ovocitos.

Se colectaron los ovarios de cerdas de aproximadamente 6 meses de edad, recién sacrificadas en el rastro Los Arcos, Estado de México, y se transportaron al laboratorio en solución salina (NaCl, 0.9%) con penicilina (75 µg/ml) y estreptomycin (50 µg /ml), a 25-28 °C. Los complejos ovocitos-células cúmulo se aspiraron de folículos de 3 a 5 mm, utilizando una jeringa desechable de 10 ml con aguja de calibre 18. El fluido folicular colectado se depositó en un tubo de centrifuga y se dejó sedimentar. Se desechó el sobrenadante y el paquete celular se lavó dos veces con medio TBM (medio amortiguado con TRIS: NaCl 113 mM, KCl 3 mM, CaCl₂ – 2H₂O 7.5 mM, TRIS 20 mM, glucosa 11 mM, piruvato de sodio 5 mM).

Se seleccionaron aquellos ovocitos rodeados por una capa compacta de células cúmulo y se lavaron tres veces con TBM (figura 5). Se transfirieron 30 complejos ovocitos-células cúmulo a cada pozo de una caja de 4 multipozos (Nunc, Dinamarca), que contenía 500 µl de medio de cultivo (TCM 199, In Vitro, México), suplementado con glucosa 3 mM, piruvato de sodio 0.91 mM, alcohol polivinílico 0.1 % (v/v), cisteína 0.57 mM, EGF 10 ng/ml, penicilina 75 µg/ml, estreptomycin 50 µg/ml, FSH 1 U/ml y LH 1 U/ml. Los complejos ovocitos-células cúmulo se incubaron a 39 °C, con humedad a saturación y 5% de CO₂, por 44 h para su maduración (Wang y Niwa, 1995; Abeydeera et al, 1998).

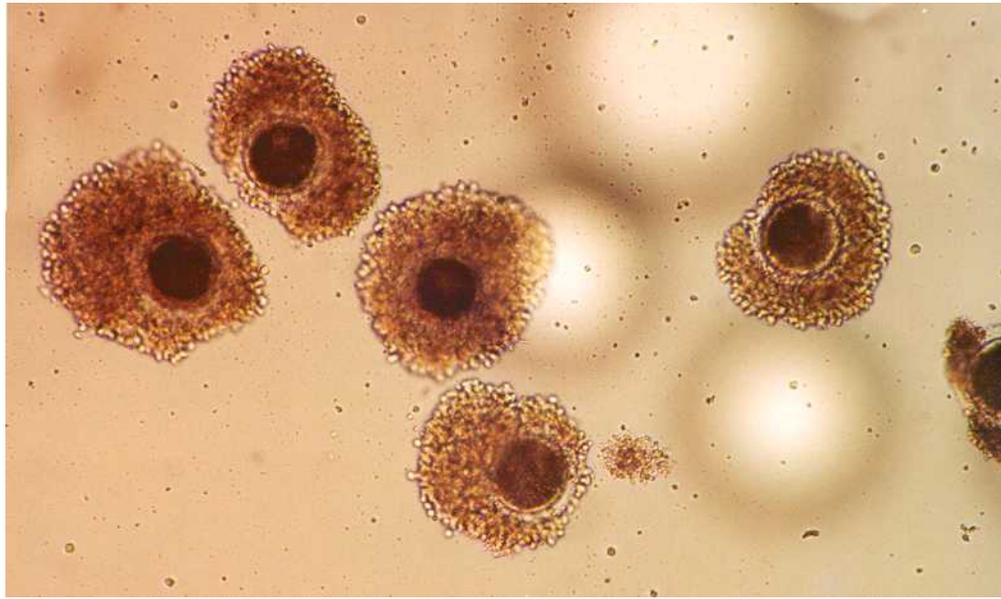


Figura 5. Para la maduración se seleccionaron aquellos ovocitos rodeados de una capa compacta de células cúmulo y el citoplasma uniforme.

Tratamiento con plaguicidas

Para evaluar el efecto de los plaguicidas en la viabilidad y maduración de los ovocitos, se emplearon los herbicidas atrazina y fenoxaprop-etil (Aventis Cropscience, México) de grado técnico, y los insecticidas malatión (Agricultura Nacional, México) y diazinón (Tridente, México) en su formulación comercial.

Se prepararon soluciones 10 mM en etanol absoluto para los herbicidas y en agua desionizada para los insecticidas. En ensayos preliminares se observó que los disolventes de dichas soluciones, adicionados al medio de cultivo en concentraciones equivalentes a aquellas en que se disolvieron los plaguicidas, no afectaron la viabilidad ni la maduración de los ovocitos (datos no mostrados).

Para probar el efecto de los plaguicidas en la viabilidad, a cada pozo se agregaron alícuotas de la solución 10 mM de los plaguicidas en el intervalo de concentraciones finales de 0 a 500 μM , al inicio del período de 44 h de maduración. De acuerdo con estos resultados en la viabilidad (datos no mostrados), se emplearon concentraciones finales de atrazina y fenoxaprop-etil de 0, 50, 100 y 500 μM . Los insecticidas diazinón y malatión se emplearon en concentraciones de 0, 25, 50 y 100 μM y 0, 0.5, 1, 10, 25, 50 y 100 μM , respectivamente, en virtud de que a partir de la concentración de 100 μM , la viabilidad disminuyó considerablemente.

Evaluación de la viabilidad y la maduración.

La viabilidad y estado de maduración de los ovocitos se evaluó de modo simultáneo en el mismo ovocito. Después de la maduración *in vitro*, se removieron las células del cúmulo con hialuronidasa 0.1% en PBS. Los ovocitos se lavaron con TBM y se incubaron con bromuro de metil-tiazolil-difenil-tetrazolio (MTT) 0.5 mg/ml, por 2 h para evaluar la viabilidad y se lavaron nuevamente con TBM. Posteriormente, los ovocitos se incubaron con bisbenzimidida (Hoechst 33342) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, por 40 min, para evaluar la maduración, se lavaron en TBM y se incubaron en solución hipotónica (citrato de sodio 0.075%) por 20 min. Finalmente se fijaron en paraformaldehído 2% toda la noche y se montaron en glicerol-PBS (1:9) (Casas et al, 1999).

Al evaluar a los ovocitos bajo el microscopio de campo claro, aquellos que presentaron una coloración violeta fueron considerados como vivos, mientras que los incoloros se consideraron como muertos. La maduración fue analizada por medio de un microscopio de

epifluorescencia (Zeiss Axiostar). Los ovocitos que presentaban una vesícula germinal (VG) fueron considerados como inmaduros, aquellos con los cromosomas en metafase I (MI) como en vías de maduración y los que se encontraban en la segunda metafase (MII) y con un cuerpo polar, como maduros. (Figura 6).

Análisis estadístico.

Se realizaron pruebas estadísticas no paramétricas, en virtud de que los datos obtenidos son variables discretas. Todos los ensayos se realizaron al menos por cuadruplicado.

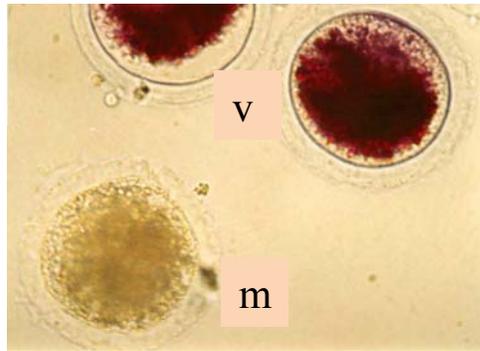
La correlación entre la concentración de los plaguicidas y su efecto en la viabilidad y maduración de los ovocitos, se evaluó empleando el coeficiente de correlación de rangos de Spearman.

La concentración de plaguicida requerida para disminuir la viabilidad de los ovocitos al 50% (concentración letal 50, CL_{50}) y la concentración necesaria para inhibir en un 50% la maduración (inhibición de maduración 50, IM_{50}) fueron calculadas a partir de una regresión no lineal. Tanto para la correlación de Spearman, como para la regresión, se emplearon datos normalizados, considerando a los controles como 100%.

Los porcentajes de las fases de la meiosis para cada concentración se compararon utilizando la prueba de χ^2 .

Se consideró como estadísticamente significativa a una probabilidad de $p < 0.05$.

A)



B)

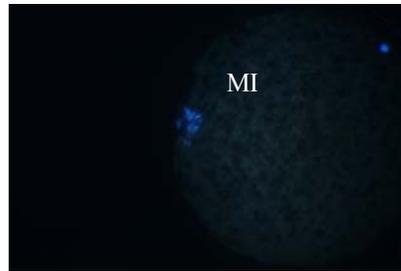


Figura 6. La evaluación de la viabilidad se hizo mediante la tinción de MTT (A). Los ovocitos claros fueron considerados muertos (m), mientras que aquellos de color violeta intenso fueron clasificados como vivos (v). Para evaluar el estado de maduración, la cromatina se tiñó con Hoechst (B). Los que presentaron VG se consideraron inmaduros, los que se presentaron en MI como en vías de maduración y maduros a aquellos con MII y cuerpo polar.

Resultados.

Efecto de la atrazina en la viabilidad y maduración de los ovocitos.

Se analizaron un total de 664 ovocitos en cinco ensayos, con concentraciones de atrazina de 0, 50, 100 y 500 μM . La prueba de Spearman no mostró correlación entre las distintas concentraciones y la viabilidad de los ovocitos, ya que ésta no se vio afectada ($r = -0.42$), por lo que no fue posible calcular la CL_{50} ; sin embargo, la correlación con la maduración de los ovocitos fue significativa ($r = -0.91$) y la IM_{50} estimada fue de 143 μM (figura 7).

