



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**EFFECTO DE LOS INSECTICIDAS DIAZINÓN Y
MALATIÓN DURANTE LA FERTILIZACIÓN *IN VITRO*
EN OVOCITOS DE CERDO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A

ALEJANDRA VALDEZ CORDOVA

DIRECTORA:

DRA. YVONNE CLAUDINE DUCOLOMB RAMÍREZ

ASESORES:

DR. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE

DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO

México, D.F.

MAYO 2007

COMITÉ TUTORIAL

Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez

**Profesor Titular “C”, Universidad Autónoma Metropolitana,
Unidad Iztapalapa.**

Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I

duco@xanum.uam.mx

Dr. José Miguel Betancourt Rule

**Profesor Titular “C”, Universidad Autónoma Metropolitana,
Unidad Iztapalapa**

Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel II

bet@xanum.uam.mx

Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano

**Profesor Titular “C”, Facultad de estudios Superiores-Zaragoza,
UNAM**

Unidad de investigación en Genética y Toxicología Ambiental

Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I

maal@servidor.unam.mx

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa se encuentra dentro del Padrón de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, con número de registro 309-0, y en el Padrón de Programas del PIFOP-CONACYT clave C/PFPN-2002-35-32

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología la Beca otorgada con el número176375.

Este trabajo recibió apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Convenio 5-37923-B.

Agradezco la donación de los ovarios al rastro Los Arcos. Los Reyes la Paz, Edo. Méx.

**Este trabajo se realizó en el laboratorio de Biología
Celular, del Departamento de Ciencias de la Salud,
División de Ciencias Biológicas y de la Salud Universidad
Autónoma Metropolitana-Iztapalapa**

**El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la
Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa
aprobó la presente tesis que presentó:**

Alejandra Valdez Cordova

El día 14 de mayo del 2007

Sinodales:

**Dr. José Miguel Betancourt Rule _____
P R E S I D E N T E**

**Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano _____
S E C R E T A R I O**

**M. en C. Eduardo Casas Hernández _____
V O C A L**

A G R A D E C I M I E N T O S

Agradezco a la Dra. Yvonne Ducolomb por el apoyo y dirección de este trabajo de tesis.

Mi gran admiración y respeto para el Dr. Miguel Betancourt, gracias por la revisión de esta tesis, sus valiosos y sabios consejos.

Agradezco al Dr. Mario Altamirano por la revisión de este trabajo, los valiosos consejos y por aceptar ser miembro de mi comité

Quiero agradecer al M. en C. Eduardo Casas por su apoyo incondicional y constante que amablemente me brindo. Muchas gracias por aceptar ser miembro del jurado y sobre todo brindarme su amistad.

Agradezco al Dr. Pablo Damián Matsumura por su apoyo y los consejos valiosos, mil gracias.

DEDICATORIA

Con amor y cariño a mis padres María de la Luz y Roberto.

**A mis queridas hermanas Luz, Mónica y Gabriela y a mi cuñado
Raúl.**

**Con especial cariño a mis sobrinos Luan, Alan y Mariana. Me
alegra la vida sus sonrisas y travesuras.**

**A mis queridos y grandes amigos Alicia, Fausto y Juan Manuel.
Gracias por su amistad incondicional.**

**A mis compañeros de laboratorio de Biología Celular que quiero,
Guadalupe, Haydeé y Ramiro.**

**Con gran admiración y respeto a los profesores del Laboratorio y
la Maestría en Biología Experimental, Irma Jiménez, Reyna Fierro,
Cristina González, Humberto González, Edmundo Bonilla y Pablo
Matsumura.**

**Limitar los conocimientos científicos a un reducido número de personas debilita el espíritu
filosófico de un pueblo y conduce a su debilidad espiritual.**

ALBERTO EINSTEIN

**Señor, dame serenidad para aceptar las cosas que no puedo cambiar,
valor para cambiar aquellas que si puedo,
y sabiduría para conocer la diferencia.**

RIENHOLD NIEBUHR (1934)

ÍNDICE

Índice de figuras.....	x
Índice de cuadros.....	xi
Abreviaturas.....	xii
Resumen.....	xiii
Abstract	xv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Plaguicidas.....	2
1.2 Insecticidas organofosforados.....	3
1.2.1 Diazinón.....	4
1.2.2 Malatión.....	5
1.3 Fertilización.....	7
1.3.1 Interacción de los espermatozoides con la zona pelúcida	9
1.3.2 Fusión del espermatozoide con el ovocito.....	9
1.3.3 Reacción cortical y bloqueo a la polispermia.....	10
1.3.4 Descondensación del núcleo del espermatozoide.....	11
2. ANTECEDENTES.....	13
2.1 Efecto de los organofosforados en la reproducción.....	14
3. JUSTIFICACIÓN.....	17
4. OBJETIVOS.....	18
4.1 Objetivo general.....	18
4.2 Objetivos particulares.....	18
5. HIPÓTESIS.....	18

6. MATERIAL Y MÉTODO EXPERIMENTAL.....	19
6.1 Obtención de ovocitos y maduración <i>in vitro</i> (MIV).....	19
6.2 Obtención, lavado del semen y conteo espermático.....	20
6.3 Fertilización <i>in vitro</i> (FIV) con organofosforados.....	21
6.4 Evaluación del efecto del malatión y diazinón durante la FIV.....	22
6.4.1 Evaluación de viabilidad de los ovocitos.....	22
6.4.2 Evaluación de la FIV.....	22
6.5 Criterios de evaluación de la FIV.....	23
6.6 Análisis estadístico.....	23
7. RESULTADOS.....	24
7.1 Efecto del diazinón sobre la viabilidad	24
7.2 Efecto del diazinón sobre la FIV	25
7.3 Efecto del diazinón sobre la polispermia	26
7.4 Efecto del malatión sobre viabilidad	29
7.5 Efecto del malatión sobre la FIV	32
7.6 Efecto del malatión sobre la polispermia	33
8. DISCUSIÓN.....	37
8.1 Efecto del diazinón sobre la viabilidad, la fertilización <i>in vitro</i> y polispermia.....	38
8.2 Efecto del malatión sobre la viabilidad, la fertilización <i>in vitro</i> y polispermia	41
9. CONCLUSIÓN.....	45
10. PERSPECTIVAS.....	45
11. BIBLIOGRAFÍA.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Efecto de las concentraciones (μM) de diazinón en el medio de fertilización durante la coincubación de los gametos	28
FIGURA 2. Efecto del diazinón en el medio de fertilización durante la coincubación de los gametos.	29
FIGURA 3. Efecto del malatión en la viabilidad de ovocitos inseminados.	32
FIGURA 4. Efecto de las concentraciones (μM) de malatión en el medio de fertilización durante la coincubación de los gametos.	36
FIGURA 5. Efecto del malatión en la fertilización de ovocitos inseminados.	36

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. Efecto de diversas concentraciones de diazinón en el medio de cultivo sobre la viabilidad de ovocitos inseminados con espermatozoides <i>in vitro</i> .	25
CUADRO 2. Efecto de diversas concentraciones de diazinón en el medio de cultivo durante la coincubación de espermatozoides y ovocitos en la fertilización <i>in vitro</i> .	27
CUADRO 3. Efecto del diazinón agregado al medio de fertilización durante la coincubación de los gametos.	28
CUADRO 4. Efecto de diversas concentraciones de malatión en el medio de cultivo sobre la viabilidad de ovocitos inseminados con espermatozoides <i>in vitro</i>	31
CUADRO 5. Efecto de diversas concentraciones de malatión en el medio de cultivo durante la coincubación de espermatozoides y ovocitos en la fertilización <i>in vitro</i> .	34
CUADRO 6. Efecto de diversas concentraciones de malatión en el medio de fertilización durante la coincubación de los gametos.	35

ABREVIATURAS

APT	Agentes potencialmente tóxicos
BSA	Albúmina sérica bovina
CC	Células del cúmulo
COC	Complejos ovocito-células del cúmulo
CICLOPLAFEST	Comisión Intersecretarial para el control del Proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas
DPBS	Solución salina de fosfatos de Dulbecco
EPA	Environmental Protection Agency
EXTOXNET	Extension Toxicology Network
FIV	Fertilización <i>in vitro</i>
GC	Gránulos corticales
INEGI	Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática
MIV	Maduración <i>in vitro</i>
MTT	Trazolio
NCSU-23	North Carolina State University-23
OC	Organoclorados
OF	Organofosforados
PCB	Bifenil policlorado
PNf	Pronúcleo femenino
PNm	Pronúcleo masculino
PVA	Polivinil alcohol
TBM	Medio amortiguado con Tris
ZP	Zona pelúcida

RESUMEN

Entre los agentes químicos comúnmente usados de manera indiscriminada se encuentran los insecticidas que se utilizan para combatir plagas que atacan y destruyen los cultivos. Estos compuestos pueden contaminar directamente por periodos prolongados a las personas, poniendo en riesgo su salud. Entre los principales insecticidas usados en nuestro país que son altamente tóxicos, se encuentran los organofosforados (OF) como el diazinón y malatión. La mayoría de los estudios sobre los efectos tóxicos que estos plaguicidas pueden producir sobre la fertilización se han realizado *in vivo* en roedores y existen pocos trabajos *in vitro*. La importancia de realizar estudios de toxicología reproductiva *in vitro*, radica en la necesidad de conocer los mecanismos por los cuales los insecticidas OF afectan el proceso de la fertilización. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del diazinón y malatión en la fertilización *in vitro* (FIV) en cerdo. Los ovarios se obtuvieron de cerdas recién sacrificadas y los folículos se puncionaron para la obtención de los complejos ovocitos células del cúmulus. La maduración se realizó en medio TCM-199 suplementado, durante 44 h a 39°C con 5% de CO₂ y humedad a saturación. Para la FIV, los ovocitos se transfirieron a TBM modificado con concentración de 0, 50, 100 y 500 µM de diazinón y 0, 50, 100, 500, 750 y 1000 µM de malatión. Los ovocitos se coincubaron en las condiciones descritas anteriormente con los espermatozoides a una concentración final de 5 x 10⁵ espermatozoides/ml durante 7 h y se transfirieron a medio de desarrollo embrionario NCSU-23 por 12 h. Para evaluar el efecto de los insecticidas sobre la viabilidad, los ovocitos fertilizados se incubaron con tetrazolio (MTT) durante 2 h, considerando como vivos a los ovocitos que presentaron coloración morada y muertos a los no teñidos. Para evaluar la FIV, los ovocitos se fijaron, se tiñeron con orceína acética y se evaluaron al microscopio de contraste de fases. En este estudio se observó que el diazinón, no produjo daño en la viabilidad de los ovocitos en ninguna de las concentraciones. En la FIV, los porcentajes de fertilización disminuyeron conforme aumentó la concentración del diazinón, pero solo hubo diferencia significativa en las concentraciones de 100 y 500 µM ($p <$

0.05). Los resultados indican que el diazinón solo tuvo efecto sobre la FIV. El malatión no mostró daño sobre la viabilidad de los ovocitos inseminados, pero afectó la penetración espermática a medida que aumentó la concentración del insecticida, con diferencia significativa en las concentraciones de 500, 750 μM y 1000 μM ($p < 0.05$), por lo que afectó a la fertilización de los ovocitos. Durante la fertilización se pueden alterar distintos mecanismos como la reacción acrosomal, la unión de los espermatozoides a la zona pelúcida, la fusión del espermatozoide con el ovocito o la descondensación del núcleo espermático. Es importante realizar estudios complementarios en los que se analicen los mecanismos por los que se inhibe el proceso de la fertilización con estos insecticidas. Actualmente se están realizando estudios sobre el efecto de estos insecticidas en espermatozoides, desarrollo embrionario temprano y expresión génica de ovocitos porcinos.

Palabras clave: fertilización *in vitro*, ovocito, porcino, malatión, diazinón

ABSTRACT

Among the chemical agents commonly used without control are the insecticides that are used to fight plagues that attack and destroy crops. These compounds can directly contaminate people during prolonged periods, risking their health. Among the main insecticides used in our country, which are highly toxic, are the organophosphates (OP), such as diazinon and malathion. Most of the studies about the toxic effect that these pesticides can produce on fertilization have been made *in vivo*, in rodents, and there are few *in vitro* studies. The importance of performing studies of reproductive toxicology *in vitro*, is the need to know the mechanisms by which OP insecticides affect the fertilization process. The aim of this work was to evaluate the effect of diazinon and malathion on *in vitro* fertilization (IVF) in pigs. Ovaries were collected from slaughtered prepubertal gilts and follicles were punctured to obtain oocyte-cumulus cells complexes. Maturation was performed in supplemented TCM-199 during 44 h to 39 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. For IVF, oocytes were transferred to modified TBM with concentrations of 0, 50, 100 and 500 µM of diazinon and 0, 50, 100, 750 and 1000 µM of malathion. Oocytes were coincubated with sperm, under the previously described conditions, at a final concentration of 5 x10⁵ sperm / ml for 7 h and then they were transferred to embryo culture medium NCSU-23 for 12 h. To evaluate the effect of insecticides on viability, the fertilized oocytes were incubated with tetrazolium (MTT) for 12 h, considering alive those oocytes with purple coloration and dead the colorless ones. To assess IVF, oocytes were fixed and dyed with acetoceine and evaluated under phase-contrast microscopy. In the present study it was observed that diazinon did not affect oocyte viability in neither one of the concentrations. In IVF, the fertilization rate decreased as diazinon concentration increased, but differences were only significant at the 100 and 500 µM concentrations (p < 0.05). These results indicate that diazinon only had effect on IVF. Malathion did not affect the inseminated oocytes viability, but affected sperm penetration as insecticide concentration increased, with significant differences at 500, 750 and 1000 µM concentrations (p < 0.05), affecting oocyte fertilization. During fertilization, different mechanisms can be altered, such as

acrosome reaction, sperm-zona pellucida binding, sperm-oocyte fusion, or sperm nucleus decondensation. It is important to perform complementary studies to analyze the mechanisms by which these insecticides inhibit the fertilization process. At the moment, studies are being carried out, on the effect of these insecticides on spermatozoa, early embryonic development and gene expression in porcine oocytes.

Key words: *In vitro* fertilization, oocyte, porcine, malathion, diazinon

1. INTRODUCCIÓN

La Toxicología Reproductiva se define como la rama de la Toxicología que estudia los efectos deletéreos en la reproducción producidos por agentes ajenos al organismo llamados xenobióticos. Esta definición incluye varios tipos de toxicidad que con frecuencia se manejan de forma separada, como ejemplo podemos citar la teratogenicidad que es la capacidad de causar malformaciones en el feto y la toxicología del desarrollo, que estudia las alteraciones producidas en la descendencia como resultado de la exposición de hembras gestantes o lactantes a xenobióticos (Nunziata, 1998).

