



**UAEM**

Universidad Autónoma  
del Estado de México



**FACULTAD DE QUÍMICA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**TESIS**

***“EFECTO DE LA EXPOSICIÓN LABORAL A PLAGUICIDAS  
SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA, DAÑO AL ADN Y SU  
ASOCIACIÓN CON LOS POLIMORFISMOS DE GST”***

**PRESENTA:**

**Q.F.B: GRISET MARTÍNEZ LUNA**

**DIRIGIDO POR:**

**Dra. Julieta Castillo Cadena**

**Dr. Jorge Humberto Serment Guerrero**

**Dr. Pedro Rafael Valencia Quintana**

**Toluca, Estado de México, a 31 de enero de 2014**



**UAEM** | Universidad Autónoma  
del Estado de México

3° (EV. DE GRADO)  
OFICIO NO 057/2014

Toluca, México, 21 de enero de 2014

**P. DE MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS  
GRISSET MARTINEZ LUNA  
FACULTAD DE QUIMICA  
P R E S E N T E**

La que suscribe Directora de la Facultad de Química, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de México, comunica a Usted que el Jurado de su Evaluación de Grado estará formado por:

Dra. Eneida del Socorro Camarillo Romero  
**PRESIDENTE**

FIRMA

Dra. Julieta Castillo Cadena  
**SECRETARIO**

Dr. Juan Carlos Sánchez Meza  
**PRIMER VOCAL**

Dr. Jorge Humberto Serment Guerrero  
**SEGUNDO VOCAL**

Dr. Adalberto Emilio Pimentel Peñaloza  
**TERCER VOCAL**

M. en S. P. Sergio Humberto Pavón Romero  
**SUPLENTE**

M. en C. Gabriela Alejandra Quintero Vásquez  
**SUPLENTE**

**ATENTAMENTE**  
**PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO**  
**"2014, 70 Aniversario de la Autonomía de la UAEM"**

*Antimarcia*  
M. en A.P. GUADALUPE OFELIA SANTAMARÍA GONZÁLEZ  
**DIRECTORA**



c.c.p. Archivo

[www.uaemex.mx](http://www.uaemex.mx)

Facultad de Química • Paseo Colón Esq. Paseo Tollocan • Toluca Estado de México  
Tel. y Fax: 217-5109 y 217-3890 • [fquim@uaemex.mx](mailto:fquim@uaemex.mx)



“LAS GRANDES COSAS SE HACEN POR UNA SERIE  
DE PEQUEÑAS COSAS REUNIDAS JUNTAS.”

VINCENT VAN GOGH



El presente proyecto pertenece a la línea de investigación “Evaluación farmacológica y toxicológica de sustancias y su aplicación”, del Cuerpo Académico de Toxicología y Farmacología de la UAEM.

El análisis de las espermátobioscopías y la detección de polimorfismos se realizaron en el laboratorio de Genética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México. El desarrollo de la técnica de ensayo cometa en espermatozoides y su aplicación en el Departamento de Biología del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ).

Se contó con el apoyo de la beca CONACYT, número de registro 413531. Este proyecto fue parcialmente financiado por la UAEM vía el convenio número 3452/2013CHT.

Este trabajo fue aceptado ante la Comisión Académica del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, en su sesión del día 10 de enero de 2012, con el título “Efecto de la exposición laboral a plaguicidas sobre la calidad espermática, daño al ADN y su asociación con los polimorfismos de GST” con el número de registro MC/06/2011.

El proyecto se inscribió ante la Secretaría de Investigación y Estudios Avanzados, bajo el número de registro MACSQS-2212, el 29 de agosto de 2012.



## DEDICATORIAS

### ***A mis padres y hermanos:***

*Que me han enseñado a soñar y a poner los pies sobre la tierra cuando es necesario; a saber que ninguna meta es imposible cuando se persigue con el corazón en la mano y la convicción de que todo en este mundo es posible con dedicación, esfuerzo y paciencia.*

*A mis padres José Antonio y Sara y a mis hermanos Miguel Ángel y Armando Antonio, gracias por su generosidad y apoyo, por entender mi ausencia, mis malos momentos, los planes cancelados por la carga de trabajo, en general el poco tiempo dedicado a ustedes por cualquier actividad involucrada en este proceso.*

*Deseo expresarles mi más grande y profundo agradecimiento por todo ese amor que ha hecho de mí una persona capaz de triunfar en la vida.*