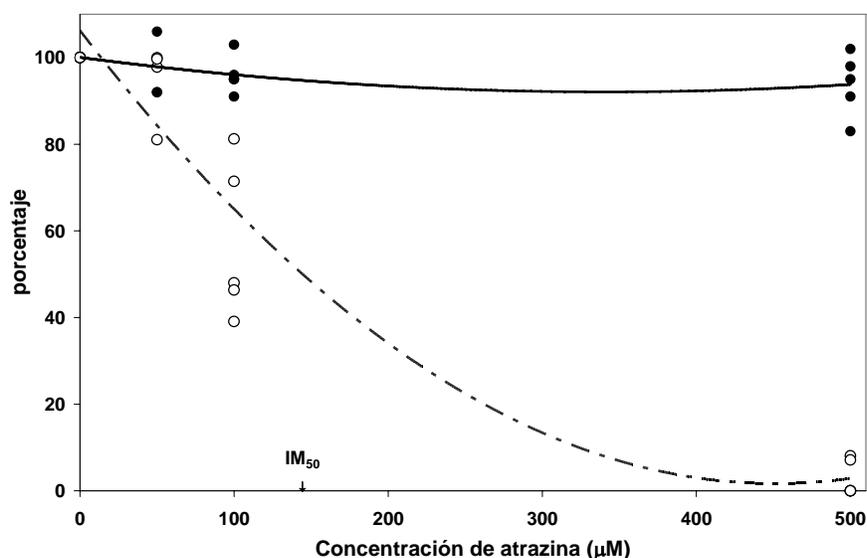


Figura 7. Efecto de la atrazina en la viabilidad (círculos oscuros: porcentaje de viabilidad; línea continua: regresión no lineal) y en la maduración *in vitro* (círculos claros: porcentaje de maduración; línea punteada: regresión no lineal) de ovocitos de cerdo que estuvieron en contacto con el herbicida durante 44 h de cultivo. Se muestran los datos normalizados para cada ensayo. Un total de 664 ovocitos fueron analizados en cinco ensayos. La correlación de Spearman para la viabilidad no fue significativa ($r = -0.42$, $p > 0.05$); por esta razón, no fue posible calcular la CL_{50} . La correlación de Spearman para la maduración fue significativa ($r = -0.91$, $p < 0.05$), y de acuerdo con la regresión, la IM_{50} estimada fue de 143 μM .

El porcentaje de ovocitos en VG (25%) con la concentración de 50 μM fue igual al del control (16%), pero con las concentraciones de 100 y 500 μM , el porcentaje se incrementó significativamente a 40% y 79%, respectivamente, ($p < 0.05$; Tabla 1). Los porcentajes de MI no fueron afectados por ninguna de las concentraciones del herbicida, (23%, 16%, 27% y 19%, respectivamente). El porcentaje de ovocitos maduros (MII) disminuyó a 33% en 100 μM y a 2% en 500 μM ($p < 0.05$); a 50 μM , el valor fue similar al control (59%) ($p > 0.05$) (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la atrazina en la maduración meiótica *in vitro* de ovocitos porcinos. Las células se incubaron con el herbicida durante las 44 h de maduración.

Atrazina (μM)	N° ovocitos analizados	N° de ovocitos en VG (%)	N° de ovocitos en MI (%)	N° de ovocitos en MII (%)
0	164	27(16)	38(23)	99(61)
50	158	39(25)	25(16)	94(59)
100	153	61(40)*	42(27)	50(33)*
500	156	123(79)*	30(19)	3(2)*

El número de ovocitos es de un total de 5 ensayos.

*: diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$

Efecto del fenoxaprop-etil (FE) en la viabilidad y maduración de los ovocitos.

Se analizaron 560 ovocitos en cuatro ensayos a concentraciones de 0, 50, 100 y 500 μM de FE. La correlación de Spearman fue significativa para ambos parámetros: viabilidad ($r = -0.94$), y maduración ($r = -0.97$). La CL_{50} para este herbicida fue de 148 μM y la IM_{50} de 63 μM (figura 8).

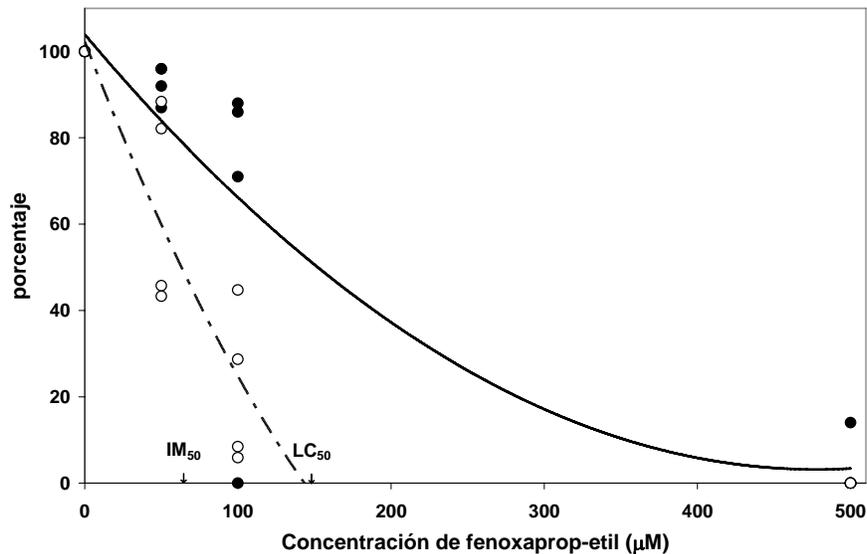


Figura 8. Efecto del fenoxaprop-etil en la viabilidad (círculos oscuros: porcentaje de viabilidad; línea continua: regresión no lineal) y en la maduración *in vitro* (círculos claros: porcentaje de maduración; línea punteada: regresión no lineal) de ovocitos de cerdo que estuvieron en contacto con el herbicida durante 44 h de cultivo. Se muestran los datos normalizados para cada ensayo. Un total de 560 ovocitos en cuatro ensayos fueron analizados. La correlación de Spearman para la viabilidad fue significativa ($r = -0.94$, $p < 0.05$); y de acuerdo con la regresión, la CL_{50} corresponde a $148 \mu\text{M}$. La correlación de Spearman para la maduración también fue significativa ($r = -0.97$, $p < 0.05$), y de acuerdo con la regresión, la IM_{50} estimada fue de $63 \mu\text{M}$.

La reducción en la maduración de los ovocitos (MII) fue proporcional a las concentraciones crecientes de FE (Tabla 2). Al final del período de maduración, el porcentaje de ovocitos en VG fue significativamente mayor para todas las concentraciones (41%, 66% y 86%) que el del grupo control (17%) ($p < 0.05$). Los valores de MI no fueron afectados en ninguna de las concentraciones del herbicida: 24%, 22%, 20% y 14%, respectivamente. El porcentaje de ovocitos maduros (MII) disminuyó a medida que se incrementaron las concentraciones de FE: 37%, 14% y 0% en comparación con el control (59%) ($p < 0.05$).

Tabla 2. Efecto del fenoxaprop-etil en la maduración meiótica *in vitro* de ovocitos porcinos. Las células se incubaron con el herbicida durante las 44 h de maduración.

FE (μM)	N° de ovocitos analizados	N° de ovocitos en VG (%)	N° de ovocitos en MI (%)	N° de ovocitos en MII (%)
0	150	26(17)	36(24)	88(59)
50	138	56(41)*	31(22)	51(37)*
100	125	82(66)*	25(20)	18(14)*
500	125	107(86)*	18(14)	0(0)*

El número de ovocitos es de un total de 4 ensayos.

*: diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$

Efecto del diazinón en la viabilidad y maduración de los ovocitos.

Se analizaron 590 ovocitos en cinco ensayos con concentraciones de diazinón 0, 25, 50 y 100 μM . Los coeficientes de correlación de Spearman entre la concentración y la viabilidad ($r = -0.82$), y la concentración y la maduración ($r = -0.87$), fueron significativos. La CL_{50} calculada para este insecticida fue de 72 μM , mientras que la IM_{50} fue de 22 μM (figura 9).

La reducción en la maduración de los ovocitos fue proporcional al incremento en las concentraciones de diazinón (Tabla 3). Al término del período de maduración, el porcentaje de ovocitos en VG fue significativamente mayor para todas las concentraciones de insecticida: (53%, 82% y 84%) en comparación con el control (20%) ($p < 0.05$). El porcentaje de ovocitos en MI para la concentración de 25 μM de diazinón (18%) fue similar al control (28%), mientras que para el resto de las concentraciones, fue significativamente diferente (16% y 15%, respectivamente) ($p < 0.05$). El porcentaje de ovocitos maduros (MII) disminuyó con las concentraciones crecientes de diazinón (29%, 2% y 2%) en comparación con el control (52%) ($p < 0.05$).

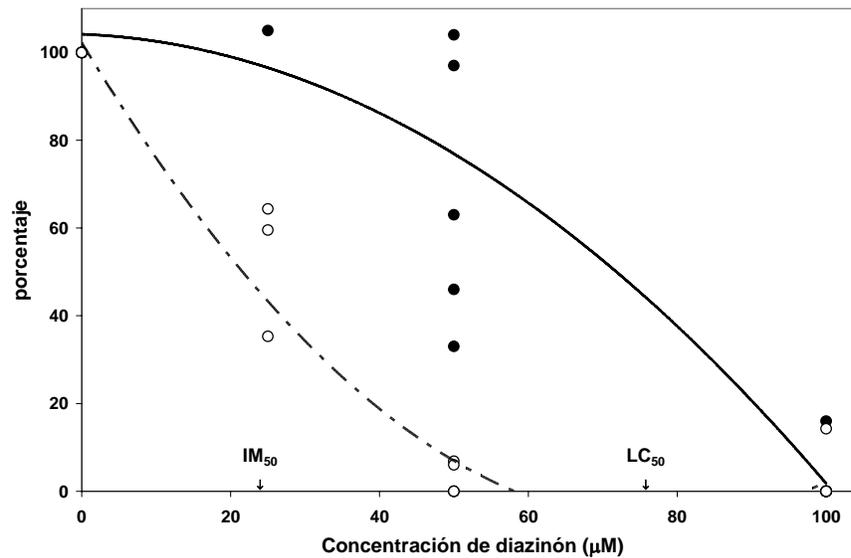


Figura 9. Efecto del diazinón en la viabilidad (círculos oscuros: porcentaje de viabilidad; línea continua: regresión no lineal) y en la maduración *in vitro* (círculos claros: porcentaje de maduración; línea punteada: regresión no lineal) de ovocitos de cerdo que estuvieron en contacto con el insecticida durante 44 h de cultivo. Se muestran los datos normalizados para cada ensayo. Un total de 590 ovocitos en cinco ensayos fueron analizados. La correlación de Spearman para la viabilidad fue significativa ($r = -0.82$, $p < 0.05$); y de acuerdo con la regresión, la CL_{50} corresponde a $72 \mu\text{M}$. La correlación de Spearman para la maduración también fue significativa ($r = -0.87$, $p < 0.05$), y de acuerdo con la regresión, la IM_{50} estimada fue de $22 \mu\text{M}$.