Dentro de los xenobióticos se incluyen agentes químicos naturales o sintéticos, biológicos (virus) y físicos (radiaciones). Estos pueden afectar cualquiera de las etapas del ciclo reproductivo e interferir con la fertilidad o el desarrollo pre o postnatal de los individuos. Durante las últimas décadas se ha suscitado una preocupación sobre la salud reproductiva humana. La incidencia de tumores gonadales ha aumentado considerablemente, especialmente en países desarrollados con población caucásica y se estima que una de cada cinco parejas es estéril. Entre el 32 y 34% de los ovocitos fertilizados e implantados no llegan a término (Zinaman *et al*, 1996), y aproximadamente entre 3 y 7% de los niños recién nacidos presentan malformaciones o alguna variación morfológica o bioquímica, aunque desafortunadamente la falta de sistemas para recabar toda la información sobre los nacimientos permite sospechar que la frecuencia real de estos eventos puede llegar al 10% (Shepard, 1996; Cavieres, 2004).

El hecho de que estos cambios en la salud reproductiva humana hayan ocurrido en un periodo relativamente corto, sugiere que pudieran ser causados por la exposición a agentes potencialmente tóxicos (APT) que hoy en día se encuentran en el ambiente, ya que estamos expuestos a casi 100 000 productos químicos de uso comercial y se estima que se generan entre 700 y 1000 nuevos compuestos cada año (Nunziata, 1998). Dada la enorme cantidad de APT a los que nos encontramos expuestos, desde hace algunos años se ha dado especial énfasis al

desarrollo de estudios que permitan evaluar la toxicidad de estos agentes en la reproducción [Environmental Protection Agency (EPA), 1996].

La identificación de agentes con efectos deletéreos sobre la reproducción (reprotóxicos) se basa tanto en estudios en humanos como en animales de laboratorio. En el primer caso, la información es obtenida de personas laboralmente expuestas de manera rutinaria o accidental a los APT. En el caso de los animales de laboratorio, la información es obtenida a partir de exposiciones experimentales controladas (EPA, 1996).

1.1 PLAGUICIDAS

Entre los agentes tóxicos más comúnmente usados de manera indiscriminada se encuentran los plaguicidas (herbicidas e insecticidas) que hasta ahora no pueden ser evitados en la práctica agrícola sin causar escasez de alimentos (Dési *et al*, 1998). Los plaguicidas son sustancias o mezcla de éstas que se utilizan para combatir plagas que atacan y destruyen los cultivos. Estos productos se usan también en casas habitación, comercios y bodegas, por lo que pueden contaminar directamente y por periodos prolongados a las personas. (Seth *et al*, 2000).

Los diversos usos y volúmenes de producción tan altos de los plaguicidas representan un riesgo para la salud humana, por lo que en la literatura científica hay un alto número de trabajos relacionados con estos agentes tóxicos (López *et al*. 2001), y estudios en trabajadores profesionalmente expuestos (Keim y Alavanja, 2001).

En México en 1995 se utilizaron 54 600 toneladas de plaguicidas (Palacios-Nava *et al*, 1999), mientras que durante 1999 se comercializaron 23 361 toneladas de insecticidas para uso agrícola [Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática (INEGI), 2000]. Este volumen corresponde a 112 diferentes insecticidas y 78 herbicidas registrados [Comisión Intersecretarial para el control del Proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas (CICLOPLAFEST), México, 2001] todos ellos con un potencial altamente tóxico para el humano y los animales. Entre los plaguicidas que son usados y que son

altamente tóxicos se encuentran, los organofosforados (OF) como el diazinón y el malatión, los organoclorados (OC) como el clordano, las triazinas como la atrazina, metribuzina (Sencor) y ametrina (Gesapax), así como los carbamatos asulam y eptam (EPA, 2000).

1.2 INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS

Los insecticidas OF son utilizados en zonas agrícolas, en las industrias, y como agente ectoparasitocida en prácticas veterinarias (Prakash y Venkatesh, 1996) son usualmente ésteres, amidas o tioles derivados del ácido fosfórico (EPA, 2000). Estos plaguicidas son tóxicos, volátiles y liposolubles, contienen fósforo y carbono. Su liposolubilidad permite la penetración rápida por la vía digestiva, cutánea y respiratoria, se distribuyen a los tejidos ricos en lípidos, pero no se acumulan en la grasa de los organismos debido a los procesos de biotransformación (Ferrer, 2003).

Muchos OF se convierten con facilidad de tioles (P=S) a oxones (P=O). La conversión ocurre en el ambiente bajo la influencia del oxígeno y la luz solar, y en el cuerpo, principalmente por la acción de los microsomas hepáticos. Los oxones son muchos más tóxicos que los tioles, pero se inactivan con más facilidad que éstos. Los tioles como los oxones se hidrolizan en la unión éster para producir fosfatos de alquilo, los cuales son de baja toxicidad (Hye-Sung *et al*, 2002).

Los OF pueden producir, por inhalación, intoxicaciones agudas en dosis muy bajas [5.2 mg/l en ratas y 24 mg/l en humanos; (EPA, 2000)], causando neurotoxicidad por inhibición de la acetilcolinesterasa, aumentando la acumulación de acetilcolina en las terminaciones nerviosas induciendo la neuropatía (debilidad o parálisis muscular), que aparece 2 o 3 semanas de exposición a los OF. Estos efectos están relacionados con la estructura química de los OF que pueden estar influenciados por el metabolismo para formar inhibidores de las enzimas (Jokanovic, 2001).

En estudios realizados con una población humana expuesta durante periodos prolongados a insecticidas OF, se observaron problemas en la piel, leucemia,

aberraciones cromosómicas, alteraciones en el funcionamiento hepático y aumento en la mortalidad (Palacios-Nava, 1999), daños en las funciones endocrinas y la regulación o secreción de las hormonas gonadotróficas (Prakash y Venkatesh, 1996).

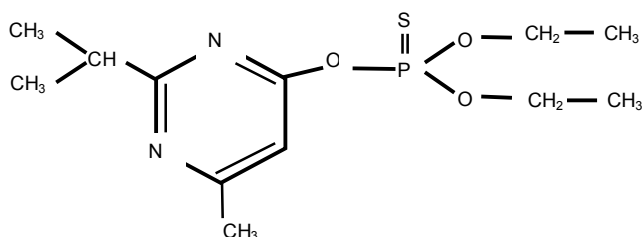
Entre los OF de mayor uso en nuestro país están los insecticidas malatión y diazinón, están asociados a la actividad agrícola y hasta el momento son capaces de combatir plagas que otros insecticidas no han logrado, permitiendo entonces predecir que su persistencia en el mercado mundial durará por tiempo indefinido, hasta obtener otras sustancias químicas que garanticen este propósito. Estos plaguicidas son poco persistentes, lo que implica que sea necesario aplicarlos con más frecuencia para lograr una acción eficiente (Blasiak *et al*, 1999)

1.2.1 DIAZINÓN

Nombre común: Alfatox, Basudin, AG 500, Gardentox y Knoxout

Nombre químico: O,O- dietil O-2 -isopropil-6-metol fosforotioato, 2-Isopropil-4-metil-6-hidroxipirimidina.

Fórmula química



Propiedades.

Este insecticida tiene un peso molecular de 304 Da, su punto de fusión es de 10 °C y el de ebullición a los 120 °C; este se hidroliza a un pH > 6 y es ligeramente soluble a 20 °C 4 mg/l (EPA, 1988). Es un plaguicida usado en la agricultura, en almacenes y en jardines para controlar insectos, ácaros y nemátodos. Se utiliza en forma líquida o gránulos sólidos. Después de ser aplicado, puede persistir en suelo o en la superficie de las plantas, por lo que puede llegar a cuerpos de agua por la lluvia (Sheffield y Lochmiller, 2001; EPA, 2000).

Se sabe que la hidrólisis del diazinón produce el metabolito diazoxón que inhibe la síntesis del ADN; mientras que, con respecto a la acción neurotóxica de este insecticida, se ha comprobado que cuando las hembras preñadas se exponen al diazinón, estos producen una mayor inhibición de la colinesterasa en los fetos que en la madre (Axelrad *et al*, 2002; Morales y Rodríguez, 2004).

En otro estudio, se encontró que el diazinón provocó una disfunción endocrina posnatal (Cranmer *et al*, 1978), otro efecto de este insecticida, fue un alto porcentaje de espermatozoides anormales así como una elevada tasa de mortalidad de los mismos, dando como consecuencia, una disminución en la tasa de concepción en ratas (Abd el-Aziz *et al*, 1994).

En la literatura se ha encontrado que al incubar este insecticida con eritrocitos a concentraciones de 3.3 y 33 mM, se observó que el diazinón afectó la integridad de la membrana, como también indujo el estrés oxidativo, la formación de radicales libres y la lípoperoxidación (Altuntas *et al*, 2004).

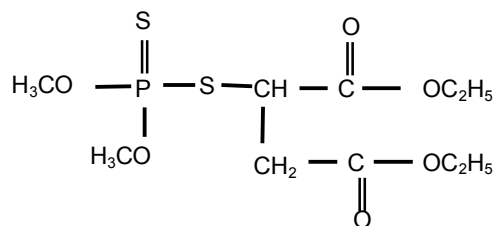
En ecosistemas acuáticos contaminados a altas concentraciones de diazinón, se observó una reducción en poblaciones de peces que habitan ese cuerpo de agua, afectando importantes órganos como los riñones, hígado, branquias, estómago, cerebro, músculos y genitales (Rahman *et al*, 2002)

1.2.2 MALATIÓN

Nombre común: Malatión, Malathion, Mercaptotion, Carbonos y Maldison

Nombre químico: O,O-dimetil-S-1,2-dietilfosforoditioato, dietil (dimetoxitiofosforiltio) succinato,

Fórmula química



Propiedades.

Es otro insecticida OF con peso molecular de 330 Da, su punto de fusión es de 3 °C y el de ebullición de 156 °C; se hidroliza a un pH > 7 y es ligeramente soluble a 25 °C 3.36 mg/l (EPA, 1988). El malatión es usado de acuerdo a su grado de pureza: puro en trabajos de laboratorio y para uso medicinal y técnico para uso comercial; este insecticida es utilizado para el control de una amplia variedad de insectos, entre ellos pulgones, langostas, moscas de la fruta, mosquitos, ácaros y arácnidos. (Aldridge y Nemery, 1979). Es considerado cancerígeno, mutagénico, teratogénico, neurotóxico y ecotóxico; la toxicidad de este insecticida es relativamente baja para los mamíferos pequeños, además, tiene efectos negativos sobre la salud humana (EPA, 1988). La mayor parte de la contaminación ambiental con malatión proviene del uso agrícola ya que, después de su aplicación puede encontrarse en el aire, en cuerpos de agua, suelos o en la superficie de las plantas. El malatión es tóxico para patos silvestres (LD₅₀ 1.485 mg/kg), invertebrados acuáticos (CL₅₀ 0.5-3000 µg/l), peces (CL₅₀ 4-11.700 µg/l), anfibios y abejas [Extension Toxicology Network (EXTOXNET), 1993; EPA, 2000].

En un estudio realizado con voluntarios para observar el efecto del malatión a dosis altas (24 mg malatión/persona/día vía oral y 9 g/persona/día por inhalación) (EPA, 2000), se observó la reducción de la actividad de la enzima colinesterasa y el aumento de aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas, disminución del índice mitótico en muestras de sangre periférica y el aumento en la frecuencia de micronúcleos (Windham *et al*, 1998; Garaj-Vrhovac y Zeljezic, 2001).

El malatión modula el estrés oxidativo y la respuesta inmune en animales experimentales, también induce la apoptosis dependiente de las caspasas en cultivos de fibroblastos de ratón a concentraciones de 0.01-20 µM. Las células expuestas al insecticida exhiben cambios bioquímicos y morfológicos que son característicos de la apoptosis (Masoud *et al*, 2003).

El malaoxón es un metabolito producido por la oxidación del malatión en el organismo de los mamíferos, insectos y plantas. Este metabolito es 40 veces más

tóxico que el malatión puro (Brenner, 1992). En animales experimentales, el malaoxón induce deterioro en las funciones hepáticas y renales y cambios histopatológicos en hígado, riñón, intestino y estómago. En ratones, el metabolito altera la morfología y fisiología de los testículos y afecta la calidad espermática. En sistemas *in vitro*, el malaoxón a 200 μ M induce la muerte celular o actúa como agente genotóxico, produciendo rompimiento en el ADN, aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas y la formación de micronúcleos en varios tipos de células expuestas al plaguicida (Cabello *et al*, 2003)

Para explicar los efectos deletéreos de los insecticidas diazinón y malatión sobre la fertilización, se debe conocer el proceso de la reproducción sexual tanto en humanos como en animales de laboratorio.

1.3 FERTILIZACIÓN

La fertilización es el proceso de la reproducción sexual por el que se unen un ovocito y un espermatozoide y comienza cuando el semen es depositado en el tracto reproductor de la hembra. Cuando los gametos se ponen en contacto en el oviducto de la hembra ocurren una serie de eventos sucesivos que conducen a la fertilización, a la formación de un cigoto y posteriormente al desarrollo de un nuevo individuo que tiene un contenido genético diferente al de los progenitores (Austin, 1982; Yanagimachi, 1994; Wassarman *et al*, 2001). Desde que la fertilización se observó por primera vez hace más de cien años en invertebrados, ha sido objeto de intensos estudios valiéndose de técnicas como la microscopía óptica y electrónica, bioquímica, biología molecular y fertilización *in vitro* (FIV). Todo esto ha sido necesario para descifrar los procesos que se llevan a cabo desde que interaccionan los gametos hasta que se produce el desarrollo embrionario temprano en la etapa de blastocisto (Betancourt *et al*, 1993; Yanagimachi, 1994; Betancourt *et al*, 2003).

El ovocito es transportado en la dirección correcta por las secreciones del oviducto, por el movimiento de los cilios que lo recubren y por contracciones

musculares de la pared del oviducto. De este modo los ovocitos alcanzan el sitio de la fertilización que en la mayoría de los mamíferos es en el ámpula, una porción amplia del oviducto, donde por lo general se encuentran ya los espermatozoides (Austin, 1982).

Hay evidencias que indican que los espermatozoides se dirigen al ovocito por medio de factores quimiotácticos que se encuentran en el oviducto (Wassarman *et al*, 2001). De los millones de espermatozoides que son eyaculados dentro del aparato reproductor femenino solo algunos llegan al sitio de la fertilización (Hafez, 2000).

Antes de establecer contacto con el ovocito, el espermatozoide penetra a través de las células del cúmulo (CC) que están inmersas en una matriz de ácido hialurónico conjugado con proteínas. Esta matriz es secretada por dichas células al momento de reiniciarse la meiosis. Las CC se expanden antes de la ovulación para permitir el paso de los espermatozoides siendo esta característica un indicio externo de la maduración del ovocito (Yanagimachi, 1994).

Los mecanismos por los cuales los espermatozoides atraviesan las CC no son claros. Hay algunas observaciones que indican que el movimiento mecánico es indispensable para la penetración de esta estructura, sin embargo hay evidencias de que las enzimas contenidas en el acrosoma como hialuronidasa, acrosina, β -galactosidasa y arilsulfatasa pueden ser responsables de la capacidad de penetración, ya que cuando se emplearon inhibidores de la hialuronidasa se impidió la penetración de los espermatozoides (Yanagimachi, 1994).