*Sabiendo que jamás existirán palabras capaces de retribuirles toda una vida de lucha, sacrificio y esfuerzo constante, solo quiero que sientan que el objetivo logrado también es suyo, y que la fuerza que me ayudó a conseguirlo fue su incondicional apoyo sin el cual habría sido imposible alcanzarlo.*

### ***A mis amigos:***

*Por enseñarme que no todo era escuela, también podíamos salirnos de parranda aunque fuera entre semana y tengamos que trabajar al día siguiente, por ser mis cómplices en esta gran aventura llamada Maestría.*

*Agradezco a Dios el poner en mi camino personas tan maravillosas e invaluable que desde hace mucho o poco tiempo he conocido, cada una de las cuales me ha apoyado incondicionalmente en cada etapa de mi vida.*

*Gracias por ayudarme a desplegar mis alas.*

*En general: a todos ustedes que han sido una parte irremplazable de mi vida les dedico este logro y gran sueño que siempre anhelé: Yuri, Vane, Lupita, Emi, Marlen, Rafa, Zuly, Denny, Elvira, Vivis, Liz.*

*Gracias por todo su apoyo.*

*Grace*



## AGRADECIEMIENTOS

Gracias a todas las personas que directa o indirectamente colaboraron para la realización académica de éste proyecto, trataré de no omitir ninguna:

A la Dra. Julieta Castillo, por todo su apoyo y cuidado durante esta aventura del Posgrado, porque sin ella no hubiera podido culminar esta gran empresa, por dirigir este proyecto, por todas sus enseñanzas, detalles, anécdotas y todo el tiempo que invirtió en mí.

Al Dr. Jorge Serment, por la co-dirección de la investigación, por su paciencia, por su disponibilidad, por su apoyo y ser siempre tan gentil. Por todas las enseñanzas, tiempo, recursos, riesgos y apoyo incondicional corridos al intentar una técnica que no sabíamos si iba funcionar o cuánto tiempo tomaría para implementarla.

A los Drs. Juan Carlos Sánchez Meza, Eneida Camarillo Romero, Emilio Pimentel y los M.C. Sergio Pavón y Gabriela Quintero, por las atinadas y valiosas aportaciones al proyecto.

Al Lic. Juan José Millán, y a los Drs. Leobardo Gómez y Rubí Romero del Posgrado por sus atenciones y disponibilidad.

A las personas que accedieron a participar como voluntarios del grupo no expuesto de este estudio.

A los floricultores de Villa Guerrero que me permitieron entrar en sus invernaderos y respondieron favorablemente a la implementación de este proyecto de investigación.

A Lupita y Fernando por su ayuda y apoyo para procesar las muestras de genotipificación.



A Viridiana, Elvira, Elizabeth y Salvador, por introducirme en la técnica de ensayo cometa, por su compañerismo, ayuda y sobre todo la amistad que me brindaron desde el primer día que entre al ININ.

A CONACYT por el apoyo económico que me brindó a través de la beca de Posgrado.

A todos y cada uno que en forma no intencionada escapan en este momento a mi memoria, pero que sin nombrarlos ahí están.

A la vida por permitirme llegar hasta aquí, pues sin ella nada de esto sería posible.



## Índice

Índice de tablas .....	7
Índice de figuras.....	8
RESUMEN .....	9
ABSTRACT.....	10
INTRODUCCIÓN .....	11
MARCO TEÓRICO.....	13
I. Plaguicidas .....	13
I. 1. Clasificación de los plaguicidas .....	15
I.2. Propiedades fisicoquímicas de los plaguicidas .....	27
I.3. Vías de ingreso de los plaguicidas al organismo.....	30
I.4. Riesgo en el manejo de plaguicidas y su uso en México .....	32
I.5. Plaguicidas y su efecto sobre la calidad espermática .....	33
I.6. Daño al ADN por plaguicidas.....	34
I.7. Biomarcadores .....	35
I.7.1. Ensayo cometa.....	38
I.8. Genes de susceptibilidad.....	40
I.8.1. Glutathion S-Transferasa (GST) .....	41
I.9. Espermatobioscopía .....	44
I.10. Villa Guerrero, Estado de México .....	45
JUSTIFICACIÓN .....	51
HIPÓTESIS.....	51
OBJETIVOS .....	51
II. METODOLOGÍA .....	53





Análisis estadístico.....	54
III. RESULTADOS.....	63
Resultados a publicar: Artículo científico.....	63
Resultados no publicados.....	80
IV. DISCUSION DE RESULTADOS.....	96
V. CONCLUSIONES .....	102
REFERENCIAS.....	104
ANEXOS .....	112
A: Control de calidad de las espermátobioscopías.....	112
B: Ensayo cometa: Procedimiento de Hauser et al, 2007 modificado en la presente investigación.....	117
C: Genotipificación .....	123
D: Hoja de consentimiento informado .....	126
E: Cuestionario.....	128
F: Presentaciones en congresos .....	130
G: Artículo de divulgación.....	133



## Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas de acuerdo al organismo que deseen controlar. ....	16
Tabla 2. Clasificación de los plaguicidas según su persistencia en el ambiente.....	16
Tabla 3. Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad aguda. ....	18
Tabla 4. Clasificación de los plaguicidas según los efectos tóxicos que producen. ....	19
Tabla 5. Clasificación de los plaguicidas según el grupo químico del principio activo. ....	19
Tabla 6. Características de algunos plaguicidas. ....	30
Tabla 7. Plagas que afectan a los cultivos y plaguicidas empleados. ....	32
Tabla 8. Tipos de movilidad espermática y sus características. ....	56
Tabla 9. Secuencia de los iniciadores de los genes GSTT1, GSTM1 y CYP1A1.....	60
Tabla 10. Reactivos empleados por muestra en la mezcla de amplificación.....	60
Tabla 11. Edad de los individuos de los grupos en estudio. ....	80
Tabla 12. Nivel de escolaridad de los grupos expuesto y no expuesto.....	81
Tabla 13. Actividad laboral del grupo expuesto. ....	81
Tabla 14. Plaguicidas empleados por los floricultores. ....	82
Tabla 15. Uso del equipo de protección por los floricultores. ....	83
Tabla 16. Actividad laboral del grupo no expuesto. ....	83
Tabla 17. Lugar de residencia del grupo expuesto. ....	84
Tabla 18. Lugar de residencia del grupo no expuesto. ....	84
Tabla 19. Criterios de movilidad. OMS, 2010.....	85
Tabla 20. Análisis estadístico de los resultados del seminograma en los grupos en estudio.....	89
Tabla 21. Análisis estadístico de las anormalidades de los espermatozoides en los grupos en estudio.....	89
Tabla 22. Análisis estadístico del daño al ADN evaluado con el tail moment de ambos grupos. 90	
Tabla 23. Resultados de la exposición in vitro de espermatozoides y linfocitos a los plaguicidas .....	91
Tabla 24. Resultados de los polimorfismos de GSTM1 y GSTT1 en los grupos de estudio.....	93
Tabla 25. Frecuencia de los polimorfismos de los genes GSTT1 y GSTM1 en los grupos en estudio.....	95
Tabla 26. Reactivos empleados por master mix de amplificación.....	124



## Índice de figuras

Figura 1. Ejemplo del tipo de almacenamiento inadecuado de plaguicidas en Villa Guerrero. ....	15
Figura 2. Ejemplos de plaguicidas organoclorados (OC). .....	20
Figura 3. Ejemplos de plaguicidas organofosforados (OF). .....	23
Figura 4. Estructura de los plaguicidas Carbamatos. ....	24
Figura 5. Reacción general de las isoenzimas GST. ....	42
Figura 6. Tipos de anormalidades en la morfología de los espermatozoides: a) espermatozoide normal, b) cabeza aumentada, c) cabeza disminuida, d) doble cabeza, e) doble cola , f) cabeza de alfiler, g) cola larga y h) cuello doble. ....	45
Figura 7. Localización de Villa Guerrero. ....	46
Figura 8. Disposición final de los envases de plaguicidas. ....	48
Figura 9. Secuencia metodológica. ....	55
Figura 10. Cámara de Newbauer. ....	57
Figura 11. Gel de agarosa que muestra las bandas de los genes GSTT1, GSTM1 y CYP1A1. ....	61
Figura 12. Resultados de la extracción de 8 muestras de ADN. ....	92
Figura 13. Resultados de amplificación de genes GSTM1 y T1 de 13 muestras. ....	94
Figura 14. Recuento espermático en la cámara de Newbauer. ....	114
Figura 15. Rango de diferencias que se espera que ocurran en el 95 % de las muestras, causadas por errores en el recuento, por duplicado, de 100, 200 y 400 espermatozoides. ....	116