Tabla 3. Efecto del diazinón en la maduración meiótica *in vitro* de ovocitos porcinos. Las células se incubaron con el insecticida durante las 44 h de maduración.

Diazinón (μM)	N° de ovocitos analizados	N° de ovocitos en VG (%)	N° de ovocitos en MI (%)	N° de ovocitos en MII (%)
0	139	28(20)	39(28)	72(52)
25	77	41(53)*	14(18)	22(29)*
50	130	107(82)*	21(16)*	2(2)*
100	131	110(84)*	19(15)*	2(2)*

El número de ovocitos es de un total de 5 ensayos.

*: diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$

Efecto del malatión en la viabilidad y maduración de los ovocitos.

Se evaluó un total de 866 ovocitos en siete ensayos con concentraciones de malatión de 0, 0.5, 1, 10, 25, 50 y 100 μM . El coeficiente de correlación de Spearman fue significativo, tanto para la viabilidad ($r = -0.52$) como para la maduración ($r = -0.92$). La CL_{50} fue de 57 μM y la IM_{50} de 25 μM (figura 10).

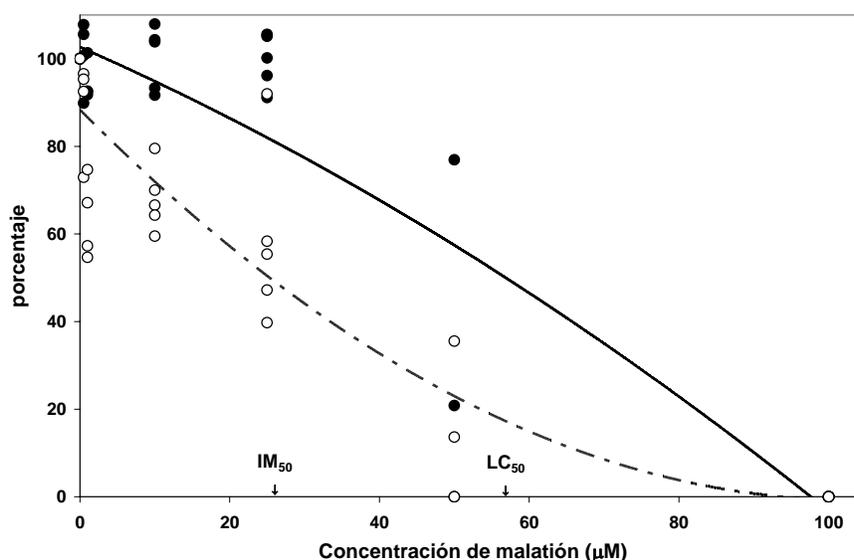


Figura 10. Efecto del malatión en la viabilidad (círculos oscuros: porcentaje de viabilidad; línea continua: regresión no lineal) y en la maduración *in vitro* (círculos claros: porcentaje de maduración; línea punteada: regresión no lineal) de ovocitos de cerdo que estuvieron en contacto con el insecticida durante 44 h de cultivo. Se muestran los datos normalizados para cada ensayo. Un total de 866 ovocitos en siete ensayos fueron analizados. La correlación de Spearman para la viabilidad fue significativa ($r = -0.52$, $p < 0.05$); y de acuerdo con la regresión, la CL_{50} corresponde a 57 μM . La correlación de Spearman para la maduración también fue significativa ($r = -0.92$, $p < 0.05$), y de acuerdo con la regresión, la IM_{50} estimada fue de 25 μM .

El porcentaje de ovocitos en VG a la concentración de 0.5 μM (22%) fue similar al del control (20%), pero fue más alto, de modo significativo, que el de las concentraciones de 1, 10, 25, 50 y 100 μM (39%, 34%, 46%, 76% y 97%) ($p < 0.05$) (Tabla 4). La proporción de

ovocitos en MI en el grupo control (16%), fue similar ($p > 0.05$) para el resto de las concentraciones (23%, 22%, 20%, 15% y 9%), excepto para la de 100 μM que mostró un valor menor (3%) ($p < 0.05$). El porcentaje de ovocitos en MII a 0.5 μM (55%) fue similar al control (64%), disminuyendo significativamente a las concentraciones de malatión de 1, 10, 25, 50 y 100 μM (39%, 46%, 39%, 15% y 0%, respectivamente) ($p < 0.05$) (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto del malatión en la maduración meiótica *in vitro* de ovocitos porcinos. Las células se incubaron con el insecticida durante las 44 h de maduración.

Malatión (μM)	N° de ovocitos analizados	N° de ovocitos en VG (%)	N° de ovocitos en MI (%)	N° de ovocitos en MII (%)
0	203	41(20)	32(16)	130(64)
0.5	104	23(22)	24(23)	57(55)
1	105	41(39)*	23(22)	41(39)*
10	123	42(34)*	25(20)	56(46)*
25	112	51(46)*	17(15)	44(39)*
50	68	52(76)*	6(9)	10(15)*
100	95	92(97)*	3(3)*	0(0)*

El número de ovocitos es de un total de 7 ensayos.

*: diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$

Discusión.

El efecto de contaminantes ambientales, tales como los plaguicidas, en la maduración *in vitro* de ovocitos se ha examinado en distintas ocasiones (Campagna et al, 2002, 2001; Pocar et al, 2003; Graves et al, 2002; Anas et al, 2003; La Chapelle et al, 2007).

Además, se ha reportado una disminución progresiva en la concentración espermática del semen humano en los últimos 50 años, producida por factores ambientales más que genéticos (Carlsen et al, 1992; Zenick et al, 1994; Veeramachaneni, 2000) y un aumento notable en la incidencia de tumores gonadales en la población caucásica de países desarrollados (Nunziata, 1998). Existen también algunos estudios realizados en parejas infértiles que indican que la pérdida recurrente de embarazos puede relacionarse con la exposición a agentes tóxicos (Gardella y Hill, 2000).

Es por estas razones, que surge la necesidad de contar con bioensayos rápidos y confiables que permitan, como en el presente trabajo, no sólo establecer el posible efecto tóxico de un agente químico, sino al mismo tiempo arrojar luz sobre los mecanismos involucrados en el daño observado.

En el presente estudio, se empleó un método de tinción doble (MTT + bisbenzimidida) para evaluar el efecto de los plaguicidas en la viabilidad y progresión de la maduración en el mismo ovocito. Con esta técnica, el efecto del plaguicida en cada parámetro puede ser evaluado, y se puede inferir una posible relación directa entre ambos parámetros. Uno de los principales hallazgos fue el hecho de que los plaguicidas ensayados tienen un efecto más marcado en la maduración que en la viabilidad (figuras 7-10). Al comparar las CL_{50} y la IM_{50}

en todos los casos, la concentración necesaria para inhibir la maduración fue menor que la requerida para inducir la muerte de los ovocitos (Tabla 5).

Tabla 5. Concentración letal 50 (CL₅₀) y concentración de inhibición de maduración 50 (IM₅₀) de los diferentes plaguicidas ensayados en el presente estudio.

Plaguicida	CL ₅₀ (μM)	IM ₅₀ (μM)
Atrazina	No calculada	143
Fenoxaprop-etil	148	63
Diazinón	72	22
Malatión	57	25

El caso más extremo fue el de la atrazina, para la que no fue posible calcular la CL₅₀. La viabilidad no se modificó en el intervalo de concentraciones ensayado, incluso a la mayor concentración, aún cuando la maduración disminuyó en un 50% a la concentración de 143 μM. Por lo tanto, la concentración requerida para destruir a los ovocitos es mucho mayor que la necesaria para inhibir su maduración. Por otro lado, el FE afectó tanto la viabilidad como la maduración a concentraciones relativamente mayores que la atrazina: la CL₅₀ (148 μM) fue más de dos veces mayor que la IM₅₀ (63 μM).

El diazinón mostró la mayor diferencia: la CL₅₀ (72 μM) fue más de tres veces mayor que la IM₅₀ (22 μM). Con el malatión, la CL₅₀ (57 μM) fue dos veces mayor que la IM₅₀ (25 μM).

Se puede observar que de modo general los insecticidas resultaron más tóxicos que los herbicidas, siendo el diazinón el más agresivo y la atrazina el que aparentemente causa el

menor efecto. Estos hallazgos pueden resultar importantes en relación con el proceso reproductivo normal, ya que es bien conocido que la maduración de los ovocitos es un evento crucial para la fertilización y el desarrollo embrionario temprano, por lo que la acción de estos plaguicidas durante el proceso de maduración puede resultar en efectos deletéreos para etapas posteriores.

La reproducción es un proceso complejo que comprende la gametogénesis, la fertilización, el desarrollo embrionario y fetal y finalmente el parto. Cada evento resulta muy relevante ya que el daño de cualquiera de ellos, puede afectar severamente a los siguientes estadios.

Campagna et al (2001) demostraron que al exponer a ovocitos inmaduros *in vitro* a una mezcla de plaguicidas organoclorados en el medio de maduración, la penetración espermática y las tasas de polispermia disminuyeron, mientras que el desarrollo hasta mórula no se vio afectado.

En nuestro laboratorio se ha estudiado el efecto de los plaguicidas en diferentes etapas reproductivas *in vitro* (Betancourt et al, 2006a). Para estudiar el efecto del malatión y el diazinón en la ovogénesis temprana de ratón, se cultivaron ovarios fetales en presencia de los plaguicidas por 24 h y se determinó que la viabilidad disminuye significativamente. Además, al analizar los cambios en la expresión génica de estos ovocitos mediante la generación de genotecas de cDNA, se encontró que el malatión y el diazinón (en concentraciones de 250 μ M y 900 nM, respectivamente) alteran la regulación de varios genes involucrados en la transcripción (BP75), traducción (proteína ribosomal 5S) y función mitocondrial (citocromo oxidasa, unidades I y III) (Bonilla et al, 2008).

Para estudiar el efecto de los insecticidas en la fertilización *in vitro* (FIV), los gametos porcinos se coincubaron por siete h en presencia de concentraciones crecientes de diazinón y malatión, y para el desarrollo embrionario temprano, los cigotos se cultivaron en el medio de desarrollo en presencia de los insecticidas. El diazinón no afectó la viabilidad ni la división embrionaria, pero sí lo hizo con la FIV y retrasó la formación de mórulas. Por su parte, el malatión afectó a los cuatro parámetros estudiados pero a concentraciones más bajas, resultando en estas condiciones más tóxico que el diazinón (Ducolomb et al, 2009).