En algunas especies como ratones, porcinos y bovinos la presencia de las CC hace más eficiente la FIV por la existencia de factores solubles secretados por ellas, que estimulan la movilidad espermática y promueven la reacción acrosomal. Se han propuesto otras funciones de las CC como prolongar la vida fértil del ovocito, hacer más lento el proceso de endurecimiento de la ZP después de la ovulación, proporcionar un medio para la selección de espermatozoides más vigorosos y permitir que éstos penetren al ovocito con menor esfuerzo. Todas

estas funciones permiten que la fertilización sea más eficiente (Yanagimachi, 1994).

1.3.1 INTERACCIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES CON LA ZONA PELÚCIDA

La zona pelúcida (ZP) en los mamíferos tiene diversas funciones como el reconocimiento especie-específico con el espermatozoide, la inducción de la reacción acrosomal y evitar la polispermia. Durante las primeras etapas del desarrollo embrionario la ZP protege al embrión, sin ella los blastómeros podrían disociarse, o adherirse a las paredes del oviducto y perecer, además ayuda a la implantación del embrión en el útero.

Los espermatozoides que han penetrado las CC se unen a la ZP por medio de la interacción de las moléculas de la superficie de ambas células. Durante la reacción acrosomal se liberan hialuronidasa y proteasas que son esenciales para la penetración del espermatozoide a través de la ZP (Yanagimachi, 1994; Betancourt *et al*, 2003).

Una vez que el espermatozoide se une a la ZP, debe atravesarla. Se han formulado dos hipótesis para explicar este proceso, una de ellas indica que la fuerza mecánica del espermatozoide es suficiente para romper los puentes disulfuro de las glicoproteínas de la ZP. La otra postula que los espermatozoides que no llevan a cabo la reacción acrosomal no pueden penetrarla y que la acrosina hidroliza todas las glicoproteínas de la ZP. Estas dos hipótesis no son excluyentes para propiciar que el espermatozoide se desplace a través de la ZP (Yanagimachi, 1994)

1.3.2 FUSIÓN DEL ESPERMATOZOIDE CON EL OVOCITO

Una vez que el espermatozoide ha pasado a través de la ZP, cruza rápidamente el espacio perivitelino, su cabeza se une a la membrana plasmática del ovocito (oolema) y el cuerpo completo se incorpora al citoplasma (ooplasma).

En todos los animales excepto en los euterios, la membrana interna del acrosoma es la primera en fusionarse con el oolema. En los euterios, como murinos, bovinos y porcinos la región ecuatorial de la membrana plasmática del espermatozoide es la que se fusiona con el oolema. La región posterior de la cabeza y la cola son incorporadas por medio de la fusión de sus membranas con el oolema, y la región anterior de la cabeza con la parte interna del acrosoma expuesta, es fagocitada por el ovocito (Yanagimachi, 1994; Betancourt *et al*, 2003).

Al fusionarse el espermatozoide con el ovocito, se produce una serie de eventos de tipo morfológico y bioquímico que constituyen el proceso de activación. Estos cambios conducen a la diferenciación del ovocito fertilizado llamado cigoto, la división embrionaria y la formación de un nuevo individuo con complemento genético diploide.

Después de que se produce el rompimiento de la vesícula germinal, se inicia la maduración del ovocito y como resultado de la primera división meiótica se libera el primer cuerpo polar. Inmediatamente después, se inicia la segunda división meiótica que se detiene en metafase II y solo continúa con la penetración del espermatozoide (Wassarman *et al*, 2001).

En los mamíferos la prueba más clara de que el ovocito ha sido activado es la liberación de los gránulos corticales (GC) para impedir el acceso a espermatozoides adicionales. Después de la penetración del espermatozoide al ovocito, la segunda metafase se reanuda, se completa la meiosis y se libera el segundo cuerpo polar. El complemento haploide del ovocito se transforma en el pronúcleo femenino (PNf). Simultáneamente, el espermatozoide en el ooplasma se transforma y su núcleo se descondensa para dar origen al pronúcleo masculino (PNm) (Yanagimachi, 1994).

1.3.3 REACCIÓN CORTICAL Y BLOQUEO A LA POLISPERMIA

Con la penetración del espermatozoide, los GC se fusionan con el oolema y liberan su contenido enzimático hacia el espacio perivitelino alterando las propiedades de la ZP impidiendo la entrada de espermatozoides adicionales, lo

que se conoce como polispermia. Esta puede producirse tanto *in vivo* como *in vitro* cuando los ovocitos fertilizados son inmaduros o han envejecido, la reacción de los GC es defectuosa y su exocitosis es deficiente, permitiendo el paso de dos o más espermatozoides (Yanagimachi, 1994).

En condiciones *in vivo*, la polispermia puede producirse cuando un gran número de espermatozoides alcanza el sitio de la fertilización. También se presenta cuando el apareamiento es tardío o la temperatura de la hembra es elevada por fiebre o hay un incremento en la temperatura ambiental (Yanagimachi, 1994; Bearden y Fuquay, 1982). En cualquiera de los casos la polispermia provoca que el cigoto tenga dotaciones cromosómicas triples o múltiples por lo que los embriones pueden presentar mosaicismo o ploidías, produciendo embriones poliploides que no son viables. La polispermia puede ser la causa de la disminución en la tasa de concepción y el aumento en la mortalidad embrionaria (Han *et al*, 1999).

En los mamíferos se conocen poco los mecanismos moleculares durante la exocitosis de los GC. En los ovocitos de criceto fertilizados *in vitro* se ha observado que la exocitosis comienza menos de un minuto después de la unión del espermatozoide con el ovocito. Sólo los ovocitos que han completado su maduración son capaces de presentar exocitosis de los GC cuando son fertilizados, esta facultad comienza durante la MI y alcanza su nivel normal con la MII (Yanagimachi, 1994).

1.3.4 DESCONDENSACIÓN DEL NÚCLEO DEL ESPERMATOZOIDE

Después de que el espermatozoide penetra en el ovocito y lo activa, la envoltura nuclear espermática se rompe comenzando por la región del segmento ecuatorial y el material nuclear se incorpora al ovocito antes de que el núcleo espermático se descondense (Yanagimachi, 1994).

Para que se pueda descondensar la cabeza del espermatozoide en el ovocito se requiere que haya ocurrido el rompimiento de la vesícula germinal y que esté presente en el citoplasma del ovocito un componente llamado factor de descondensación del núcleo del espermatozoide. Los ovocitos inmaduros no

pueden inducir la descondensación nuclear del espermatozoide ni la formación del PNm.

En el citoplasma del ovocito, el espermatozoide pierde las protaminas del núcleo y hay una reducción de los enlaces disulfuro. Un factor importante para la descondensación del núcleo es la presencia de glutatión en el citoplasma del ovocito, que actúa en la reducción de estos enlaces. Durante la descondensación del núcleo espermático las protaminas son sustituidas por histonas y las proteínas de la cromatina son remplazadas por proteínas provenientes del ovocito (Yanagimachi, 1994). Mientras el ovocito completa la segunda división meiótica y se forma el PNf, la cromatina descondensada del espermatozoide forma el PNm. En los mamíferos la fusión de los dos pronúcleos dura aproximadamente dos horas. En el citoplasma del ovocito existe una sustancia llamada factor de crecimiento del pronúcleo que es producida cuando el ovocito madura en presencia de las CC. Este factor no es especie específico, porque permite la formación del PNm en ovocitos desprovistos de ZP que son penetrados por espermatozoides heterólogos. En el ovocito, la síntesis de glutatión es indispensable para la formación del PNm (Niwa, 1993).

Después de la fusión de los gametos, los dos PN inician la síntesis de ADN, la etapa en que éstos son visibles se conoce como pronuclear o precigótica. En un inicio los PN recién formados se encuentran alejados uno del otro, posteriormente se sitúan al centro del ovocito y se ven muy cercanos, sus superficies forman interdigitaciones, las membranas nucleares se entrelazan y se fusionan en un proceso que recibe el nombre de singamia. La envoltura nuclear desaparece y los cromosomas paternos y maternos se unen. De esta manera se forma el cigoto, en el que se restaurará el número cromosómico diploide. La singamia es considerada como el último paso de la fertilización y el inicio del desarrollo embrionario (Yanagimachi, 1994).

2. ANTECEDENTES

La contaminación por insecticidas ha llegado hasta regiones alejadas de las zonas donde se emplean: por ejemplo, en la región ártica se han detectado OC en la fauna marina, y en la sangre, leche materna, secreciones del tracto genital, semen y líquido folicular de los humanos que consumen estos animales. Para analizar el efecto de estos plaguicidas, se realizaron estudios *in vitro* en ovocitos porcinos empleando una combinación de OC similar a la detectada en las cadenas alimenticias y evaluaron su efecto en la maduración, fertilización y desarrollo embrionario. Estos autores observaron una disminución en la expansión y en la viabilidad de las CC, en el número de ovocitos capaces de completar la metafase II y en el porcentaje de ovocitos con polispermia, determinando que el efecto de los plaguicidas tuvo una relación dosis dependiente (Campagna *et al*, 2001)

La competencia de los ovocitos para llevar a cabo el desarrollo embrionario se vio afectada cuando los OC estuvieron presentes en el medio de maduración. Se sugiere que este efecto pudo deberse a la alteración de las uniones comunicantes entre las CC y el ovocito, lo que causó una disminución en el paso del glutatión hacia el ovocito, éste es necesario para la maduración citoplásmica, la formación del PNm y la competencia del desarrollo embrionario (Campagna *et al*, 2001). El glutatión participa en funciones biológicas durante la proliferación celular, transporte de aminoácidos, síntesis de proteínas y ADN; también es un antioxidante intracelular (Boquest *et al*, 1999).

Campagna *et al* (2002) encontraron que la mezcla de OC en el medio de fertilización, afectó la viabilidad, la movilidad inicial y progresiva del espermatozoide, así como su unión con la ZP, la reacción acrosomal y la fusión de los gametos. La activación del ovocito y la descondensación del núcleo espermático también se alteraron. Los OC alteran la homeostasis del Ca^{+2} que es esencial la fertilización, incluyendo la capacitación, la interacción de los gametos, la reacción acrosomal y la fertilización. La membrana plasmática es un blanco para los OC lipofílicos, ya que sus componentes lipídicos y proteínicos

interaccionan con plaguicidas causando su daño funcional y estructural (Campagna *et al*, 2002).

2.1 EFECTO DE LOS ORGANOFOSFORADOS EN LA REPRODUCCIÓN

En la literatura existe una amplia información acerca del efecto neurotóxico de los OF, estudios *in vitro* con animales, han revelado que el malatión tiene efectos dañinos sobre la población de las células germinales y de Sertoli en el testículo; *in vitro* el paratión y el metabolito paraoxón afectan la viabilidad espermática, la condensación de la cromatina y la capacidad fertilizantes, así como la proliferaron de las células testiculares de humanos (Contreras *et al*, 1999)

Se ha demostrado que los pequeños mamíferos son buenos biomonitores de contaminantes (Sheffield y Lochmiller, 2001). En ratas tratadas con OF (monocrotofos y metil paratión), se observó una disminución en el tamaño y peso del útero, de los ovarios y una reducción en el número de folículos. Su efecto ocasionó fibrosis y atresia folicular, alteraciones en el ciclo estral y la prolongación de la fase de diestro (Rao y Kaliwal, 2002; Seth *et al*, 2000). Ratas preñadas expuestas con monocrotofos, tuvieron una reducción en el peso corporal, algunos animales presentaron hemorragia vaginal al día 14 de la gestación y otros murieron al día 17 de la gestación. Este compuesto así como el paratión y el malatión redujeron la fertilidad y la paridad de estos roedores (Adilaxmamma *et al*, 1994).

En un trabajo realizado para probar el efecto del diazinón sobre algunas comunidades de roedores que habitaban en un campo experimental, rociado con una dosis baja del insecticida (0.56 kg/hectárea), se encontró que después de 30 días de exposición, los índices reproductivos, disminuyeron entre el 20 y el 80 % en machos y entre el 33 y 100 % en hembras, mostrándose en la colonia, una reducción de hembras preñadas y de nacimientos. Estos resultados sugieren que el diazinón que persistió en el ambiente y en el alimento, afectó drásticamente la reproducción de estos roedores. (Sheffield y Lochmiller, 2001).

En un estudio realizado en hombres ocupacionalmente expuestos a una mezcla de plaguicidas OF, se observó que la estructura de la cromatina espermática presentó alteraciones en la mayor parte de las muestras estudiadas de semen y éste tenía un potencial bajo de fertilidad. Esto sugiere que los OF alteraron la cromatina espermática, lo que produjo una disminución en el número de células y una alta susceptibilidad de la desnaturalización de ADN. La cromatina espermática es un blanco sensible al efecto de los OF lo cual puede producir efectos adversos en la reproducción. (Sánchez- Peña *et al.* 2004)

En ratones inyectados con una dosis de 8.12 mg/kg de diazinón, se mostró que el insecticida alteró la cromatina espermática y la fosforilación de las protaminas nucleares, además se encontró una alteración en la viabilidad movilidad y morfología (Piña-Guzmán *et al.*, 2005)

El diazinón puede dañar varios órganos y tejidos incluyendo una disminución en el peso de los genitales, reduciendo la movilidad y la viabilidad espermática e incrementando las anomalías morfológicas del espermatozoide. Se ha observado que en experimentos *in vitro* el paratión y su metabolito el paraoxón afecta la condensación de la cromatina de espermatozoides humanos cuando estos son incubados en concentraciones de 0.05 a 0.8 mM (Contreras *et al.*, 1999).

En el Laboratorio de Biología Celular de la UAM-I se han realizado estudios en ovocitos, espermatozoides y embriones de cerdo que fueron expuestos a los insecticidas malatión y diazinón. Estos insecticidas se pusieron en contacto con los ovocitos durante el periodo de maduración y la capacitación espermática. En los ovocitos se observó una disminución en la maduración con el diazinón y el malatión en las concentraciones de 25 y 50 μM respectivamente. Se obtuvo la concentración de inhibición 50 de la maduración. Para el diazinón fue 1 μM y para el malatión fue 34 μM (Casas *et al.*, 2004). Durante el desarrollo embrionario el índice de división y de mórulas disminuyó significativamente a una concentración de 500 μM de malatión con respecto al testigo, en el caso del diazinón en las concentraciones 100 y 250 μM (Ducolomb *et al.*, 2004). En espermatozoides de

cerdo expuestos a una concentración 500 M de malatión y diazinón, después de una hora de tratamiento se observó disminución en su viabilidad y movilidad progresiva (Betancourt *et al*, 2006).

3. JUSTIFICACIÓN

Aunque los plaguicidas han sido diseñados para ofrecer una alta especificidad de acción, su uso genera innumerables efectos sobre los organismos, por ello es importante realizar estudios de toxicología reproductiva ya que es necesario conocer los efectos por los cuales los insecticidas OF afectan el proceso de la fertilización, esto es debido a que existen pocos trabajos *in vitro* sobre el efecto tóxico que estos plaguicidas puedan ocasionar en los gametos. Además la mayoría de los estudios del efecto de los plaguicidas han sido realizados *in vivo* en roedores.

El estudio de los insecticidas malatión y diazinón es importante por ser dos plaguicidas que tienen un uso indiscriminado en nuestro país y porque existen diversos reportes acerca de los daños citotóxicos, genotóxicos y teratogénicos que provocan. Para esto, los modelos *in vitro* constituyen una herramienta útil por su rapidez y precisión para evaluar el daño a nivel celular. Además, el efecto observado *in vitro* podría sugerir los mecanismos que ocurren en el organismo. El uso de gametos de cerdo *in vitro* como modelo para estudios toxicológicos es adecuado para evaluar el efecto de los plaguicidas, en la viabilidad de los ovocitos y la interacción de los gametos durante la fertilización debido a que esta especie presenta aspectos fisiológicos, anatómicos, bioquímicos y endocrinos similares al humano (Campagna *et al*, 2002; Prather, 2004).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el posible efecto de dos insecticidas organofosforados sobre la fertilización *in vitro* de ovocitos porcinos.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- * Evaluar diferentes concentraciones de diazinón y malatión para determinar la viabilidad de los ovocitos durante la fertilización *in vitro* y determinar si hay una correlación entre las concentraciones de los insecticidas y la viabilidad en ovocitos porcinos.

- * Usando concentraciones subletales estudiar el efecto del diazinón y malatión sobre la fertilización *in vitro* por medio de la evaluación del desarrollo de los pronúcleos y establecer una posible correlación entre la concentración de los insecticidas y la inhibición de la fertilización.

5. HIPÓTESIS

Se sabe que los insecticidas OF causan diversas alteraciones en el proceso reproductivo de los mamíferos, ya pueden actuar como disruptores endocrinos, ocasionando una disminución en los índices de fertilidad de algunas especies animales incluyendo el hombre.

Por tal motivo, al coincubar gametos con diferentes concentraciones de diazinón y malatión, estos insecticidas organofosforados serán capaces de afectar la viabilidad de los ovocitos y además disminuirán los porcentajes de fertilización *in vitro* de los ovocitos conforme aumente la concentración.

6. MATERIAL Y MÉTODO EXPERIMENTAL

6.1 OBTENCIÓN DE OVOCITOS Y MADURACIÓN IN VITRO (MIV)

A menos que se especifique otra cosa todos los reactivos fueron de la marca Sigma Chemical Co. (St. Louis Mo, USA)

Los ovarios se colectaron de cerdas prepúberes recién sacrificadas en el rastro (Los Arcos, los Reyes, Edo. de México.) y se transportaron en un tiempo no mayor de 2 horas al laboratorio en solución de NaCl al 0.9% con 75 µg/ml de penicilina G y 50 µg/ml de estreptomina a 25-28 °C. Una vez en el laboratorio se lavaron por lo menos tres veces en la solución salina con los antibióticos. Los folículos ováricos de 3 a 6 mm se puncionaron utilizando una aguja hipodérmica de 18 x 38 mm unida a una jeringa desechable de 10 ml (Becton Dickinson, México) para la obtención del líquido folicular porcino. Este se colocó en un tubo de 50 ml y se dejó sedimentar 20 minutos; el paquete celular se lavó dos veces con medio modificado de Tyrode suplementado con lactato de sodio 10 mM, HEPES 10 µM y 1mg/ml de polivinil alcohol (PVA) a pH 7.4 y se dejó sedimentar 15 minutos. Posteriormente el paquete celular se depositó en una caja de Petri de 90 mm de diámetro (S y M Laboratorios S.A de C.V. México) con 20 ml de la misma solución. Bajo un microscopio estereoscópico Olympus SZ60 (Olympus Optical, Japón) se aspiraron los complejos ovocito-células del cúmulus (COC) con una pipeta Pasteur estéril, alargada por calor, y seleccionado aquellos ovocitos rodeados por una masa compacta de células del cúmulus, con citoplasma uniforme y granular (Abeydeera *et al*, 1998; Ducolomb, 2005).

La maduración de los COC se llevó a cabo en medio para maduración de ovocitos libre de proteínas preparado con medio para cultivo de tejidos TCM 199 con sales de Earle y bicarbonato de sodio (In Vitro S. A. México), suplementado con PVA al 0.1%, D-glucosa 3.05 mM, piruvato de sodio 0.91 mM, cisteína 0.57 mM y EGF 10 ng/ml (Wang y Niwa, 1995).

Los COC seleccionados, se lavaron 3 veces en cajas de Petri estériles de 35 mm de diámetro (Nunc, Dinamarca) que contenían una gota de 500 μ l de medio de maduración cubierta con aceite mineral (Fisher). En cajas estériles de 4 pozos (Nunc, Dinamarca) se depositaron de 40 a 60 ovocitos por pozo en una gota de 500 μ l de medio de maduración cubierta con aceite mineral. Inmediatamente antes de la incubación se agregaron a cada gota de cultivo 0.5 μ g/ml de FSH y 0.5 μ g/ml LH y se incubaron a 39 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 42 h.

Al terminar el periodo de maduración, a cada pozo con ovocitos se le agregaron 300 μ l de hialuronidasa al 0.1% en TCM-199, y mediante una pipeta Pasteur alargada por calor, se removieron las células del cumulus. Los ovocitos desnudos se lavaron 2 veces en gotas de 500 μ l de medio de maduración cubiertas por aceite mineral en cajas de Petri de 35 mm de diámetro. Posteriormente, los ovocitos se lavaron 3 veces en gotas de 500 μ l de medio de fertilización designado como medio amortiguado con Tris (TBM por sus siglas en inglés), compuesto por NaCl 113.1 mM, KCl 3 mM, CaCl₂ 2 H₂O 7.5 mM, Tris 20 mM, glucosa 11 mM, piruvato de sodio 5 mM; suplementado con albúmina sérica bovina (BSA) fracción V al 0.4% y cafeína 2.5 mM. Este medio se preparó 48 horas antes de la fertilización y se preincubó a 39 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% y humedad a saturación (Abeydeera *et al*, 1998). Se depositaron de 30 a 40 ovocitos en gotas de 50 μ l de medio de fertilización cubiertas con aceite mineral en cajas de 4 pozos y se incubaron aproximadamente 30 minutos hasta la inseminación.

6.2 OBTENCIÓN, LAVADO DEL SEMEN Y CONTEO ESPERMÁTICO

La muestra de semen se colectó en una granja porcina de un semental de fertilidad probada por medio de la técnica de la mano enguantada, se desechó la fracción gelatinosa y se transportó en menos de 1 hora a 37 °C al laboratorio. Se utilizaron únicamente los eyaculados con 85% de movilidad progresiva y menos de 10% de anormalidades espermáticas. La muestra se diluyó 1:1 con solución salina de fosfatos de Dulbecco (DPBS; Gibco BRL, NY. USA) suplementada con

0.1% de BSA (fracción V), 75 µg/ml de penicilina potásica G y 50 µg/ml de sulfato de estreptomicina a un pH 7.2. Esta suspensión se centrifugó a 61 x g 5 minutos. Se tomaron 5 ml del sobrenadante, se agregaron 5 ml de DPBS y se centrifugó a 1900 x g 5 minutos. El paquete celular se resuspendió con 10 ml de la misma solución y se centrifugó 2 veces más a 1900 x g 5 minutos. En cada lavado se verificó el porcentaje mínimo de movilidad espermática (80%). El sobrenadante se desechó y al paquete resultante se agregaron 100 µl de TBM. La concentración espermática se determinó realizando una dilución 1:1000 con agua y el conteo de los espermatozoides se llevó a cabo utilizando una cámara cuenta glóbulos (Neubauer. Brand, Alemania) y observando al microscopio de contraste de fases (Carl Zeiss, Alemania; Ducolomb, 2005).

6.3 FERTILIZACIÓN IN VITRO (FIV) CON ORGANOFOSFORADOS

Se preparó una solución de los insecticidas 10 mM, empleando como solvente agua desionizada. Se realizó un dilución 1:10 en TBM, se tomo la cantidad necesaria para agregarla al medio de FIV y se obtuvieron las concentraciones finales de diazinón (Agroquímica Tridente, México) 50, 100 y 500 µM, y las de malatión (Agricultura Nacional S. A., México) 50, 100, 500, 750 y 1000 µM. Se depositaron de 30 a 40 ovocitos en gotas de 50 µl de medio de fertilización con los insecticidas y se cubrieron con aceite mineral en cajas de 4 pozos. Las concentraciones que se emplearon fueron establecidas previamente en ensayos de MIV de ovocitos porcinos realizados en el Laboratorio de Biología Celular de la UAMI. En la concentración 0 µM contenía ovocitos y medio de FIV.

Del paquete espermático se tomó la concentración necesaria y se diluyó con TBM para que al agregar 50 µl de esta suspensión a la microgota con los ovocitos se obtuviera una concentración final de 5×10^5 espermatozoides por ml. Los gametos se coincubaron durante 7 h a 39 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% y humedad a saturación (Abeydeera *et al*, 1998). Durante este periodo los gametos se expusieron a los plaguicidas.

Después del tiempo de coincubación, los ovocitos se lavaron 3 veces en gotas de 50 μ l de medio desarrollo embrionario North Carolina State University-23 (NCSU-23) (Peters y Wells, 1993) suplementado con BSA libre de ácidos grasos al 0.4% para eliminar los espermatozoides que quedaron adheridos a zona pelúcida de los ovocitos. Los ovocitos se transfirieron a gotas de 500 μ l del mismo medio cubiertas con aceite mineral en placas de 4 pozos y se incubaron 12 h en las mismas condiciones (Ducolomb, 2005)

6.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL MALATIÓN Y DIAZINÓN DURANTE LA FIV

6.4.1 EVALUACIÓN DE VIABILIDAD DE LOS OVOCITOS

Después de 21 horas de la inseminación, un grupo de ovocitos (entre 10 y 20) se destinó para determinar la viabilidad. A cada pozo de 500 μ l de medio de desarrollo con los ovocitos fertilizados en las distintas concentraciones del insecticida se les agregaron 200 μ l de tetrazolio (MTT) a una concentración de 0.5 mg/ml y se incubaron en las condiciones antes mencionadas durante 2 h. Transcurrido este tiempo se evaluó la viabilidad de los ovocitos bajo el microscopio invertido Olympus CK2 (Olympus Optical, Japón) a 400 aumentos. Se consideraron vivos los ovocitos que presentaron una coloración violeta y muertos los que no la presentaron (Freshney, 1987).

6.4.2 EVALUACIÓN DE LA FIV.

Para la determinación de la FIV, 21 horas después de la inseminación, el resto de los ovocitos se lavó tres veces en gotas de 50 μ l de TL-HEPES-PVA en una caja de Petri de 35 mm. Se tomaron de 15 a 20 ovocitos y se depositaron en un portaobjetos (Fisherbrand. Fisher Scientific P.A. USA) que contenía gotas de parafina y vaselina (1:9) en cada una de las cuatro esquinas donde se deposita el cubreobjetos. Los ovocitos se presionaron para mantenerlos fijos con un cubreobjetos 22x22-2 (Fisherbrand Fisher Scientific P.A. USA.). Cada preparación se depositó en una solución fijadora de etanol:ácido acético (J.T Baker) 3:1 (v/v) durante 72 horas. Posteriormente, los ovocitos se tiñeron con una solución de

acetorceína al 1% preparada en ácido acético glacial al 45 % (J.T Baker) (Abeydeera *et al*, 1998).

6.5 CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LA FIV

La maduración y fertilización de los ovocitos se evaluaron utilizando un microscopio de contraste de fase a 400 aumentos. Los ovocitos se clasificaron de acuerdo a los siguientes criterios:

Maduros: los ovocitos que presentaron cromosomas en metafase II y el primer cuerpo polar.

Fertilizados Monospérmicos: Los ovocitos que presentaron dos pronúcleos (PN): masculino y femenino.

Fertilizados Polispérmicos: los ovocitos que presentaron más de dos pronúcleos.

Los resultados se analizaron utilizando los siguientes criterios:

Estado de los ovocitos	
Madurados	Suma de ovocitos en metafase II + fertilizados / total de ovocitos
Fertilizados	Ovocitos con dos o más PN/Total de ovocitos
Polispermia	Ovocitos con más de 2 PN/ovocitos fertilizados

(Ducolomb, 2005)

6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para comparar el efecto de las distintas concentraciones con respecto al control se empleó la prueba estadísticas ji- cuadrada. La correlación de Spearman (r) se utilizó para determinar si existió una relación concentración-respuesta. (Castilla S. L., y Cravioto, J, 1991). Ambas pruebas estadísticas se aplicaron con un nivel de confianza $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

Para estandarizar las técnicas de MIV y FIV se realizaron 5 ensayos. Se obtuvo en promedio 81% de ovocitos madurados, 63% fueron fertilizados y, el 8% presentaron polispermia. Una vez estandarizadas las técnicas se procedió a evaluar los efectos del malatión y del diazinón sobre la viabilidad, la FIV y la polispermia de los ovocitos expuestos a los insecticidas.

7.1 EFECTO DEL DIAZINÓN SOBRE LA VIABILIDAD

Para obtener el porcentaje de viabilidad de los ovocitos expuestos al diazinón, se separaron 20 ovocitos para analizar el efecto de concentraciones crecientes del insecticida: 0, 50, 100 y 500 μM por experimento y cada uno se realizó por duplicado. En el cuadro 1 se muestran los porcentajes de viabilidad de los ovocitos expuestos a las diferentes concentraciones del insecticida y se determinó la correlación entre experimentos por el método descrito por Spearman. En los grupos testigo (concentración cero) y en la concentración de 100 μM se observaron 90% de viabilidad de los ovocitos, mientras que en las concentraciones de 50 y 500 μM se obtuvieron 70 y 80% de viabilidad respectivamente. Aunque hubo disminución de la viabilidad en los ovocitos expuestos a 50 y 500 μM , el análisis estadístico por ji-cuadrada no mostró diferencia significativa en los tratamientos con respecto al control ($p > 0.05$; cuadro 2). Lo anterior indica que el insecticida no tuvo efecto marcado sobre la viabilidad de los ovocitos inseminados. Después de determinar la correlación de Spearman, se obtuvieron el valor de $r = -0.42$, que indica que no hay correspondencia entre las concentraciones y la viabilidad ($p > 0.05$; figura 1).

CUADRO 1. Efecto de diversas concentraciones de diazinón en el medio de cultivo sobre la viabilidad de ovocitos inseminados con espermatozoides *in vitro*

Concentración (μM)	N° Ovocitos vivos/ N° ovocitos totales (%)	
	Ensayo 1	Ensayo 2
0	9/10 (90)	9/10 (90)
50	7/10 (70)	8/10 (80)
100	9/10 (90)	9/10 (90)
500	8/10 (80)	7/10 (70)

La prueba de Spearman indicó que no hubo correlación entre las concentraciones del insecticida con la viabilidad de los ovocitos ($r = -0.42$; $p > 0.05$).