También se ha estudiado el efecto del malatión en la expresión génica durante el desarrollo embrionario temprano, para lo cual se sometió a los ovocitos de cerdo a una concentración subletal del insecticida después de la fertilización. Esto disminuyó en un 50% la formación de mórulas, y al realizar un análisis diferencial de la expresión génica, se pudo observar una disminución en la expresión de al menos 11 genes, tanto mitocondriales como nucleares (Salazar et al, 2007).

En otro estudio, se evaluó el efecto de los cuatro plaguicidas, empleados en el presente trabajo, en la viabilidad y patrones de movimiento de espermatozoides de cerdo. En todos los casos, los patrones de movilidad, en especial la movilidad progresiva, se vieron afectados de un modo más pronunciado que la viabilidad. Los resultados obtenidos permiten suponer un efecto de los plaguicidas sobre la actividad mitocondrial, responsable de la motilidad espermática (Betancourt et al, 2006b). También se determinó el efecto de los herbicidas sobre la capacitación y reacción acrosomal espontánea e inducida con progesterona, incubándolos 4 h en presencia de los herbicidas. Con el fenoxaprop-etil se observó un incremento de la capacitación y la reacción acrosomal, mientras que con la atrazina la capacitación se vio disminuida, en tanto que la reacción acrosomal se incrementó (Maravilla-Galván et al, 2009).

Estos efectos sobre la fisiología del espermatozoide, podrían explicar la reducción de la FIV por una acción directa sobre el gameto masculino.

En conjunto, todos estos resultados indican que cada uno de los eventos de la reproducción presenta diferente sensibilidad a los plaguicidas empleados, y que inclusive dichos efectos pueden ser detectados solamente hasta una etapa posterior. Esto puede explicarse en función de la diversidad de estructuras de los plaguicidas empleados, que seguramente actúan a través de diferentes mecanismos de acción.

Aunque existen reportes de que la exposición de los ovocitos a químicos tóxicos pueden inducir fallas en la fertilización (Campagna et al, 2001; Anas et al, 2003; Alm et al, 1998), no se ha demostrado una correlación directa entre tales alteraciones y la viabilidad de los gametos. Los resultados del presente trabajo indican que en algunos casos, la infertilidad puede explicarse por una falla en la maduración más que por la muerte del ovocito.

Un estudio acerca de los efectos de los bifenilos policlorados en la maduración *in vitro* de ovocitos de bovino, mostró que los ovocitos expuestos quedan detenidos en la metafase I por un bloqueo en el proceso de maduración (Pocar et al, 2001). Esto no fue el caso en el presente estudio, ya que en relación a los estados de maduración, a medida que se incrementa la concentración de los plaguicidas también aumenta el porcentaje de ovocitos que permanecen en estado de VG, indicando un bloqueo en el reinicio de la meiosis. El porcentaje de ovocitos tratados con los herbicidas, que permanecen en MI, fue similar al control en todas las concentraciones, mientras que para los insecticidas este porcentaje fue similar al control en concentraciones menores o iguales a la CL_{50} (Tablas 1-4). Por lo anterior, se puede suponer que la MI es sólo una fase de transición entre la VG y la maduración que no es afectada de modo significativo por los plaguicidas en concentraciones subletales. Esto sugiere que

aquellos ovocitos que rompen la VG eventualmente completarán la maduración nuclear. Por encima de la CL_{50} , la MII fue completamente suprimida y el incremento en el bloqueo de la maduración fue causado por la muerte de las células.

Los plaguicidas presentan una diversidad de estructuras químicas que hace difícil generalizar acerca de los mecanismos involucrados en su toxicidad, así como también acerca de sus efectos sobre la función celular (Ecobichon, 2001).

Los herbicidas modernos tienen mecanismos más fitoespecíficos y en general no causan problemas graves en animales o humanos (Cremlyn, 1991). Sin embargo, existen reportes que indican que algunos de ellos pueden producir importantes efectos colaterales en la función reproductiva.

Este es el caso de la atrazina, una triazina que inhibe al fotosistema II en las malezas (Labrada et al, 1996). Se ha utilizado por 40 años y es, tal vez, el herbicida de mayor uso en el mundo. Debido a su corta vida media, escasa bioacumulación y aparente falta de efectos en los animales adultos, ha sido considerado como un plaguicida seguro (Hayes et al, 2002). No obstante, se ha demostrado que puede retrasar el inicio de la pubertad femenina (Stoker et al, 2002), reducir el número de células germinales en el ovario (Tavera-Mendoza et al, 2002), e inducir un envejecimiento reproductor prematuro y la formación de tumores mamarios (Ashby et al, 2002). Muchos de estos efectos han sido atribuidos que la atrazina es un disruptor endocrino, y puede actuar ya sea como un agonista de estrógenos o aumentando la producción de estas hormonas (Cooper et al, 2000; Cooper et al, 2007).

Los disruptores endocrinos son un grupo de xenobióticos, que incluye al diazinón y al malatión entre otros, que alteran la homeostasis endocrina mimetizando a las hormonas naturales o bloqueando sus receptores lo que induce a respuestas endocrinas anormales (Pocar

et al, 2003; Olea et al, 2002). El ciclo reproductor en las hembras adultas es un proceso complejo, que incluye a la gametogénesis y embriogénesis, bajo el control de hormonas esteroides, haciéndolo blanco potencial para los disruptores endocrinos (Pocar et al, 2003; Cummings et al, 2000). Las alteraciones en la maduración pueden ser el resultado de un efecto tóxico directo sobre el ovocito, induciendo en algunos casos su destrucción. Los bifenilos policlorados disminuyen la maduración nuclear del ovocito alterando los patrones de poliadenilación del RNA, y modificando la migración y exocitosis de los gránulos corticales (Pocar et al, 2001, 2003). Las células foliculares que rodean al ovocito mantienen una estrecha comunicación con éste y le permiten completar su crecimiento y maduración dentro del folículo, por lo que los mecanismos mencionados pueden afectar indirectamente la producción de esteroides por estas células, interfiriendo con la maduración apropiada del gameto femenino (Hoyer, 1999; Beker-van Wouldenbergh et al, 2004). De este modo, es posible que la atrazina cause el efecto observado en el presente estudio por una acción directa sobre el ovocito o de modo indirecto sobre las células foliculares.

El FE, un herbicida arilfenoxialcanoico, inhibe la síntesis de lípidos en los meristemas de las plantas por una inhibición directa de la acetil-CoA carboxilasa (Waller et al, 2003; Peterson et al, 2001). No hay reportes que indiquen alguna capacidad mutagénica o carcinogénica de este compuesto, ni existen estudios que muestren su influencia en la fertilidad o el proceso reproductivo. El presente estudio muestra que el FE afecta la maduración nuclear de los ovocitos bajo condiciones experimentales, por un mecanismo aún desconocido.

El diazinón y el malatión, como insecticidas OP, actúan en los animales por inhibición de la acetilcolinesterasa, lo que induce una acumulación de la acetilcolina en las sinapsis

colinérgicas y las uniones neuromusculares. Esta acumulación es la responsable directa o indirecta de los efectos tóxicos de estos insecticidas (Cremllyn, 1991; Ferrer, 2003). Los OP tiene también la habilidad de fosforilar diversas proteínas, incluyendo a la carboxiesterasa, la tripsina y la quimiotripsina entre otras. Todas ellas presentan en común un residuo de serina que puede ser fosforilado e inactivado permanentemente por este grupo de insecticidas (Jonakovic, 2001; Ferrer, 2003). Del mismo modo, las protaminas espermáticas también pueden ser fosforiladas por los OP (Piña-Guzman et al, 2005; Sanchez- Pena et al, 2004).

Existen reportes acerca de la toxicidad de los OP y de su efecto en procesos biológicos distintos de la neurotransmisión en las uniones neuromusculares. En células mononucleares de sangre periférica en cultivo, el malatión induce una disminución del glutatión intracelular, asociado a muerte por apoptosis (Ahmed et al, 2009) Este efecto se ha observado en otros tipos celulares, incluyendo a células HepG2, YAC-1, timocitos y fibroblastos de ratón (Masoud et al, 2003; Olgun et al, 2004; Tuschl y Scwab, 2005). Aunque el malatión es considerado como ligeramente tóxico, se ha demostrado que puede ser genotóxico, tanto *in vivo* como *in vitro* (Bustos-Obregón y González-Hormazabal, 2003). Tiene propiedades mutagénicas en las células germinales (Giri et al, 2002) y se sospecha que puede inducir cáncer de mama (Cabello et al, 2001). Hay reportes que indican que el diazinón tiene efectos genotóxicos (Tisch et al, 2002), inmunotóxicos (Handy et al, 2002) y sobre la reproducción a nivel celular (Betancourt et al, 2006b) y molecular (Salazar et al, 2007; Bonilla et al, 2008).

En la literatura, diversos reportes demuestran los efectos *in vivo* de los plaguicidas en animales experimentales y humanos expuestos (Murphy et al, 2006; Bustos-Obregón y González-Hormazabal, 2003; Piña-Guzman et al, 2005; Cooper et al, 2000; Sánchez-Peña et al, 2004; Giri et al, 2002; Handy et al, 2002). En general, las concentraciones de plaguicidas

que tienen efecto en este estudio, se encuentran en un intervalo semejante al de aquellas reportadas con efecto *in vivo*.

En conclusión, se determinó la CL_{50} y la IM_{50} de dos herbicidas y dos insecticidas, empleando los ovocitos porcinos como modelo. Todos ellos afectaron negativamente la maduración en concentraciones subletales, induciendo un bloqueo significativo en la transición de VG a MI. Se requiere de más estudios para determinar cuáles son los mecanismos particulares por los que cada plaguicida ejerce el efecto observado y también si dicho efecto ocurre sobre el ovocito directamente o sobre las células foliculares que lo acompañan durante el proceso de maduración. Estos resultados resaltan la importancia de estudiar los efectos de los contaminantes ambientales en el crecimiento y maduración de los ovocitos como una posible causa de alteraciones en la salud reproductiva, ya que la maduración normal del ovocito es un prerequisite crítico para que eventos posteriores, como la fertilización y el desarrollo embrionario temprano, ocurran de modo normal (Brevini et al, 2005).