7.2 EFECTO DEL DIAZINÓN SOBRE LA FIV

En el cuadro 2 se muestran los porcentajes promedio de viabilidad, maduración, fertilización y polispermia de los ensayos que se realizaron para cada tratamiento. Para evaluar el efecto del diazinón, se realizaron 5 ensayos, con un total de 694 ovocitos: 169 para el testigo, 173 para la concentración de 50 μM , 174 para 100 μM y 178 para 500 μM . Como la maduración es un evento previo a la fertilización, se evaluó éste como un indicador de que el modelo experimental para la FIV era el adecuado y la técnica reproducible. El grupo testigo presentó el 83% de maduración y los grupos de 50, 100 y 500 μM tuvieron porcentajes de 77, 79 y 73% respectivamente. En grupo testigo se observó que de 169 ovocitos inseminados, 80 estuvieron fertilizados (45%). En el grupo de ovocitos tratados con 50 μM , 70 ovocitos de 173 presentaron pronúcleos (PN; 33% de fertilización). Cuando los ovocitos se coincubaron en 100 μM del insecticida, 53 de 174 ovocitos fueron fertilizados (26%). Finalmente, en la concentración de 500 μM se obtuvo 22% de fertilización ya que 49 de 178 ovocitos presentaron PN.

En el cuadro 3 se indican los resultados de cada uno de los 5 ensayos que se realizaron en cada tratamiento. En la figura 2 se observan los porcentajes de fertilización de cada ensayo. Conforme aumentó la concentración del diazinón hubo una disminución en la fertilización. Al emplear la prueba estadística de ji-cuadrada hubo diferencia significativa entre las concentraciones de 100 y 500 μM con respecto al testigo ($p < 0.05$, figura 1). Estos resultados indican que el diazinón afectó el porcentaje de fertilización de los ovocitos. Cuando se realizó la correlación de Spearman se obtuvo una r de -0.43, que no fue significativa ($p > 0.05$), lo que se indica que las diferentes concentraciones de diazinón no tuvieron efecto concentración-respuesta sobre la fertilización.

7.3 EFECTO DEL DIAZINÓN SOBRE LA *POLISPERMIA*

Al evaluar el número de ovocitos que presentaron más de dos pronúcleos en la fertilización, se obtuvieron en promedio 6% de ovocitos polispérmicos en el grupo testigo. Solo las concentraciones de 50 μM y 100 μM del insecticida tuvieron un aumento significativo con respecto al testigo (19 y 17% respectivamente $p < 0.05$; cuadro 2 y figura 1).

CUADRO 2. Efecto de diversas concentraciones de diazinón en el medio de cultivo durante la coincubación de espermatozoides y ovocitos en la viabilidad, fertilización *in vitro* y polispermia.

Concentración (μM)	Total de ovocitos evaluados para la FIV	Viabilidad N° ovocitos vivos/N° ovocitos totales (%)	Maduración N° ovocitos MII/N° ovocitos totales (%)	Fertilización N° ovocitos con dos PN/N° ovocitos totales (%)	Polispermia N° ovocitos con más de dos PN/ N° ovocitos fertilizados (%)
0 (testigo)	169	18/20 (90)	140/169 (83)	80/169 (45)	5/80 (6)
50	173	15/20 (75)	134/173 (77)	70/173 (33)	13/70 (19) ^a
100	174	18/20 (90)	138/174 (79)	53/174 (26) ^a	9/53 (17) ^a
500	178	15/20 (75)	130/178 (73)	49/178 (22) ^a	4/49 (8)

Madurados: suma de ovocitos en metafase II + primer cuerpo polar + fertilizados; **Ovocitos fertilizados monospérmicos:** presencia de dos PN (femenino y masculino); **Ovocitos fertilizados polispermiáticos:** presencia de más de dos PN.

^a indica diferencias significativa con respecto al testigo (p < 0.05)

CUADRO 3. Efecto del diazinón agregado al medio de fertilización durante la coincubación de los gametos.

Concentración (μM)	Ovocitos fertilizados/ovocitos inseminados (%)				
	Ensayos				
	1	2	3	4	5
0	6/19 (31)	14/41 (34)	5/25 (20)	33/48 (79)	22/36 (61)
50	1/20 (5)	6/36 (17)	5/26 (19)	36/48 (75)	22/43 (51)
100	3/25 (12)	4/26 (15)	4/32 (13)	23/47 (49)	19/44 (43)
500	0/24 (0)	5/35 (14)	3/25 (12)	26/47 (55)	15/47 (31)

La prueba de Spearman indicó que no hubo correlación entre las concentraciones del insecticida y la fertilización $r = -0.43$ ($p > 0.05$).

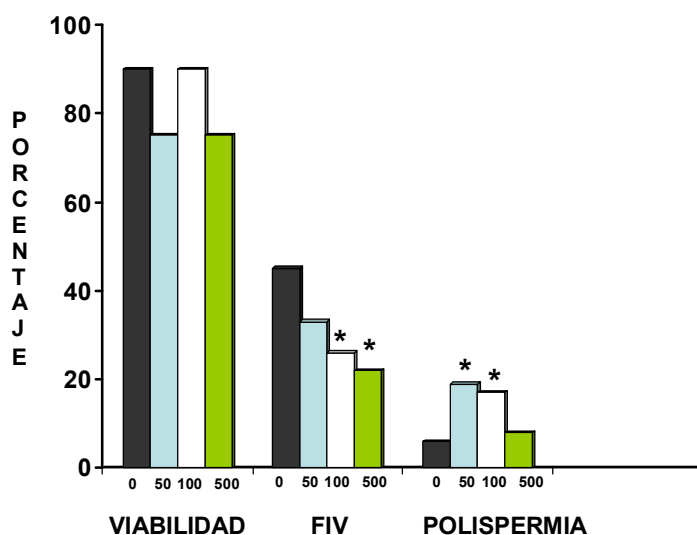


FIGURA 1. Efecto de las concentraciones (μM) de diazinón en el medio de fertilización durante la coincubación de los gametos. Se analizaron los porcentajes promedio de la viabilidad, FIV y polispermia. La prueba de Spearman señaló que no hubo correlación entre las concentraciones del insecticida con la viabilidad y fertilización de los ovocitos.

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

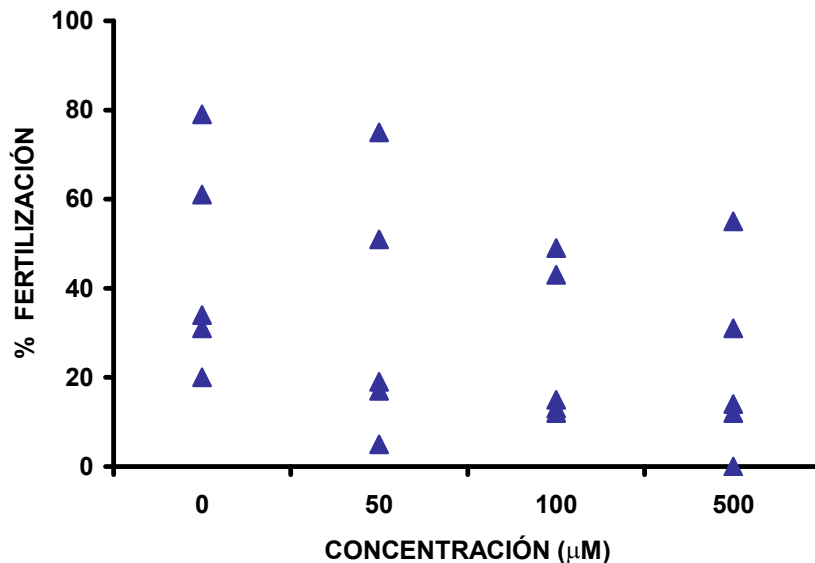


FIGURA 2. Efecto del diazinón en el medio de fertilización durante la coincubación de los gametos. Se realizaron cinco ensayos y cada punto representa el porcentaje de cada ensayo. La Correlación de Spearman ($r = -0.43$) no fue significativa ($p > 0.05$) por lo que no existe correlación entre las concentraciones y la disminución de la fertilización.

7.4 EFECTO DEL MALATIÓN SOBRE LA VIABILIDAD

Para evaluar el efecto del malatión sobre la de viabilidad de los gametos se separaron 289 ovocitos para analizar el efecto de las concentraciones crecientes del malatión: 0, 50, 100, 500, 750 y 1 000 µM por experimento. Para el grupo testigo se realizaron 7 ensayos con un total de 76 ovocitos. Para las concentraciones de 50, 100, y 500 µM se realizaron 3 repeticiones respectivamente y se evaluaron 44, 43 y 40 ovocitos para cada concentración, para la concentración de 750 µM se realizaron 4 ensayos y se evaluaron 31 ovocitos. Por último, para la concentración de 1000 µM se realizaron 5 ensayos y se evaluaron 55 ovocitos. En el cuadro 4 se muestran los porcentajes de viabilidad de los ovocitos expuestos a las diferentes concentraciones del malatión y se determinó la correlación de Spearman entre experimentos. Los porcentajes de viabilidad para el grupo testigo en cada una de las repeticiones fueron 83, 90, 90, 90, 96, 100 y 100%. Para la concentración de 50 µM los porcentajes fueron 90, 90 y 100%. Los porcentajes en el caso de la concentración de 100 µM fueron

70, 80 y 96%. Para la concentración de 500 μM los porcentajes de viabilidad fueron de 70, 70 y 95%. En el grupo de ovocitos tratados con 750 μM , los porcentajes de viabilidad fueron 67, 80, 80 y 90%. Finalmente, en los ovocitos tratados con 1000 μM , los porcentajes de viabilidad fueron 60, 67, 80, 80 y 96%.

En las figuras 3 y 4 se muestra que hubo una disminución aparente en el porcentaje de viabilidad en las concentraciones 100, 500, 750 y 1000 μM , el análisis estadístico por ji-cuadrada, no mostró diferencia significativa en las concentraciones utilizadas de malatión ($p > 0.05$; cuadro 5). Estos datos indican que el malatión no tuvo efecto en el porcentaje de viabilidad de los ovocitos expuestos a este insecticida. La correlación lineal de Spearman reveló una r de -0.43 no significativa ($p > 0.05$; figura 3) lo que indica que no existe una correlación entre las concentraciones empleadas y la viabilidad.

CUADRO 4. Efecto de diversas concentraciones de malatión en el medio de cultivo sobre la viabilidad de ovocitos inseminados con espermatozoides *in vitro*

Concentración (μM)	N° de ovocitos vivos/ N° ovocitos totales (%)						
	Ensayos						
	1	2	3	4	5	6	7
0	9/10 (90)	10/10 (100)	24/25 (96)	5/6 (83)	9/10 (90)	5/5 (100)	9/10 (90)
50	9/10 (90)	9/10 (90)	24/24 (100)	—	—	—	—
100	8/10 (80)	7/10 (70)	22/23 (96)	—	—	—	—
500	7/10 (70)	7/10 (70)	19/20 (95)	—	—	—	—
750	4/6 (67)	9/10 (90)	4/5 (80)	8/10 (80)	—	—	—
1000	4/6 (67)	8/10 (80)	23/24 (96)	3/5 (60)	8/10 (80)	—	—

— No determinado

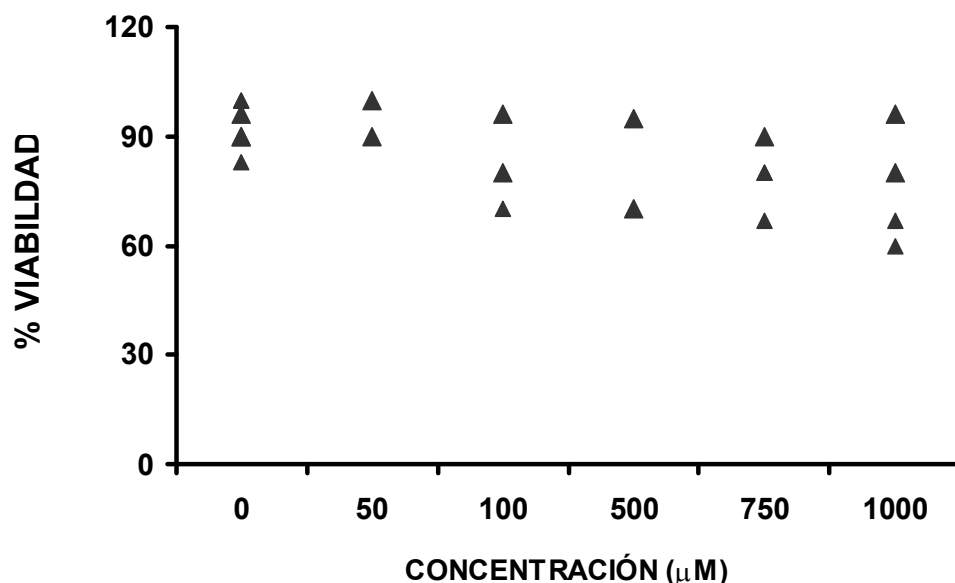


FIGURA 3. Efecto del malatión en la viabilidad de ovocitos inseminados. Cada punto representa el porcentaje de cada ensayo para las concentraciones 0, 50, 100, 500, 750 y 1000 μM . La prueba de Spearman señaló que no hubo correlación entre las concentraciones del insecticida con la viabilidad de los ovocitos ($r = -0.43$; $p > 0.05$)

7.5 EFECTO DEL MALATIÓN SOBRE LA FIV

En el cuadro 5 se muestran los porcentajes promedio de la viabilidad, maduración, fertilización y polispermia de los ensayos que se realizaron en cada tratamiento. Para evaluar el efecto del malatión en la fertilización se utilizaron concentraciones de 0, 50, 100, 500, 750 y 1000 μM en los medios de coincubación en un total de 1 095 ovocitos. Para el grupo testigo se efectuaron 10 repeticiones con 311 ovocitos. Para la concentración de 50, 100 y 500 μM se realizaron 6 repeticiones y se analizaron 146, 157 y 166 ovocitos respectivamente. Finalmente, para las concentraciones de 750 y 1000 μM se hicieron 4 repeticiones con 161 y 154 ovocitos respectivamente (Cuadro 6). En el cuadro 5 se observa que en la fertilización en el grupo testigo de 311 ovocitos inseminados 175 presentaron PN (56% de fertilización). En la concentración de 50 μM , 64 de 146 ovocitos fueron fertilizados (44%). Para el grupo de ovocitos tratados con 100 μM , 68 de 157 ovocitos estuvieron fertilizados (43%). En la concentración se 500 μM , 40 de 166 ovocitos fueron fertilizados (24%). En el grupo de 750 μM se observó que 59 de 161 ovocitos presentaron PN indicando

37% de fertilización. Finalmente la concentración de 1 000 μM , tuvo 38% de fertilización ya que 58 de 154 ovocitos presentaron PN (cuadro 5).