Referencias

- Abarikwu SO, Adesiyun AC, Oyeloja TO, Oyeyemi MO, Farombi EO. (2009). Changes in sperm characteristics and induction of oxidative stress in the testis and epididymis of experimental rats by a herbicide, atrazine. *Arch Environ Contam Toxicol* 58:874-882.
- Abd el-Aziz MI, Sahlab AM, Abd el-Khalik M. (1994). Influence of diazinon and deltamethrin on reproductive organs and fertility of male rats. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 101, 230–232.
- Abeydeera RL, Wang W, Prather RS, Day BN. (1998). Maturation in vitro of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development in vitro. *Biol Reprod* 58: 1316-1320.
- Aldama L, Conejo J, González H, Altamirano M, Fierro R. (2001). Efecto de metales pesados en la viabilidad y reacción acrosomal de espermatozoides de cerdo. *Acad Invest Biol Rep* 26: 263.
- Alm H, Torner H, Tiemann U, Kanitz W. (1998). Influence of organochlorine pesticides on maturation and postfertilization development of bovine oocytes in vitro. *Reprod Toxicol* 12: 559-563.
- Anas, M.K., Suzuki, C., Yoshioka, K., Iwamura, S. (2003). Effect of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on bovine oocyte maturation in vitro. *Reprod Toxicol* 17, 305–310.
- Ahmed T, Tripathi AK, Suke SG, Kumar V, Ahmed RS, Das S, Banerjee BD. (2009). Role of HSP27 and reduced glutathione in modulating malathion-induced apoptosis of human peripheral blood mononuclear cells: ameliorating effect of N-acetylcysteine and curcumin. *Toxicol In Vitro* 7: 1319-1325.
- Ashby J, Tinwell H, Stevens J, Pastoor T, Breckenridge C. (2002). The effects of atrazine on the sexual maturation of female rats. *Regul Toxicol Pharmacol* 35:468-473.
- Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. (1995). Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med* 332: 281–285.
- Beker-van Wouddenberg AR, van Tol HT, Roelen BA, Colenbrander B, Bevers MM. (2004). Estradiol and its membrane-impermeable conjugate (estradiol-bovine serum albumin) during in vitro maturation of bovine oocytes: effects on nuclear and cytoplasmic maturation, cytoskeleton, and embryo quality. *Biol Reprod* 70: 1465–1474.
- Betancourt M, Bonilla E, Casas E, Ducolomb Y. (2003). Maduración de gametos y fertilización en mamíferos. In: Jiménez LF, Merchant H. *Biología Celular y Molecular*. Pearson Educación. México. 679-711.
- Betancourt M, Bonilla E, Casas E, Ducolomb Y, Fierro R, González H. (2006a). Efectos de insecticidas y herbicidas sobre la maduración de gametos, fertilización y desarrollo embrionario temprano in vitro en mamíferos. In: Pimentel E, Ortiz R, Breña M (eds.) *Tópicos de Genética*. Compañía Editorial de México. México. 257-275.
- Betancourt M, Reséndiz A, Casas E, Fierro R. (2006b). Effect of two insecticides and two herbicides on the porcine sperm motility patterns using computer-assisted semen analysis (CASA) in vitro. *Reprod Toxicol* 22: 508–512.
- Blasiak J, Jaloszynski P, Trzeciak A, Szyfter K. (1999). In vitro studies on the genotoxicity of the organophosphorus insecticide malathion and its two analogues. *Mutat Res* 445: 275-283.

- Bonilla E. (2000). Expresión génica diferencial en oocitos en ensayos de toxicología. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, España.
- Bonilla E, Hernández F, Cortés L, Mendoza M, Mejía J, Carrillo E, Casas E, Betancourt M. (2008). Effects of the insecticides malathion and diazinon on the early oogenesis in mice in vitro. *Environ Toxicol* 23: 240–245.
- Brand RM, Mueller C. (2002). Transdermal penetration of atrazine, alachlor, and trifluralin: effect of formulation. *Toxicol Sci* 68: 18-23.
- Breckenridge CB, Stevens JT. (2008). Crop protection chemicals: mechanisms of action and hazard profiles. In: Hayes WA. *Principles and methods of Toxicology*. CRC Press, Boca Raton FL, USA. 728-820.
- Brevini TAL, Cillo F, Antonini S, Gandolfi F. (2005). Effects of endocrine disrupters on the oocyte and embryo of farm animals. *Reprod Domest Anim* 40: 291–299.
- Brusick D. (1987). *Principles of Genetic Toxicology*, 2nd ed. Plenum Press, New York.
- Buranatrevedh S, Roy D. (2001). Occupational exposure to endocrine-disrupting pesticides and the potential for developing hormonal cancers. *J Environ Health* 64: 17-29.
- Bustos-Obregón E, González-Hormazabal P. (2003). Effect of a single dose of malathion on spermatogenesis in mice. *Asian J Androl* 5: 105–107.
- Butte W, Heinzow B. (2002). Pollutants in house dust as indicators of indoor contamination. *Rev Environ Contam Toxicol* 175: 1-46.
- Cabello G, Valenzuela M, Vilaxa A, Durán V, Rudolph I, Hrepic N, Calaf G. (2001). A rat mammary tumor model induced by the organophosphorous pesticides parathion and malathion, possibly through acetylcholinesterase inhibition. *Environ Health Perspect* 109: 471–479.
- Calderón HE, González R, Durán, C. (2001) Plaguicidas organoclorados en sedimentos y organismos acuáticos del lago de Catemaco, Veracruz, México.. *Rev Int Contam Ambient* 17: 23-30.
- Campagna C, Guillemette C, Paradis R, Sirard M, Ayotte P, Bailey JL. (2002). An environmentally relevant organochlorine mixture impairs sperm function and embryo development in the porcine model. *Biol Reprod* 67: 80-87.
- Campagna, C, Sirard M, Ayotte P, Bailey JL. (2001). Impaired maturation, fertilization, and embryonic development of porcine oocytes following exposure to an environmentally relevant organochlorine mixture. *Biol Reprod* 65: 554-560.
- Campagna C, Ayotte P, Sirard MA, Arsenaault G, Laforest JP, Bailey JL. (2007). Effect of an environmentally relevant metabolized organochlorine mixture on porcine cumulus-oocyte complexes. *Reprod Toxicol* 23: 145–152.
- Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebeak NE. (1992) Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br Med J* 365: 609-613.
- Casas E, Betancourt M, Bonilla E, Ducolomb Y, Zayas H, Trejo R. (1999) Changes in cyclin B localization throughout pig oocyte in vitro maturation. *Zygote* 7: 21-26.
- Casas E, Bonilla E, Ducolomb Y, Betancourt M. (2010). Differential effects of herbicides atrazine and fenoxaprop-ethyl, and insecticides diazinon and malathion, on viability and maturation of porcine oocytes in vitro. *Toxicol in vitro* 24: 224-230.
- Casida JE, Toia RP. (1992). Organophosphorus pesticides: their target diversity and bioactivation. In: Dekant W, Neumann HG (eds.). *Tissue-specific toxicity: Biochemical mechanisms*. Academic Press Ltd, London, UK. 33-70.

- Choudhary N, Goyal R, Joshi SC. (2008). Effect of malathion on reproductive system of male rats. *J Environ Biol* 29:259-262.
- CICOPLAFEST (Comisión Intersecretarial para el Control del proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas) (2002). Catálogo oficial de plaguicidas. Vol. 1. México.
- Contreras HR, Bustos-Obregón E. (1999). Morphological alterations in mouse testis by a single dose of malathion. *J Exp Zool* 284: 355-9.
- Cooper RL, Stoker TE, Tyrey L, Goldman JM, McElroy WK. (2000). Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary-ovarian function. *Toxicol Sci* 53: 297-307.
- Cooper RL, Laws SC, Das PC, Narotsky MG, Goldman JM, Tyrey EL, Stoker TE. (2007). Birth Defects Res (Part B) 80: 98-112.
- Cremlyn RJW. (1991). *Agrochemicals: Preparation and Mode of Action*, second ed. John Wiley and Sons Ltd., West Sussex, UK.
- Cummings AM, Rhodes BE, Cooper RL. (2000). Effect of atrazine on implantation and early pregnancy in 4 strains of rats. *Toxicol Sci* 1: 135-143.
- Das R, Steege A, Baron S, Beckman J, Harrison R. (2001). Pesticide-related illness among migrant farm workers in the United States. *Int J Occup Environ Health* 7: 303-312.
- Ducolomb Y, Casas E, Valdéz A, González G, Altamirano-Lozano M, Betancourt M (2009). In vitro effect of malathion and diazinon on oocytes fertilization and embryo development in porcine. *Cell Biol Toxicol*. 25:623-633.
- Ecobichon DJ. (2001). Pesticide use in developing countries. *Toxicology* 160: 27-33.
- Eppig JJ, Wigglesworth K, Chesnel F. (1993). Secretion of cumulus expansion enabling factor by mouse oocytes: relationship to oocyte growth and competence to resume meiosis. *Dev Biol* 158: 400-409.
- Flores S, Gómez S, Villalobos R, López P, Morgan E. (1999). Efecto citogenético de Ametrina, y Metribuzina (Triazinas) en concentraciones bajas aplicadas directamente y a través del metabolismo de *Vicia faba* sobre cultivo de linfocitos humanos. VI Congreso de la Sociedad Mexicana de Genética:28.
- Ferrer A. (2003). Intoxicación por plaguicidas. *An Sist Sanit Navar* 26: 155-171.
- Freeman JL, Rayburn AL. (2004). In vivo genotoxicity of atrazine to anuran larvae. *Mutat Res* 560: 69-78.
- Friedmann AS. (2002). Atrazine inhibition of testosterone production in rat males following peripubertal exposure. *Reprod Toxicol* 16: 275-279.
- Gardella JR, Hill JA 3rd. (2000). Environmental toxins associated with recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 18: 407-24.
- Giri S, Prasad SB, Giri A, Sharma GD. (2002). Genotoxic effects of malathion: an organophosphorus insecticide, using three mammalian bioassays in vivo. *Mutat Res* 514: 223-31.
- González-Mandujano, A. (1999). Efecto citotóxico del cloranfenicol en espermatozoides de conejo doméstico, estudio in vivo. Tesis de Maestría en Biología experimental, UAM-I.
- Graves J, Richardson ME, Bernard RS, Camper ND, Bridges WC. (2002). Atrazine effects on in vitro maturation and in vitro fertilization in the bovine oocyte. *J Environ Sci Health B* 2: 103-112.
- Graymore M, Stagnitti F, Allinson G. (2001). Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environ Int* 26: 483-95.

- Handy RD, Abd-El Samei HA, Bayomy MF, Mahran AM, Abdeen AM, El-Elaimy EA. (2002). Chronic diazinon exposure: pathologies of spleen, thymus, blood cells, and lymph nodes are modulated by dietary protein or lipid in the mouse. *Toxicology* 172, 13–34.
- Hayes TB, Collins A, Lee M, Mendoza M, Noriega N, Stuart AA, Vonk A. (2002). Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 5476-5480.
- Hoyer PB. (1999). Ovotoxic environmental chemicals: indirect endocrine disruption. In: Naz, R.K. (Ed.), *Endocrine Disruptors. Effects on Male and Female Reproductive Systems*. CRC Press, Boca Raton. 57–124.
- Hoyos-Giraldo LS. (2000). Genotoxicidad de los plaguicidas: Mutagenicidad, carcinogenicidad y teratogenicidad. In : Córdoba D (ed.) *Toxicología* 4a. ed. Ed. Manual Moderno. Colombia. 197-213.
- INEGI (2009). Encuesta industrial mensual. Resumen Anual 2008. INEGI, México.
- Jin O, Kitos P. (1996). Teratogenic synergy between a thiocarbamate herbicide and an organophosphorus insecticide. *FASEB J* 10: A792.
- Jin Y, Zhang X, Shu L, Chen L, Sun L, Qian H, Liu W, Fu Z. (2010). Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 78: 846.852.
- Jonakovic M. (2001). Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology* 166: 139–160.
- Kapp RW, Thomas JA. (2008). Hormone assays and endocrine function. In: Hayes WA. *Principles and methods of Toxicology*. CRC Press, Boca Raton FL, USA. 1714-1755.
- Kimmel GL, Clegg ED, Crisp TM. (1995). Reproductive toxicology testing: a risk assessment perspective. In: Witorsch, R.J. (Ed.), *Reproductive Toxicology*, second ed. Raven Press, New York. 75–98.
- Kovacic P, Jacintho JD. (2001). Reproductive toxins: pervasive theme of oxidative stress and electron transfer. *Curr Med Chem* 8: 863-869.
- Labrada R, Caseley JC, Parker C. (1996). *Weed Management for Developing Countries*. FAO Plant Production and Protection Paper 120. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- LaChapelle AM, Ruygrok ML, Toomer M, Oost JJ, Monnie ML, Swenson JA, Compton AA, Stebbins-Boaz B. (2007). The hormonal herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid, inhibits *Xenopus* oocyte maturation by targeting translational and post-translational mechanisms. *Reprod Toxicol* 23: 20–31.
- Manson JM, Kang YJ. (1994). Test methods for assessing female reproductive and developmental Toxicology. In: Hayes AW (ed.) *Principles and methods of toxicology*. 3d. ed. Raven Press New York. 990-1037.
- Maravilla-Galván R, Fierro R, González-Márquez H, Gómez-Arroyo S, Jiménez I, Betancourt M. (2009). Effect of atrazine and fenoxaprop-ethyl on capacitation and acrosomal reaction in boar sperm. *Int J Toxicol* 28: 24–32.
- Masoud L, Vijayarathay C, Fernandez-Cabezudo M, Petroianu G, Saleh AM. 2003. Effect of malathion on apoptosis of murine L929 fibroblasts: a possible mechanism for toxicity in low dose exposure. *Toxicology*. 185:89-102.
- Moreno MD. (2003). *Toxicología ambiental. Evaluación de riesgo para la salud humana*. Mc Graw Hill, Madrid, España.

- Murphy MB, Hecker M, Coady KK, Tompsett AR, Jones PD, Du Preez LH, Everson GJ, Solomon KR, Carr JA, Smith EE, Kendall RJ, Van Der Kraak G, Giesy JP. (2006). Atrazine concentrations, gonadal gross morphology and histology in ranid frogs collected in Michigan agricultural areas. *Aquat Toxicol* 76: 230–245.
- Nunziata A. (1998). An overview of current in vitro test procedures to reproductive toxicology. En: *Reproductive toxicology, in vitro germ cell developmental toxicology, from science to social and industrial demand*. Del Mazo, J. (Ed.), Plenum Press, New York. 171-183.
- Olea N, Fernández MF, Araque P, Olea-Serrano F. (2002). Perspectivas en disrupción endocrina. *Gac Sanit* 16: 250–256.
- Olgun S, Gogal RM Jr, Adeshina F, Choudhury H, Misra HP. (2004). Pesticide mixtures potentiate the toxicity in murine thymocytes. *Toxicology*. 196:181-195.
- Palacios ME, Paz P, Hernández S, Mendoza L. (1999). Sintomatología persistente en trabajadores industrialmente expuestos a plaguicidas organofosforados. *Salud Publica Méx.* 41: 55-61.
- Peterson DE, Regehr DL, Thompson CR, Al-Khatib K. (2001). *Herbicide Mode of Action*. Kansas State University, Kansas, USA. pp. 9–15.
- Piña-Guzmán, B, Solís-Heredia MJ, Quintanilla-Vega B. (2005). Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines. *Toxicol Appl Pharmacol* 202: 189–198.
- Pluth JM, O’Neill JP, Nicklas JA, Albertini RJ. (1998). Molecular bases of HPRT mutations in malathion-treated human T-lymphocytes. *Mutat Res* 397: 137–148.
- Pocar P, Brevini TAL, Fischer B, Gandolfi F. (2003). The impact of endocrine disruptors on oocyte competence. *Reproduction* 125: 313–325.
- Pocar P, Brevini TAL, Perazzoli F, Cillo F, Modina S, Gandolfi F. (2001). Cellular and molecular mechanisms mediating the effects of polychlorinated biphenyls on oocyte developmental competence in cattle. *Mol Reprod Dev* 60: 535–541.
- Ratcliffe JM, McElhatton PR, Sullivan FM. (1993). *Reproductive Toxicology*. In: Ballantyne B, Marrs T and Turner P (eds.). *General and Applied Toxicology*. Vol. 2. Stockton Press, New York, USA. 989-1020.
- Rhind SM. (2002). Endocrine disrupting compounds and farm animals: their properties, actions and routes of exposure. *Domest Anim Endocrinol* 23: 179-187.
- Rueda L, Botello A, Díaz G. (1997). Presencia de plaguicidas organoclorados en dos sistemas lagunares del Estado de Chiapas, México. *Rev Int Contam Ambient* 13: 55-61.
- Salazar Z, Ducolomb Y, Betancourt M, Bonilla E, Cortés L, Hernández-Hernández F, González-Márquez H. (2007). Gene expression analysis on the early development of pig embryos exposed to malathion. *Int J Toxicol* 26: 1–7.
- Sánchez-Peña LC, Reyes BE, Lopez-Carrillo L, Recio R, Moran-Martinez J, Cebrian ME, Quintanilla-Vega B. (2004). Organophosphorus pesticide exposure alters sperm chromatin structure in Mexican agricultural workers. *Toxicol Appl Pharmacol* 196: 108–113.
- Sass JB, Colangelo A. (2006). European Union bans atrazine, while the United States negotiates continued use. *Int J Occup Environ Health* 12: 260–267.
- Saunders DS, Harper C. (1994). *Pesticides*. In: Hayes AW (ed.) *Principles and methods of toxicology*. 3d. ed. Raven Press New York. 389-415.

- Seliskar M, Rozman D. (2007). Mammalian cytochromes P450 – Importance of tissue specificity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1770: 458-466.
- Sharpe RM. (2000). Lifestyle and environmental contribution to male infertility. *Br Med Bull* 56: 630-42.
- Shepard TH. (1986). Human teratogenicity. *Adv Pediatrics* 33: 225-268.
- Sinclair S. (2000). Male infertility: nutritional and environmental considerations. *Altern Med Rev* 5: 28-38.
- Spetale MR, Morisoli LS, Rodríguez-Garay EA. (1977). The effect of organophosphorus compounds on respiration by rat liver mitochondria. *Farmacol Sci* 2: 116-122.
- Stoker TE, Guidici DL, Laws SC, Cooper RL. (2002). The effects of atrazine metabolites on puberty and thyroid function in the male Wistar rat. *Toxicol Sci* 67: 198-206
- Tavera-Mendoza L, Ruby S, Brousseau P, Fournier M, Cyr D, Marcogliese D. (2002). Response of the amphibian tadpole *Xenopus laevis* to atrazine during sexual differentiation of the ovary. *Environ Toxicol Chem* 21: 1264-1267.
- Tennant AH, Peng B, Kligerman AD. (2001). Genotoxicity studies of three triazine herbicides: in vivo studies using the alkaline single cell gel (SCG) assay. *Mutat Res* 493: 1-10
- Tisch M, Schmezer P, Faulde M, Groh A, Maier H. (2002). Genotoxicity studies on permethrin, DEET and diazinon in primary human nasal mucosal cells. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 259: 150–153.
- Tominack RL. (2000). Herbicide formulations. *J Toxicol Clin Toxicol* 38: 129-35.
- Tuschl H, Schwab CE. (2005). The use of flow cytometric methods in acute and long-term in vitro testing. *Toxicol In Vitro*. 19:845-852.
- US EPA (United States Environmental Protection Agency) (2006). The use of data on cholinesterase for risk-assessment of organophosphorus and carbamate pesticides. EPA, Washington, DC.
- Uzun FG, Kalender S, Durak D, Demir F, Kalender Y. (2009). Malathion-induced testicular toxicity in male rats and the protective effect of vitamins C and E. *Food Chem Toxicol* 47:1903-1908
- Valdez Salas B, Garcia Duran EI, Wiener MS. (2000). Impact of pesticides use on human health in Mexico: a review. *Rev Environ Health* 15: 399-412.
- Veeramachaneni DN. (2000). Deteriorating trends in male reproduction: idiopathic or environmental? *Anim Reprod Sci* 60-61: 121-30.
- Waller RF, Ralph SA, Reed MB, Su V, Douglas JD, Minnikin DE, Cowman AF, Besra GS, Mc Fadden GI. (2003). A type II pathway for fatty acid biosynthesis presents drug targets in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents and Chemother* 47: 297–301.
- Wang W ,Niwa K. (1995) Synergetic effects of epidermal growth factor and gonadotropins on the cytoplasmic maturation of pig oocytes in a serum-free medium. *Zygote*. 3: 345-350.
- Ware GW. (1991). Fundamentals of pesticides. A self-instruction guide. Thomsom Publications. Fresno, CA. USA.
- Yáñez L, Ortiz-Pérez D, Batres LE, Borja-Aburto VH, Díaz-Barriga F. (2002). Levels of dichlorodiphenyltrichloroethane and deltamethrin in humans and environmental samples in malarious areas of Mexico. *Environ Res* 88: 174-181.
- Yu SJ. (2008). The toxicology and biochemistry of insecticides. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

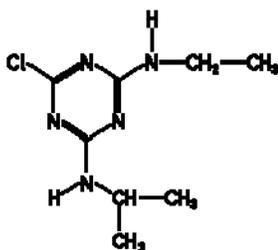
- Zenick H, Clegg ED, Perreault SD, Klinefelter GR, Gray LE. (1994). Assessment of male Reproductive Toxicology. A risk assessment approach. In: Hayes AW (ed.) Principles and methods of toxicology. 3d. ed. Raven Press New York. 937-988.
- Zinaman MJ, Clegg ED, Brown CC, O'Connor J, Selevan SG. (1996). Estimates of human fertility and pregnancy loss. *Fertil Steril* 65: 503-509.