Para el grupo testigo los valores de FIV de los 10 ensayos fueron de 24 a 76%. En el grupo de 50 μM los porcentajes permanecieron de 22 a 79% de fertilización. Para el grupo de 100 μM los porcentajes fueron de 18 a 58%. Los ovocitos tratados con 500 μM presentaron 8 a 39% de fertilización. En el grupo de 750 μM los porcentajes fueron de 6 a 63%. Finalmente, el grupo con 1000 μM presentó valores de 10 a 49% (cuadro 6). En las figuras 4 y 5 se observan los porcentajes de fertilización de cada ensayo para cada concentración del insecticida. Se aprecia que conforme aumenta la concentración del malatión hay una disminución de la fertilización. Al emplear la prueba estadística ji-cuadrada se observó diferencia significativa entre las concentraciones de 500, 750 y 1000 μM con respecto al testigo ($p < 0.05$; cuadro 5). Después de determinar la correlación de Spearman, se obtuvo el valor de $r = -0.47$, que indica que no hay correspondencia entre las concentraciones y el efecto del insecticida sobre la fertilización ($p > 0.05$).

7.6 EFECTO DEL MALATIÓN SOBRE LA POLISPERMIA

Los ovocitos que fueron incubados en las diferentes concentraciones del insecticida presentaron 13% de polispermia en el grupo testigo, 5, 3, 33 20 y 7% en las concentraciones de 50, 100, 500, 750 μM y 1000 μM respectivamente. Las concentraciones con 500 y 750 μM presentaron valores más altos de polispermia (33 y 20%) y en la concentración de 100 μM presentó el valor más bajo. Solo en las concentraciones de 100 y 500 μM tuvieron diferencia significativa con respecto al testigo ($p < 0.05$; figura 4 y cuadro 5).

CUADRO 5. Efecto de diversas concentraciones de malatión en el medio de cultivo durante la coincubación de espermatozoides y ovocitos en la viabilidad, fertilización *in vitro* y polispermia.

Concentración (μM)	Total de ovocitos evaluados para la FIV	Viabilidad N° ovocitos vivos/N° ovocitos totales (%)	Maduración N° ovocitos MII/N° ovocitos totales (%)	Fertilización N° ovocitos con dos PN/N° ovocitos totales (%)	Polispermia N° ovocitos con dos o más PN/ N° ovocitos fertilizados (%)
0 (testigo)	311	71/76 (93)	266/311 (86)	175/311 (56)	22/175 (13)
50	146	42/44 (95)	128/146 (88)	64/146 (44)	3/64 (5)
100	157	37/43 (86)	134/157 (85)	68/157 (43)	2/68 (3) ^a
500	166	33/40 (83)	133/166 (80)	40/166 (24) ^a	13/40 (33) ^a
750	161	25/31 (81)	131/161 (81)	59/161 (37) ^a	12/59 (20)
1000	154	46/55 (84)	231/154 (85)	58/154 (38) ^a	4/58 (7)

Madurados: ovocitos en metafase II + primer cuerpo polar (maduros); **Ovocitos fertilizados monospermicos:** presencia de dos pronúcleos (femenino y masculino); **Ovocitos fertilizados polispermicos:** presencia de mas de dos pronúcleos.

^a indica diferencia significativa con respecto al testigo. (p < 0.05)

CUADRO 6. Efecto de diversas concentraciones de malatión en el medio de fertilización durante la coincubación de los gametos.

Concentración (μM)	Ovocitos con PN/ovocitos inseminados (%)									
	Ensayos									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	9/12 (75)	11/13 (85)	6/25 (24)	9/16 (56)	26/39 (67)	17/44 (39)	13/43 (30)	25/39 (64)	33/46 (72)	26/34 (76)
50	9/14 (64)	11/14 (79)	5/23 (22)	2/16 (75)	23/38 (61)	14/41 (34)	—	—	—	—
100	10/19 (53)	8/14 (57)	4/22 (18)	7/17 (41)	25/43 (58)	14/42 (33)	—	—	—	—
500	5/16 (31)	8/24 (33)	2/25 (8)	1/16 (6)	16/41 (39)	8/44 (18)	—	—	—	—
750	3/47 (6)	8/36 (22)	29/46 (63)	19/32 (59)	—	—	—	—	—	—
1000	4/42 (10)	16/31 (51)	25/51 (49)	13/30 (43)	—	—	—	—	—	—

— No determinado.

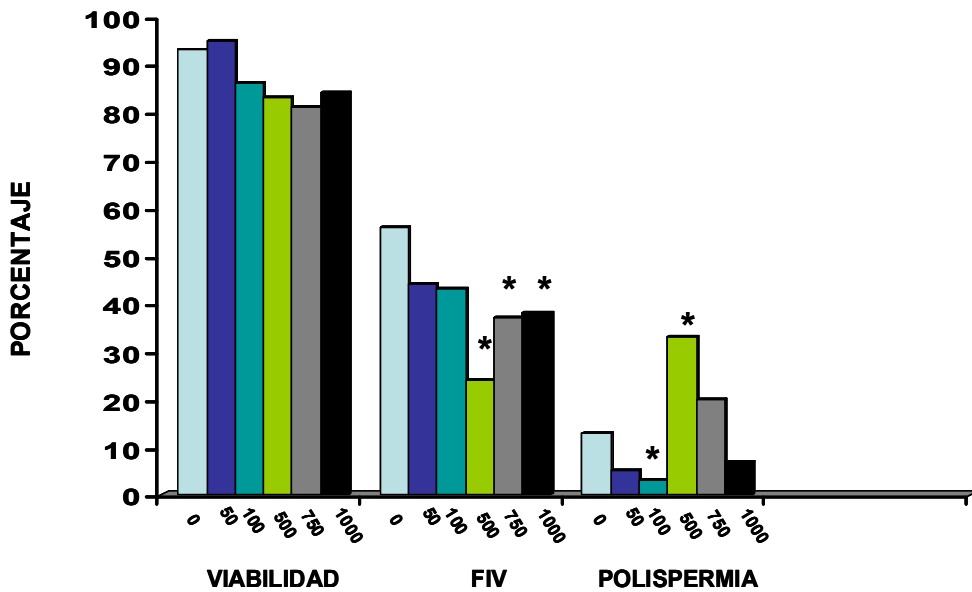


FIGURA 4. Efecto de las concentraciones (μM) de malatión en el medio de fertilización durante la coincubación de los gametos. Se analizaron los porcentajes promedio de la viabilidad, fertilización y polispermia. La prueba de Spearman señaló que no hubo correlación entre las concentraciones del insecticida con la viabilidad y fertilización polispermia.

* Diferencia significativa con respecto al control ($p > 0.05$).

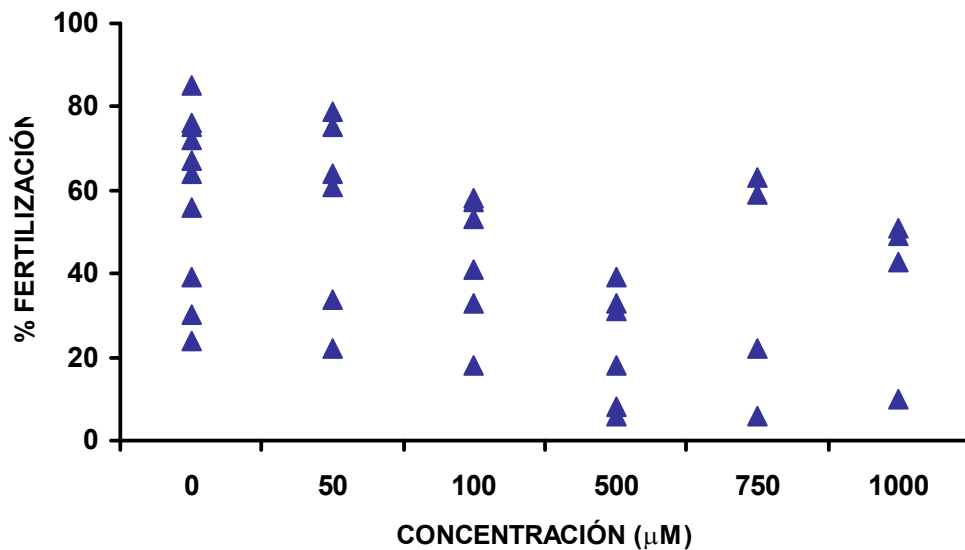


FIGURA 5. Efecto del malatión en la fertilización de ovocitos inseminados. Cada punto representa el porcentaje de cada ensayo para las concentraciones 0, 50, 100, 500, 750 y 1000 μM . La prueba de Spearman señala que no hay correlación entre las concentraciones del insecticida con la viabilidad de los ovocitos ($r = -0.47$; $p < 0.05$).

8. DISCUSIÓN

Una alta proporción de las poblaciones de todas las especies, incluyendo la humana, están expuestas a diversos contaminantes que se encuentran en el aire, el agua y los alimentos, como son los insecticidas OC, OF y los carbamatos, de uso mundial (Ferrer, 2003). La exposición a éstos puede causar daños a los sistemas digestivo, inmune, nervioso, así como al urinario-reproductivo; en este último caso se ha demostrado que ocasiona infertilidad, abortos y malformaciones físicas de los productos (Cavieres, 2004; Kalender *et al*, 2005).

En el presente trabajo se analizó el efecto de dos de los insecticidas OF más extensamente utilizados en zonas agrícolas y domésticas (EPA, 1988), sobre los procesos de viabilidad y fertilización de los gametos porcinos.

La mayor parte de los experimentos *in vivo* para analizar el efecto deletéreo de los insecticidas OF se han llevado a cabo en roedores, sin embargo el efecto es sistémico y no se puede determinar el daño a nivel celular; por tal motivo, los estudios *in vitro* constituyen una alternativa importante ya que permiten estimar los cambios que presentan los procesos celulares, tales como la fertilización y el desarrollo del cigoto (Berger y Horner, 2003). Para evaluar el efecto de los insecticidas sobre la fertilización y la viabilidad del ovocito fertilizado se utilizó la técnica de FIV, la cual proporciona información del efecto toxicológico de los insecticidas OF coincubados con los gametos durante la fertilización. Una ventaja de la FIV de ovocitos porcinos es que se pueden obtener un gran número de ovocitos, cigotos y embriones (Polejaeva, 2000), además de que la fisiología endocrina y reproductiva del cerdo es similar a la del humano (Petters, 1994; Campagna *et al*, 2002).

Las concentraciones de los insecticidas utilizados se basaron en reportes previos en los que se evaluó su efecto sobre la maduración de ovocitos (Casas *et al*, 2004) y en estudios *in vitro* sobre la movilidad de espermatozoides porcinos (Betancourt *et al*, 2006).

8.1 EFECTO DEL DIAZINÓN SOBRE LA VIABILIDAD, FERTILIZACIÓN IN VITRO Y POLISPERMIA.

En este estudio se observó que la incubación por 7 h con el insecticida OF diazinón, no produjo daño en la viabilidad de los ovocitos porcinos en las concentraciones analizadas (0 a 500 μM). Estos resultados difieren con lo reportado por Casas *et al* (2004) quienes observaron que el diazinón, adicionado al medio de maduración por 44 h y en concentraciones de 25 hasta 100 μM , disminuyó drásticamente la viabilidad de los ovocitos porcinos. Comparando los tiempos de incubación de las células con el diazinón se puede señalar que en el presente trabajo se empleó un tiempo de exposición corto (7 h), debido a que es el período necesario para que se realice la interacción entre gametos, con lo cual se puede explicar la falta de efecto deletéreo del insecticida sobre la viabilidad de los ovocitos, inclusive a concentraciones 5 veces mayores a las reportadas.

Contrario al efecto del diazinón sobre la viabilidad de los ovocitos porcinos, la acción de este insecticida, medido por el porcentaje de formación de pronúcleos, causó una disminución en la fertilización a partir de la concentración de 100 μM con respecto al control. Estos resultados pueden asociarse con los reportes previos de ensayos realizados en espermatozoides de cerdo incubados *in vitro* con diazinón por una hora, donde se observó la reducción del 30% de viabilidad con respecto al control, la movilidad disminuyó drásticamente y la movilidad progresiva disminuyó 91% en la concentración de 500 μM (Betancourt *et al*, 2006; 2006). Estos estudios preliminares de nuestro laboratorio han señalado que los insecticidas OF pueden modificar la capacidad fertilizante de los espermatozoides, probablemente afectando los procesos de capacitación, de reacción acrosomal o ambos. Por lo tanto, el efecto del diazinón sobre la

disminución de la FIV puede ser debida al daño del espermatozoide, más que sobre el ovocito o sobre la interacción entre ambos.

En estudios *in vivo*, Piña-Guzmán *et al* (2005) demostraron que el diazinón, utilizando una sola dosis de 8.125 mg/Kg de peso corporal, daña la integridad y la condensación de la cromatina de los espermatozoides de ratón, afectando también su concentración, viabilidad, movilidad y morfología.

En el presente estudio se determinó que la concentración sin efecto adverso observable (NOAEL) del diazinón para la fertilización fue de 50 μ M, en tanto que la 100 μ M representó la concentración mínima de efecto adverso observable (LOAEL) (Calabrese, 2004; Rodricks, 2003).

Aunque se desconocen los mecanismos de acción del diazinón en otros modelos *in vitro*, Sheffield y Lochmiller (2001) demostraron, a través de estudios *in vivo* e *in situ* realizados en comunidades de roedores que habitaban en campos experimentales rociados con altas concentraciones de diazinón (4.5 Kg/hectárea, equivalente a 8 veces la concentración empleada en zonas agrícolas), que después de 30 días de exposición disminuyó considerablemente el número de hembras preñadas y de nacimientos, lo que sugiere que el diazinón afectó drásticamente la reproducción de estos roedores.

Una explicación del efecto tóxico del diazinón en los roedores es que este insecticida OF es metabolizado y convertido en diazoxón, metabolito tóxico formado por la conversión de P=S a P=O, cuando el diazinón es absorbido por el tracto intestinal y metabolizado en pocas horas en el hígado (Cremllyn, 1986). En estudios *in vitro* no ocurre la transformación del diazinón; sin embargo, este insecticida OF sin transformarse en diazoxón también puede ser tóxico sobre el sistema reproductor.

El diazinón se ha clasificado como agente mutagénico y teratogénico al administrarse por vía intraperitoneal. En análisis citogenéticos, se observó que las

concentraciones de 43 y 54 mg/Kg de diazinón ocasionaron reducción en el índice mitótico de las células de la médula ósea de ratones adultos. Por otro lado, en estudios de los efectos teratogénicos, donde se administraron las concentraciones de 25 y 50 mg/Kg de diazinón a ratas hembras preñadas y se analizaron los efectos sobre los embriones de 9 y 11 días de gestación, se observó aumento en la frecuencia de reabsorciones embrionarias, disminución del peso corporal de las crías y malformaciones en el esqueleto del feto, pero no se observaron cambios en el número de implantaciones (Altamirano-Lozano *et al*, 1989). También se ha demostrado que al administrar por vía oral 300 mg/Kg del mismo insecticida, los ratones presentaron cambios patológicos en bazo, timo y hepatocitos. La administración de 10 mg/Kg de diazinón en ratas produce disminución en la síntesis de proteínas, en particular la albúmina, que es sintetizada por el hígado y puede transportar sustancias químicas tóxicas (Handy *et al*, 2002), así como la alteración de vías metabólicas de los aminoácidos, en ellas la de L-triptofano; (Kalender *et al* 2005)

Con respecto a la polispermia, se observó el fenómeno de hormesis, caracterizado por la estimulación del insecticida a bajas concentraciones (Calabrese, 2002). En este trabajo las concentraciones de 50 y 100 μM de diazinón propiciaron la penetración espermática incrementando la polispermia en un 30% con respecto al testigo y aunque no se observó un efecto de inhibición a la concentración de 100 μM , es probable que al aumentarla se pueda observar el efecto inhibitorio a este proceso.