Anexo

Estructura y mecanismo de acción de los plaguicidas atrazina, fenoxaprop-etil, diazinón

y malati6n.

Atrazina



Nombre IUPAC: 6-cloro-*N*²-etil-*N*⁴-isopropil-1,3,5-triazin-2,4-diamina

F6rmula: C₈H₁₄ClN₅

Peso molecular: 215.68

DL₅₀ oral (mg/kg): 1780 (rata)

Catgoría toxicol6gica: IV

IDA: 0.035 mg/kg

Exposici6n aguda: Irritante d6rmico, ocular y de mucosas.

Exposici6n cr6nica: Alteraciones del h6gado y coraz6n.

Poco persistente.

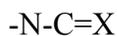
Uso: Agr6cola e industrial.

Las triazinas S-sustituidas fueron descubiertas en 1952 por la compa1a Geigy. Los representantes m6s conocidos de este grupo de herbicidas son la simazina y la atrazina.

Son herbicidas persistentes en el suelo y se utilizan para controlar de manera selectiva a malezas en cultivos de ma6z, ca1a de az6car, pi1a, sorgo y 6rboles frutales. En el caso particular del ma6z y la ca1a, 6stos poseen una enzima que hidroliza a las triazinas y origina productos que no son herbicidas. Son absorbidos por las ra6ces de las malezas emergentes, ocasionando un amarillamiento de las hojas; como no penetran profundamente en el suelo, tienen poco efecto en plantas con ra6ces profundas como 6rboles y arbustos.

Entre las 25 triazinas comerciales, la atrazina es con mucho la m6s importante y alcanza una producci6n anual de 45 000 toneladas por a1o, en EU solamente, lo que la hace el herbicida fabricado en mayor escala en el mundo.

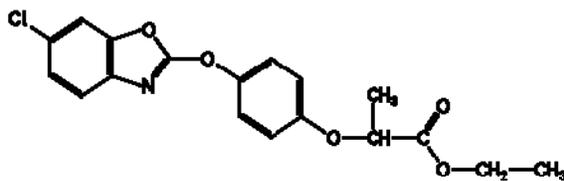
Las triazinas destruyen a las malezas al interferir con la fotos6ntesis, y el sitio primario de acci6n es la reacci6n de Hill del transporte fotosint6tico. Todos los herbicidas que inhiben esta reacci6n (derivados de urea y triazinas, entre otros) tiene como estructura com6n la siguiente:



donde X es un átomo que posee un par de electrones no apareados (N u O). Este arreglo se une a la enzima D1 del fotosistema II y bloquea la acción de la plastoquinona, evitando la fotólisis del agua. Al interrumpir el flujo electrónico, la luz que continúa excitando a la clorofila la lleva a un nivel energético superior lo que induce un daño a los lípidos de membrana o crea especies reactivas de oxígeno que pueden interactuar con los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos de la célula. Además de la formación de las especies reactivas de oxígeno, estos inhibidores bloquean la producción de alimento para la planta al limitar la disponibilidad de ATP y NADPH requeridos en la fase oscura de la fotosíntesis, donde se fija el CO₂ y se producen los carbohidratos. Esta reducción en la producción de azúcares conduce a una lenta inanición de la planta, y los signos de daño incluyen clorosis, seguida de una necrosis de los tejidos de las hojas. El herbicida es incorporado por las raíces o el follaje de las plantas, y es conducido a las hojas, donde el daño se pone de manifiesto primero en las hojas más viejas o a lo largo de los bordes de las mismas (Breckenridge y Stevens, 2008).

Aunque no existe un sitio de inhibición similar al de la reacción de Hill en los mamíferos, se ha detectado un modo de acción común para las triazinas que afecta al eje hipotálamo-hipófisis-gónada, modificando la secreción de LH y prolactina. También se ha sugerido que puede tener un efecto agonista de estrógenos o aumentar la producción de éstos (Cooper et al, 2007). Por exposición aguda las triazinas solo causan irritación dérmica, ocular y de mucosas pero pueden inducir la aparición temprana de tumores mamarios por exposición crónica (Pocar et al, 2003).

Fenoxaprop-etil



Nombre IUPAC: etil (RS)-2-[4-(6-clorobenzoxazolil-2-oxi) fenoxi]propionato
Fórmula: C₁₈H₁₆ClNO₅
Peso molecular: 361.78

DL₅₀ oral (mg/kg): 2357 (rata)
Categoría toxicológica: IV
IDA: 0.8 mg/kg
Exposición aguda: Irritante ocular y dérmico.
Exposición crónica: No se ha determinado en animales.
Medianamente persistente.

Este plaguicida pertenece al grupo de los arilfenoxipropionatos que fueron introducidos por la compañía Hoechst en 1975, para el control pre-emergente de malezas anuales en cereales y plantas de hoja ancha. Estos compuestos pueden actuar a manera de antiauxinas al competir por el sitio de unión con el ácido indolacético (Cremlyn, 1991).

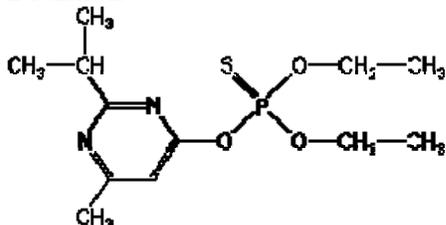
Sin embargo, actualmente se sabe que su actividad herbicida resulta del bloqueo de la biosíntesis de ácidos grasos, por la inhibición selectiva de la acetil coenzima A carboxilasa (ACC) en las plantas. Estos ácidos grasos son indispensables para la producción de lípidos que constituyen membranas celulares y para la formación de ceras en las cutículas de las plantas en crecimiento. El herbicida se incorpora por el follaje y se mueve por el floema a los sitios de los nuevos brotes.

La ACC existe en dos formas alternativas en las plantas: 1) la forma procarionte, que se encuentra en las dicotiledóneas de hoja ancha y que es de 400 a 6000 veces más tolerante a estos herbicidas, y 2) la forma eucarionte, que se encuentra en los pastos anuales y perennes, que es mucho más susceptible. Aunque la ACC de los mamíferos es parecida a esta segunda isoforma, no existen datos específicos que indiquen que este grupo de herbicidas pueda alterar la síntesis de ácidos grasos en los animales (Breckenridge y Stevens, 2008).

No se ha demostrado cuales son los niveles de estos herbicidas que puedan inducir toxicidad aguda, ni existen reportes que indiquen que deban ser considerados como agentes mutagénicos o que causen daños reproductivos o del desarrollo.

Diazinón y Malatión

Diazinón



Nombre IUPAC: O,O-dietil O-2-isopropil-6-metilpirimidin-4-il fosforotioato
Fórmula: C₁₂H₂₁N₂O₃PS
Peso molecular: 304.34

DL₅₀ oral (mg/kg): 1250 (rata)

Catgoría toxicológica: III

IDA: 0.002 mg/kg

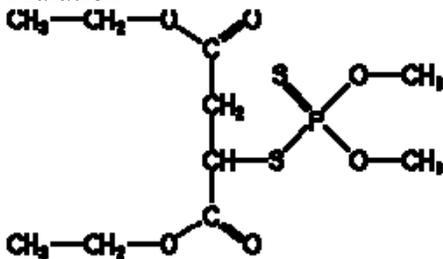
Exposición aguda: Efectos colinérgicos, irritante ocular, dérmico y de mucosas.

Exposición crónica: Neurotóxico.

Poco persistente.

Uso: Agrícola, pecuario, doméstico, jardinería, urbano e industrial.

Malatión



Nombre IUPAC: dietil (dimetoxifosfinotioilto) succinato
Fórmula: C₁₀H₁₉O₆PS₂
Peso molecular: 330.4
DL₅₀ oral (mg/kg): 5500 (rata)

Catgoría toxicológica: IV

IDA: 0.02 mg/kg

Exposición aguda: Efectos colinérgicos, irritante ocular, dérmico, del tracto respiratorio y de mucosas.

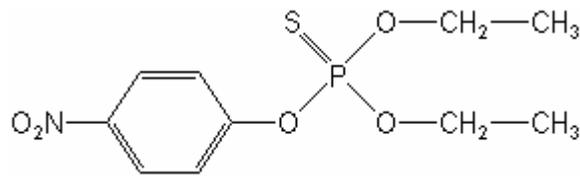
Exposición crónica: Inhibición de colinesterasas plasmática y cerebral. Daño hepático.

Ligeramente persistente.

Uso: Agrícola, pecuario, jardinería, urbano e industrial.

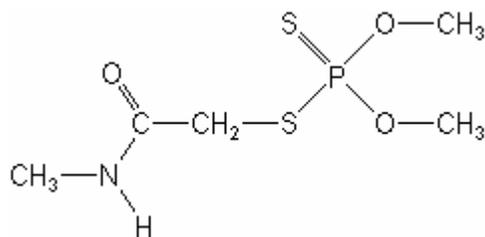
Ambos pertenecen al grupo de los insecticidas organofosforados (OP) que son derivados del ácido fosfórico, y los hidrógenos pueden ser sustituidos por radicales orgánicos como metilo, etilo o fenilo. También, uno o más de sus oxígenos pueden ser reemplazados por azufre, carbono o nitrógeno.