8.2 EFECTO DEL MALATIÓN SOBRE LA VIABILIDAD, FERTILIZACIÓN IN VITRO Y POLISPERMIA.

En este estudio se observó que el insecticida malatión no produjo daño en la viabilidad de los ovocitos porcinos en las concentraciones utilizadas. Contrario a los resultados obtenidos por Casas *et al* (2004) en donde se observó que el malatión, adicionado al medio de maduración, la viabilidad de los ovocitos disminuyó a partir de la concentración de 50 μM . En este estudio las

concentraciones no tuvieron tal efecto tal vez debido a que el tiempo de exposición de los gametos al insecticida es 6 veces menor al tiempo de incubación con malatión durante la maduración.

Con respecto al efecto de este insecticida sobre la FIV, se observó una disminución en los porcentajes de fertilización a partir de la concentración de 500 μM . Sin embargo efecto inhibitorio no fue proporcional al aumento de la concentración. Esto pudo deberse a la variabilidad intrínseca al modelo de este estudio en el que hay variables que no pueden ser controladas, como la procedencia de los ovarios, la edad de la cerdas, los diferentes sementales de los cuales proviene el eyaculado y la variabilidad de los eyaculados aunque sean de mismo animal (Berger y Parker, 1989).

Para poder explicar el efecto tóxico de este insecticida sobre la fertilización, se ha encontrado en la literatura que en estudios *in vitro* con otro OF, donde los autores demostraron que el paratión y su metabolito el paraoxón afectaron la viabilidad espermática, la condensación de la cromatina y la capacidad fertilizante de los espermatozoides de humanos Contreras *et al*, (1999). Recio *et al*, (2001) observaron el mismo efecto del insecticida en trabajadores agrícolas expuestos a una mezcla de OF, una alta frecuencia de aneuploidías en espermatozoides. La razón de la disminución en el porcentaje de la fertilización en este trabajo probablemente se debió a las alteraciones en la adhesión del espermatozoide a la zona pelúcida, la reacción acrosomal, la fusión del ovocito-espermatozoide, la activación del ovocito, y la descondensación del pronúcleo masculino (Campagna *et al*, 2002; Hamlin *et al*, 1993; Kholkute, *et al*, 1994a; Berger y Horner, 2003

En el presente trabajo se determinó que la concentración sin efecto adverso observable (NOAEL) del malatión para la fertilización fue de 100 μM en tanto que la concentración de 500 μM representó la concentración mínima de efecto adverso observable LOAEL.

En otros modelos *in vitro*, se ha demostrado que otros insecticidas afectan el índice de fertilización. Al utilizar Aroclor 1254, un insecticida bifenil policlorado (PCB), se observó una disminución significativa en la fertilización de ovocitos de ratón en concentraciones de 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$ (Krogenaes *et al*, 1998). También se ha demostrado que al emplear Arclor 1221, 1254 y 1268 o 3,3',4,4'-tetrachlorobifenilo en ovocitos de murinos en concentraciones de 0.01, 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$ se alteró el porcentaje de fertilización (Krogenaes *et al*, 1998; Kholkute, *et al*, 1994a). La razón de la disminución en el porcentaje de la fertilización se debió a la alteración en la adhesión del espermatozoide a la zona pelúcida, la reacción acrosomal, la fusión del ovocito-espermatozoide, la activación del ovocito, y la descondensación del pronúcleo masculino. (Campagna *et al*, 2002; Hamlin *et al*, 1993; Kholkute, *et al*, 1994a; Berger y Horner, 2003). En el presente trabajo no se descarta la posibilidad que el malatión siga el mismo mecanismo de acción que los plaguicidas anteriores afectando ambos gametos, la capacidad de penetración del espermatozoide y/o la formación de los pronúcleos.

En trabajos *in vivo* se ha encontrado que el malatión, al aplicarse por vía peritoneal en dosis única (250 mg/Kg) durante 26 días, produce daños en las células germinales y de Sertoli, efectos teratogénicos en la diferenciación de las espermátidas, sobre todo en el flagelo y terazoospermia. Esto se debe al efecto alquilante que daña la unión de los componentes estructurales de las proteínas de la cola del espermatozoide y la proliferación de las células germinales en tubos seminíferos (Contreras *et al*, 1999).

Se ha reportado en estudios *in vitro*, que los insecticidas OC alteran los procesos de exocitosis, dispersión de los GC y la reacción de zona. También se ha demostrado que los PBC afectan la permeabilidad de la membrana o alteran la homeostasis del Ca^{+2} en células somáticas. En la fertilización, el Ca^{+2} es esencial durante la fusión ovocito-espermatozoide (Hamlin *et al*, 1993; Kholkute, *et al*, 1994b), la capacitación del espermatozoide, la reacción acrosomal y la fertilización (Campagna *et al*, 2002). Durante la fertilización, la penetración del espermatozoide en el ovocito induce la exocitosis de los GC (reacción cortical),

cuyo exudado contiene enzimas que remueven los receptores de la ZP produciendo la reacción de zona y evitando la entrada de más espermatozoides (polispermia), asegurando la fertilización monospermica a nivel de la ZP y de la membrana plasmática en los mamíferos (Ducibella, 1996; Wang *et al*, 1997, 2003).

En este presente estudio, la concentración de 50 μM de malatión tuvo una tendencia a disminuir a la polispermia y la concentración de 100 μM la redujo significativamente, en tanto que la concentración de 500 μM la aumentó. Esto puede ser debido al efecto de hormesis descrito anteriormente, pero inverso al observado con el diazinón que produjo un incremento de este fenómeno con concentraciones bajas.

Los OF son moléculas hidrofóbicas y lipofílicas que pueden favorecer la incorporación de los insecticidas a la membrana plasmática especialmente en la bicapa lipídica. Videira *et al* (2001), Kalender *et al* (2005); Kamarianos *et al* (2003) realizaron estudios de fluorescencia anisotrópica utilizando los insecticidas malatión, metilparatión y paratión indicando que los efectos *in vivo* de estos tóxicos con los compuestos lipídicos de la membrana pueden alterar las propiedades fisicoquímicas, como la estructura y organización de la membrana permitiendo fácilmente el paso de los tóxicos a la célula. Los lípidos son probablemente más susceptibles a los radicales acelerando la lípoperoxidación de la membrana celular. En ratas los OF causan un aumento de los niveles de colesterol y lípidos (Kalender *et al*, 2005), en humanos hay una disminución del colesterol total (Vidyasagar *et al*, 2004).

Los diversos usos y volúmenes de producción tan altos de los insecticidas OF representan un riesgo para la salud humana. Los efectos deletéreos de estos insecticidas pueden alterar la homeostasis del organismo inhibiendo a la enzima acetilcolinesterasa, el compuesto se une a la colinesterasa alterando la hidrólisis de la acetilcolina a colina y ácido acético ocasionando la acumulación de la acetilcolina en las hendeduras sinápticas en las diferentes regiones del sistema

nervioso central y periférico. Además del daño neurológico, estos insecticidas producen efecto deletéreo sobre el sistema reproductor. En nuestro país se utilizan 3.5 millones de toneladas de plaguicidas en las zonas agrícolas (EPA, 2003) por lo que requieren realizar estudios de los efectos que estas prácticas puedan representar sobre la salud humana y la biodiversidad.

9. CONCLUSIONES

- 1 Se observó que el insecticida diazinón no tiene efecto sobre la viabilidad de ovocitos fertilizados en el intervalo de concentraciones estudiadas.
- 2 El diazinón disminuyó la fertilización conforme aumentó la concentración de este plaguicida (dosis-dependiente)
- 3 El malatión no tiene efecto toxico sobre la viabilidad de los ovocitos fertilizados.
- 4 Disminuyó el porcentaje de FIV en concentraciones mayores de 500 μ M.

10. PERSPECTIVAS

Debido a que se desconocen los mecanismos de acción de los insecticidas durante la interacción de los gametos *in vitro*, es necesario continuar con este estudio a fin de esclarecer los mecanismos, a nivel celular y molecular, para poder explicar la acción de los plaguicidas OF durante la fertilización.

11. BIBLIOGRAFÍA

Abeydeera, R. L., Wang, W., Prather, R. S., y Day, B. N. (1998). Maturation *in vitro* of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. Biol. Reprod. 58:316-1320.

Abd el-Aziz, M. I., Sahlab, A. M. Abd el-Khalik, M. (1994). Influence of diazinon and deltamethrin on reproductive organs and fertility of male rats. Dtsch Tierarztl Wochenschr 101:230-232.

Adilaxmamma, K., Janardhan, A., y Reddy, K. S. (1994). Monocrotophos: reproductive toxicity in rats. Ind. J. Pharmacol. 26:126-129.

Aldridge, W. N. y Nemery, B. (1979). The toxicological properties of impurities in malatión. Arch. Toxicol. 42:95-106.

Altamirano-Lozano, M., Camacho-Manzanilla, M. Loyola-Álvarez, R., y Roldan-Reyes, E. (1989). Mutagenic and teratogenic effects of diazinon. Rev. Int. Contam. Ambient. 5:49-58.

Altuntas, I., Kilinc, I., Orhan, H., Demirel, R., Koylu, H. y Delibas, N. (2004). The effects of diazinon on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in erythrocytes *in vitro*. Hum. Exp. Toxicol. 23: 9-13.

Austin, C. R. (1982). Fertilización. En: R. AC, Short RV (eds), Células germinales y fertilización. México, D.F.: La Prensa Médica Mexicana. 107-138.

Axelrad, J.C., Howard, C. V., y McLean, W. G. (2002). Interactions between pesticides and components of pesticides formulations in an *in vitro* neurotoxicity. Toxicology. 173:259-268.

Bearden, J. y Fuquay, W. J. (1982). Reproducción animal aplicada. El manual moderno. México. 77-78.

Berger, T. y Horner M. C. (2003). *In vivo* exposure of female rats to toxicants may affect oocyte quality. *Reprod. Toxicol.* 17:273-281.

Berger, T., y Packer, A. (1989). Modification of the zone free hamster ova bioassay of boar sperm fertility and correlaci3n with *in vivo* fertility. *Gamete Res.* 22:385-387.

Betancourt, M., Fierro, R., y Ambriz, D. (1993). *In vitro* fertilization of pig oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 40:1155-1160.

Betancourt, M., Casas, E., Bonilla, E., y Ducolomb, Y. (2003). Maduraci3n de gametos y fertilizaci3n. En: Jim3nez, L. F. Merchant, H. (eds), *Biolog3a Celular y Molecular*. M3xico: Prentice Hall. 679-711.

Betancourt, M., Resendiz, A., Casas, E., y Fierro, R. (2006). 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., y Szyfter, K. (1999). *In vitro* studies on the genotoxicity of the organophosphorus insecticide malathion and its two analogues. *Mut. Res.* 445: 275-283.

Boquest, A.C., Abeydeera, R., Wang, W., y Day, B.N. (1999). Effect of adding reduced glutathione during insemination on the development of porcine embryos *in vitro*. *Theriogenology.* 51:1311-1319.

Brenner, L. (1992). Malathion. *J. Pest. Reform.* 12:4-14.

Cabello, G., Galaz, S., Botella, L., Calaf, G., Pacheco, M., Stockert, J. C., Villanueva, A., Cañete, M., y Juarranz, A. (2003). The pesticide malathion induces alterations in actin cytoskeleton and in cell adhesion of cultures breast carcinoma cells. *Int. J. Onco.* 23:697-704.

Calabrese, E. J. (2004). Hormesis: a revolution in toxicology, risk assessment and medicine. Special Issue. 5:37-40.

Campagna, C., Sirard, M. A., Ayotte, P., y Bailey, J. L. (2001). Impaired maturation, fertilization and embryonic development of porcine oocyte following exposure to an environmentally relevant organochlorine mixture. Biol. Reprod. 65:554-560.

Campagna, C., Guillemette, C., Sirard, M. A., Ayotte, P., y Bailey, J.L. (2002). An environmentally relevant organochlorine mixture impairs sperm function and embryo development in the porcine model. Biol. Reprod. 67:80-87.

Casas, E., Bonilla, E., Altamirano, M., Ducolomb, Y., y Betancourt, M. (2004). Efecto de los herbicidas atrazina y fenoxaprop-etil y los insecticidas malatión y diazinón en la maduración *in vitro* de ovocitos de cerdo. Memorias AIBIR, XXIX Reunión de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción AC, Oaxaca.

Castilla, S. L., y Cravioto, J. (1991). Estadística simplificada. Para la investigación en ciencias de la salud. México. Trillas. 438.

Cavieres, M. F. (2004). Pesticides exposure and reproductive and birth defect. Critical analysis of epidemiological and experimental evidence. Rev. Med. Chile. 132:873-879.

Contreras, H. R., Badilla, J., y Bustos-Obregón, E., (1999). Morphofunctional disturbances of human sperm after incubation with organophosphate pesticides. Biocell. 23:135–141.

Comisión Intersecretarial para el control del Proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas. CICLOPLAFEST (2001). México.

Cranmer, J. S., Avery, D. L., Grady, R. R. Kitay, J. I. (1978). Postnatal endocrine dysfunction resulting from prenatal exposure to carbofuran, diazinon or chlordane. J Environ Pathol Toxicol. 2:357-69.

Cremlyn, R. (1986) Plaguicidas modernos y su acción bioquímica. Editorial Limusa. México. pp 126-128.

Desi, I., Varga, L., y Farkas, I. (1998). Studies of the immunosuppressive effects of organochlorine and organophosphate pesticides in subacute experiments. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 22:115–122.

Ducibella, T. (1996). The cortical reaction and development of activation competence in mammal oocytes. Hum. Reprod. 2: 29-42.

Ducolomb, Y., Gonzalez, G., Casas, E., y Betancourt, M. (2004). Efecto de los herbicidas atrazina y fenoxaprop-etil y los insecticidas malatión y diazinón en la maduración *in vitro* de ovocitos de cerdo. Memorias AIBIR, XXIX Reunión de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción AC, Oaxaca.

Ducolomb, Y., Romo, S., Balcáza, J. A., Rodarte, L. F., Casas, E., Fragoso, G., Sciutto E., y Betancourt, M. (2005). Primeros cerdos nacidos en México a partir de embriones producidos *in vitro*. Téc Pecu Méx. 43:425-432.

Ducolomb, Y. (2005). Estudio de las fracciones proteínicas del fluido folicular porcino en la maduración, fertilización *in vitro* y polispermia en ovocitos de cerdo. Tesis Doctoral. Ciencias Biológicas. UAM.

Environmental Protection Agency (US EPA). 1988. Guidelines for the registration of pesticides products containing malathion as the activate ingredient. USA.

Environmental Protection Agency (US EPA). 1996. Guidelines for reproductive toxicity risk assessment. USA.

Environmental Protection Agency (US EPA). 2000. National Pesticide Information Center. USA.

Environmental Protection Agency (U.S EPA). 2003. Endocrine Disruptor Screening Program Web Site. USA.

Extension Toxicology Network (EXTOXNET). 1993. Pesticides information Profile. Malathion. USA.

Ferrer, A. (2003). Pesticide poisoning. *Anales Sis San Navarra*. 26:155-171.

Freshney, I. R. (1987). Measurement of cytotoxicity and viability En: *Culture of animal cells: A manual of basic technique*. Alan R, Liss,. New York. USA: 250-255.

Garaj-Vrhovac, V., y D. Zeljezic. (2001). Cytogenetic monitoring of croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides. *Toxicology*. 165:153-162.

Hafez, E. (2000). Foliculogénesis, maduración del óvulo y ovulación. En Hafez ESE, Hafez, B (eds). *Reproducción e inseminación artificial en animales*. México: Mc Graw- Hill Interamericana. 70-83.

Hamlin, G. P., Kholkute, S., y Dukelow, W. R. (1993) Toxicology of maternally ingested carbon tetrachloride (CCl₄) on embryonal and fetal development and in vitro fertilization in mice. *Zool. Scien*. 10:111-116.

Han, Y. M., Abeydeera, L. R., Kim, J. W., Moon, J. B., Cabot, R. A., Day, B. N., y Prather, R. S. (1999). Growth retardation of inner cell mass cells in polyspermic porcine embryos produced *in vitro*. *Biol. Reprod*. 60:1110-1113.

Handy, R. D., Abd-El Samei- H. A., Bayomy, M. F., Mahran, A. M., Abdeen, A. M., y El-Elaimy. E. A.(2002) Chronic diazinon exposure: pathologies of spleen, thymus, blood cell, and lymph nodes are modulated by dietary protein or lipid in the mouse. *Toxicology*. 172:13-34.

Hye-Sung, L., Young, K., Yuong, C., y Yong L. (2002). Oxidation of organophosphorus pesticides for the sensitive detection by a cholinesterase-based biosensor. *Chemosphere*. 46:571-576.

Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática. INEGI (2000), Encuesta industrial mensual. México.

Jokanovic, M. (2001). Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology*. 166:139-160.

Kalender, S., Ogutcu, A., Uzunhisarcikli, M., Acikgoz, F., Durak, D., Ulusoy, Y., y Kalender. Y. (2005). Diazinon-induce hepatotoxicity and protective affect of vitamin E on some biochemical indices and ultrastructural changes. *Toxicology*. 211:197-206.

Kamarianos, A., Karamanlis, X., Goulsd, P., Theodosiadou, E., y Smokovitis, A. (2003). The presence of environmental pollutants in the follicular fluid of farm animals (cattle, sheep, goats, and pigs). *Reprod. Toxicol*. 17:185-190

Keim, S. A., y Alavanja M.C. (2001) Pesticide use by persons who reported a high pesticide exposure event in the agricultural health study. *Environ. Res*. 85:256-259.

Kholkute, S., Rodriguez, J., y Dukelow, W. R. (1994a). Reproductive toxicity of aroclor-1254: effects on oocyte, spermatozoa, *in vitro* fertilization, and embryo development in the mouse. *Reprod. Toxicol*. 8:487-493.

Kholkute, S., Rodriguez, J., y Dukelow, W. R. (1994b). The effect of polybrominated biphenyls and perchlorinated terphenyls on *in vitro* fertilization in the mouse. *Arch, Environ. Contam. Toxicol*. 26:208-211

Krogenaes, A., Nafstad, I., Skare, J. U., Farstad, W., y Hafne, A. L. (1998). *In vitro* reproductive toxicity of polychlorinated biphenyl congeners 153 and 126. *Reprod Toxicol*. 12:575-580.

Lopez, F.J., Pitach, E., Egea, S., Beltrán, J., y Hernandez, F. (2001). Gas chromatographic determination of organochlorine and organophosphorus pesticides in human fluids using solid phase microextraction. *Analit. Chim. Acta.* 433:217-226.

Masoud, L., Vijayasathy, C., Fernandez-Cabezudo, M., Petroianu, G., y Saleh, A. M. (2003). Effect of malathion on apoptosis of murine L929 fibroblasts: a possible mechanism for toxicity in low dose exposure. *Toxicology.* 185:89-102.

Morales, C. A., y Rodríguez, N. (2004). El Clorpirifos: posible disruptor endocrino en bovinos de leche. *Rev Col Cienc Pec.* 17:255-266.

Niwa, K. (1993). Effectiveness of *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization techniques in pigs. *J. Reprod. Fertil.* 48:49-59.

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, USA. 171-183.

Palacios-Nava, M. E., Paz-Román, P., Hernández- Robles, S., y Mendoza-Alvarado L. (1999) Sintomatología persistente en trabajadores industrialmente expuestos a plaguicidas organofosforados. *Salud Pública de México.* 41:55-61.

Petters, R. M., y Wells, K. D. (1993). Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 48:61-73.

Petters, R. M. (1994). Transgenic livestock as genetic models of human disease. *Reprod. Fertil. Dev.* 6:643-645

Piña-Guzmán, B. Solís-Heredia, M. J., y Quintanilla-Vega, B. (2005). Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines. *Toxicol. App. Pharma.* 202: 189-198.

Polejaeva I. A (2000). Cloned Pigs Produced by Nuclear Transfer from Adult Somatic Cells. *Nature*. 407:86-90.

Prakash, N., y Venkatesh, U. (1996). Human chorionic gonadotrophin (hcG) protects malathion induced plasma luteinizing hormone and testosterone changes in rats. *Ind. J. Pharma*. 28:257-260.

Prather, R. S. (2004). Nuclear remodeling and reprogramming in transgenic pig production. *Exp Biol Med*. 229:1120–1126.

Rodricks, J. V. (2003). Hormesis and toxicological risk assessment. *Toxicol Scien*. 71:134-136.

Rahman, M. Z., Hossain, Z. Mollah, M. F. A., y Ahmed, G. U. (2002). Effect of diazinón 60 EC on *Anabas testudineus*, *Channa punctatus* and *Barbodes gonionotus*. *NTAFP*. 25:8-12.

Rao, R., y Kaliwal, B. (2002). Monocrotophos induces dysfunction on estrous cycle and follicular development in mice. *Industrial Health*. 40:237-244.

Recio, R., Robbins, W. A., Ocampo-Gómez, G., Borja-Aburto, V., Morán-Martínez, J., Froines, J. R., García Hernández, R. M., y Cebrián, M. E. (2001). Organophosphorous pesticide exposure increases the frequency of sperm sex null aneuploidy. *Environ. Health. Perspec*. 109:31-34.

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

Seth, P. K., Jaffery, F. N., y Khanna, V. K. (2000). Toxicology. *Ind. J. Pharmacol*. 32:134-135.

Sheffield, S. R., y Lochmiller, R. L. (2001). Effects of field exposure to diazinon on small mammals inhabiting a semiclosed prairie grassland ecosystem. I. Ecological and reproductive effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 20:284-296.

Shepard, T. H. (1996). Human teratogenicity. *Adv. Pediatrics.* 33:225-268.

Videira, R. A., Antunes-Madeira, M. C., Lopes, V., y Madeira, V. (2001). Changes induced by malathion, metilparathion and parathion on membrane lipid physicochemical properties correlate with their toxicity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1511:360-368.

Vidyasagar, J., Karunakar. N., Reddy, M. S., Rajnarayana, K., Surender, T., y Krishna, D. R. (2004). Oxidative stress and antioxidant status in acute organophosphorus insecticide poisoning. *Indian. J. Pharmacol.* 36:76-79.

Wang, W., y Niwa, K. (1995). Synergetic effects of epidermal growth factor and gonadotropins on the cytoplasmic maturation of pig oocytes in a serum-free medium. *Zygote.* 3:345-50.

Wang, W., Hosoe, M., Li, R., y Shioya, Y. (1997). Development of the competence of bovine oocytes to release cortical granules and block polyspermy after meiotic maturation. *Develop. Growth. Differ.* 39: 607-615.

Wang, W., Day, B., y Wu, G.M. (2003). How does polyspermy happen in mammalian oocytes? *Microsc. Res. Tech.* 61:335-341.

Wassarman, M. P., Jovine, L., y Litscher, S. E. (2001). A profile of fertilization in mammals. *Nature Cell Biol.* 3:59-64.

Windham, G. C., Titenko-Holland, N., Osorio, A. M., Gettner, S., Reinisch, F., Hass, R., y Smith, M. (1998). Genetic monitoring of malathion-exposed agricultural workers. *Am. J. Ind. Med.* 33:164-174.

Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization. En: Knobil E, Neill JD (eds), The Physiology of Reproduction, Segunda ed. New York: Reven, Ltd. 189-316.

Zinaman, M. J., Clegg, D. E., Brown, C. C., O' Connor, J., y Selevan, S. G. (1996). Estimates of human fertility and pregnancy loss. Fert. Steril. 65:503-509.

ANEXO. MEDIOS DE CULTIVO

MEDIO TL-HEPES-PVA

Para lavado de complejos ovocito células del cúmulo antes del cultivo en medio de maduración.

Componente	PM	mM	g/1000 ml
Na Cl	58.45	114.00	6.6633
KCl	74.55	3.20	0.2386
NaH ₂ PO ₄	120.00	0.34	0.0408
lactato de Na*	112.10	10.00	1.4 ml
MgCl ₂ . 6H ₂ O	203.30	0.50	0.1017
HEPES	238.30	10.00	2.3830
Piruvato de Na	110.00	0.20	0.0220
Sorbitol	182.20	12.00	2.1860
NaHCO ₃	84.00	2.00	0.1680
CaCl ₂ .2H ₂ O**	147.00	2.00	0.2940
Gentamicina			0.0250
Penicilina G			0.0650
PVA			0.1000

* 60% (v/v)

** Agregar al final

Ajustar el pH a 7.3 - 7.4 con Na OH o HCl 1N

Esterilizar por filtración en membranas de 0.22 μm

Almacenar a 4°C y usarlo en un periodo de 2 a 3 semanas.

MEDIO PARA MADURACIÓN IN VITRO LIBRE DE PROTEÍNAS PARA OVOCITOS PORCINOS

TCM 199 Modificado

TCM 199		50 ml
PVA	0.1%	
D-Glucosa	3.05 mM	0.5496 g/l
Piruvato de sodio	0.91 mM	0.1 g/l
Penicilina		75 µg/ml
Estreptomicina		50 µg/ml

El medio se suplementa con:

EGF	10 ng/ml
Cisteína	0.57 mM
LH	0.5 µg/ml
FSH	0.5 µg/ml

PREPARACION DE LAS HORMONAS LH Y FSH

LH (Sigma L 5269) 50 $\mu\text{g/ml}$. X 100

FSH (Sigma F-2293) 50 $\mu\text{g/ml}$. X 100

Pesar 0.005 g de la hormona y disolver en 10 ml de medio.

Tomar 1 ml de esta suspensión y agregar 9 ml de medio (dilución 10 X).

Hacer alícuota de 100 μl .

Conservar a -70°C

PREPARACION DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO (EGF)

EGF (Sigma E 4127) en presentación de un vial con 0.1 mg.

Hacer una dilución con TCM-199 con BSA al 0.1% para tener una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$.

Tomar 10 μl y de esta dilución y llevar a 1000 μl con TCM-199 para obtener una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$.

Hacer alícuotas de 200 μl .

Conservar a -70°C

MEDIO AMORTIGUADO CON TRIS MODIFICADO

MEDIO DE FIV

(Modified Tris-buffered medium, mTBM)

Componente	mM	g/100ml
NaCl	113.1	0.6611
KCl	3.0	0.0224
CaCl ₂ ·2H ₂ O	7.5	0.1102
Tris*	20.0	0.2423
Glucosa	11.0	0.1982
Piruvato de sodio	5.0	0.0550

*TRIS Base libre cristalizada (Fisher)

Almacenar a 4°C y usarlo en un periodo de 2 a 3 semanas.

SUPLEMENTOS DEL TBMm

TBMm PARA SEMEN FRESCO

Tomar 20 ml de TBMm

Suplementar con BSA al 0.4% (Sigma 7888) y 2.5 mM de cafeína (Sigma 4144).

(0.0098g de cafeína anhidra o 0.019g de benzoato de cafeína).

Colocar en un tubo de 50 ml, cubrir con papel aluminio con orificios.

Incubar durante 24 horas.

Esterilizar por filtración y hacer las gotas en cajas de 4 pozos. Incubar 24 horas antes de realizar la FIV.

MEDIO PARA LAVADO DE ESPERMATOZOIDES DPBS

(SOLUCIÓN AMORTIGUADA CON FOSFATOS DE DULBECCO)

DPBS GIBCO BRL (11500-030)

Lot No 1015434

Presentación de 10.6 g es para la preparación de 1l con 0.1g/l de Ca Cl₂.

Para preparar Medio DPBS 1X

Verter el contenido de un sobre en agua desionizada en agitación a 15 - 30°C.

Agregar Ca Cl₂ 0.1 g/l

Añadir 100 µg/ml de penicilina y 75 µg/ml de estreptomina

Filtrar para esterilizar.

Almacenar a 4°C y usarlo en un periodo de 2 a 3 semanas.

Un día antes de de la FIV:

Tomar 50 ml de DPBS

Agregar BSA al 0.1%

Ajustar a pH de 7.2 – 7.4 con Na OH o HCl 1N

Filtrar para esterilizar

Incubar a 39°C hasta su uso

MEDIO NORTH CAROLINA STATE UNIVERSITY (NCSU) 23

COMPONENTE	mM	g/100ml
NaCl	108.73	0.36355
KCl	4.78	0.0365
KH ₂ PO ₄	1.19	0.0162
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.19	0.0293
D-glucosa	5.55	0.1000
Glutamina	1.00	0.0146
Taurina	7.00	0.0876
Hipotaurina	5.00	0.0546
NaHCO ₃	25.07	0.2106
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.70	0.0250
Penicilina G	75 µg/ml	0.0075
Estreptomicina	50 µg/ml	0.0050

Ajustar el pH a 7.2-7.3 y esterilizar por filtración

Almacenar a 4°C y usarlo en un periodo de 2 a 3 semanas.

Cuando se emplea como medio de desarrollo de embriones, suplementar con BSA al 0.4% (Sigma 8022), y esterilizar por filtración antes de hacer las gotas en la caja de 4 pozos.