De este modo, los OP se agrupan en seis clases diferentes de acuerdo a los radicales sustituyentes que poseen (figura 11).



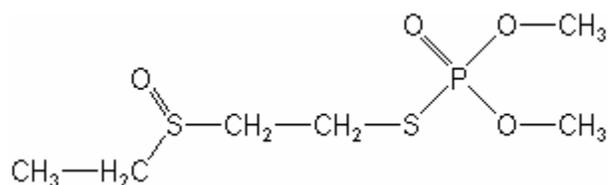
Paratión.

3. Fosforoditioatos. Contienen dos átomos de azufre unidos al residuo de ácido fosfórico de la molécula. a este grupo pertenece el malatión. Ejemplo: Dimetoato. Insecticida sistémico que es capaz de controlar a una amplia variedad de insectos.



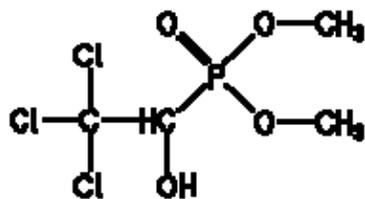
Dimetioato.

4. Fosforotiolatos. Contienen un azufre unido al átomo de fósforo por medio de un enlace sencillo. Algunos autores los agrupan dentro de los fosforotioatos, porque no hacen distinción entre un tiono azufre (=S) y un tiolo azufre (-S-). Ejemplo: Metil-oxodemeton. Insecticida sistémico y de contacto empleado para proteger hortalizas y plantas ornamentales.



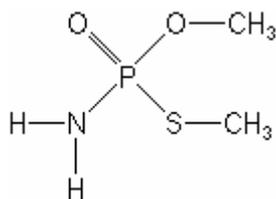
Metil-oxodemeton.

5. Fosfonatos. En estos OP, el fósforo se une directamente al carbono de un sustituyente orgánico. Ejemplo: Triclorfon. Es un insecticida de contacto y digestivo, eficaz contra una amplia variedad de insectos y empleado en cultivos de arroz y tabaco.



Triclorfon.

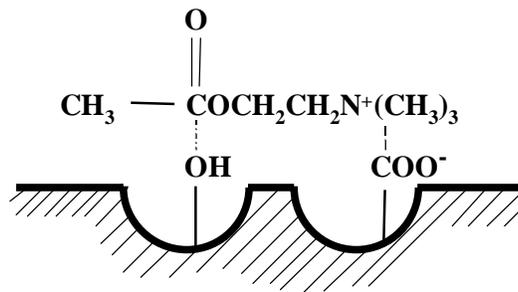
6. Fosforamidatos. En esta subclase de insecticidas, el átomo de fósforo se une a un átomo de nitrógeno. Ejemplo: Metamidofos. Insecticida y acaricida de amplio espectro, empleado en cultivos de algodón, papa y frutales.



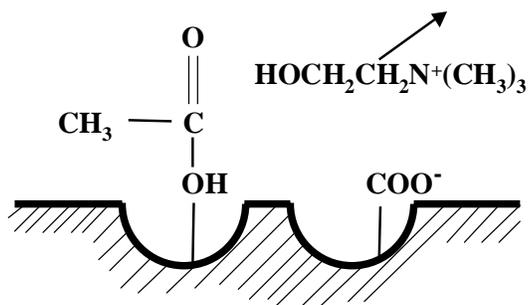
Metamidofos.

Mecanismo de acción de los organofosforados

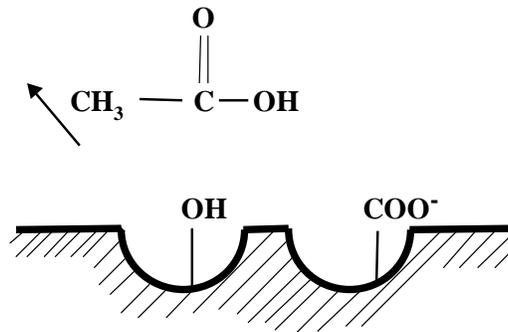
Todos estos insecticidas interfieren con los impulsos nerviosos al inhibir a la enzima acetilcolinesterasa (AChE) presente en las sinapsis neuronales colinérgicas de los insectos y en las uniones neuromusculares de los mamíferos. La AChE presenta dos sitios activos: el sitio esterásico, con un grupo OH de una serina y un grupo imidazol de una histidina, y el sitio aniónico, que presenta un grupo carboxilo libre de un ácido aspártico o de un ácido glutámico. La unión de la acetilcolina (ACh) con la AChE ocurre en tres pasos:



Paso 1. Unión de la ACh con la AChE. Se produce una interacción de la acetilcolina con el sitio activo de la enzima, por una diferencia de cargas eléctricas.



Paso 2. Acetilación de AChE. el grupo acetilo de la ACh se une covalentemente a la enzima, y se libera la colina.



Paso 3. Desacetilación de AChE. Al cabo del tiempo, ocurre una hidrólisis que libera el grupo acetilo, y deja a la enzima lista para reiniciar el proceso de degradación de una nueva molécula de ACh.

La acumulación de ACh produce una neuroexcitación excesiva, y en mamíferos, los signos de intoxicación incluyen hiperexcitabilidad, temblores, convulsiones, insomnio, inquietud y parálisis. Además se pueden presentar contracciones musculares involuntarias, debilidad extrema, salivación, diarrea y en casos severos parálisis, convulsiones y la muerte.

Algunos OP son agentes bioactivos por sí mismos, pero muchos otros requieren ser activados, principalmente por el citocromo P450 (CYP2B6 en mamíferos), que los oxida al oxón correspondiente. Esta biotransformación ocurre por igual en plantas, insectos y mamíferos.

Debido a sus estructura química, la reacción que ocurre entre los OP, o sus metabolitos y la AChE es muy similar a la reacción fisiológica normal y produce una enzima fosforilada (fosfoenzima). Se puede producir una reactivación espontánea por defosforilación, que en general es lenta y puede tomar días o semanas, por lo que se considera que la inactivación de la enzima es una inhibición irreversible (figura 12) (Yu, 2008).

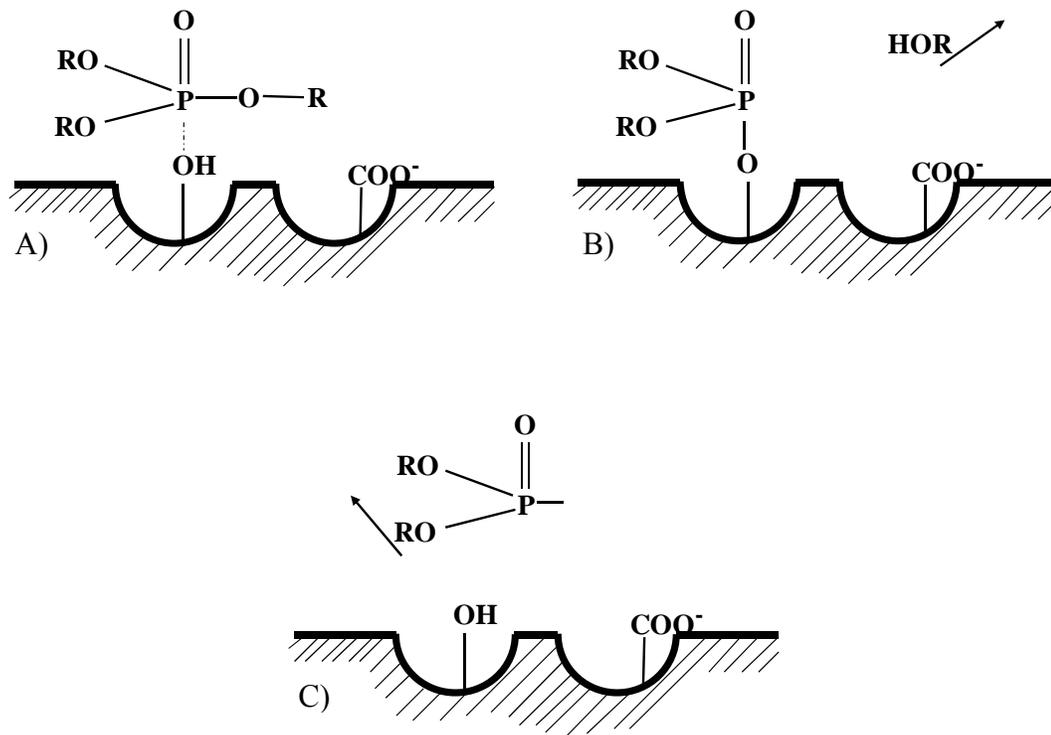


Figura 12. Interacción de los OP con la AChE. El grupo fosfato del OP interactúa con el sitio esterásico de la enzima (A), uniéndose covalentemente a éste (B) con la pérdida de un sustituyente para formar la fosfoenzima. Al cabo del tiempo se puede producir una reactivación espontánea, por la liberación del residuo de OP (C).

En ocasiones, en vez de esta reactivación espontánea, se puede perder un segundo sustituyente de la fosfoenzima (el primero se pierde por la entrada del fosfato), originando una porción cargada en el sitio activo de la enzima. Por este proceso, conocido como "envejecimiento", la enzima queda inhibida permanentemente y es resistente a cualquier proceso de reactivación espontánea (figura 13).

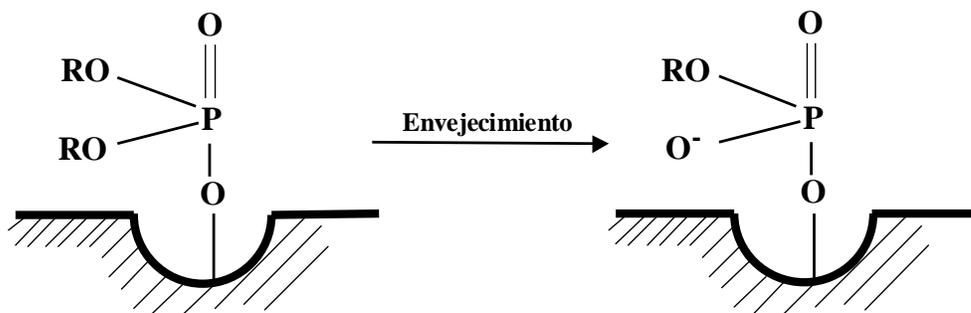


Figura 13. Envejecimiento de la AChE. El OP pierde un segundo sustituyente, confiriendo una carga negativa al sitio activo de la enzima, lo que impide su reactivación.