## RESUMEN

En Villa Guerrero, Estado de México, alrededor del 80% de la población se dedica a la floricultura, aplican plaguicidas todo el año, frecuentemente en forma de mezclas, con el mínimo uso de equipo de protección. Se ha relacionado a la exposición crónica de metomilo, metamidofos, mancozeb, agrimec y furadan, solos o en mezclas, con el aumento de anomalías morfológicas específicas en espermatozoides, tales como un menor conteo espermático por eyaculado y la reducción del porcentaje de viabilidad (1, 2). Por otro lado, los polimorfismos de los genes de susceptibilidad del Glutation S-Transferasa, GSTM1 y GSTT1 participan en la detoxificación y biotransformación xenobióticos, como los plaguicidas (3). Se sabe que los plaguicidas producen daño al ADN en sitios lábiles al álcali (4). Por lo cual, el objetivo de este estudio fue determinar si la exposición laboral a plaguicidas ejerce un efecto sobre la calidad espermática (5), el daño al ADN (6) y su asociación con los polimorfismos de GSTT1 y GSTM1 (7). Es un estudio transversal, comparativo y descriptivo. Consideró la inclusión voluntaria de floricultores de Villa Guerrero, Edo. de México, y varones de la comunidad universitaria, 30 por grupo. Ambos grupos proporcionaron datos generales y laborales. Firmaron una carta de consentimiento informado. El ensayo cometa se hizo con el método de Hauser R, *et al* (2007) modificado. Se tomaron 3 mL de sangre para la genotipificación y semen de ambos grupos para el ensayo cometa y las espermatabioscopías. Los plaguicidas más empleados fueron Lannate, Tamaron, Manzate, Agrimec y Furadán, solos o en mezclas. En el grupo expuesto la frecuencia de nulos fue 57% para GSTM1 y T1; en los no expuestos fue GSTM1 nulo 63 % y 73% para GSTT1 nulo, sin diferencia significativa  $p=0.792$  y  $p=0.279$  respectivamente. Las espermatabioscopías de los floricultores, mostraron disminución en el recuento espermático, en la movilidad y porcentaje de espermatozoides normales y un incremento en las anomalías morfológicas espermáticas con respecto al grupo no expuesto, al parecer la exposición ocupacional a plaguicidas tiene un efecto sobre la calidad espermática. No se encontró daño al ADN en los espermatozoides en ambos grupos. Adicionalmente, se estudió la capacidad de los plaguicidas para inducir daño al ADN, se aplicaron de manera individual y en mezclas: Tamaron (100ppm), Lannate (200ppm) y Manzate (300ppm), directamente sobre espermatozoides y linfocitos. Se encontró un mayor daño en los linfocitos enfrentados *in vitro* a estos químicos en comparación con las células espermáticas.



## ABSTRACT

In Villa Guerrero, Mexico State, about 80 % of the population is engaged in floriculture activities, they apply pesticides all the year round, often as mixtures, with minimal use of protective equipment. The chronic exposure to methomyl, methamidophos, mancozeb, agrimec and furadan, alone or in mixtures has been bound with increasing specific morphological abnormalities in sperm, such as: decreased sperm count per ejaculate and the reduction of viability percentage (1, 2). Alternatively, polymorphisms of susceptibility genes glutathione S-Transferase, GSTM1 and GSTT1 are involved in detoxification and xenobiotic biotransformation, such as pesticides (5). Pesticides are known to produce DNA damage in alkali labile sites (6). The objective of this study was to determine whether occupational exposure to pesticides mixtures causes damage to sperm (7), its association with DNA damage (8) and the GSTM1 and GSTT1 polymorphisms (9). It is a cross-sectional, comparative and descriptive study. It considered the voluntary inclusion of Villa Guerrero's flower workers, and men of the university community, 30 per group. Both groups provided general and employment data. They signed an informational consent letter. The comet assay was done following the Hauser R, et al (2007) modified method. Both groups provided 3 mL of blood for genotyping and a sample of sperm from both groups for the comet assay and spermatobioscopy. The most commonly employed pesticides were Lannate, Tameron, Manzate, Agrimec and Furadan, alone or in mixtures. In the exposed group the null rate for both GSTM1 and T1 was 57%, in the unexposed one, for GSTM1 null was 63 % and for GSTT1 73%, there was no significant difference  $p=0.792$  and  $p=0.279$  respectively. The spermatobioscopy of the flower-growers showed a decreased sperm count, mobility and percentage of normal sperm and increase morphological abnormalities in sperm compared with the unexposed group, apparently occupational exposure to pesticides affects sperm quality. No damage was found in sperm DNA in both groups. Additionally, the ability of pesticides to produce DNA damage was studied. Tameron (100ppm), Lannate (200ppm) and Manzate (300ppm), were applied, individually and in mixtures directly on spermatozoa and lymphocytes. When compared, it was found more damage on the lymphocytes that face these chemicals *in vitro* that the one found in the sperm cells.



## INTRODUCCIÓN

En la actualidad el incremento en el uso de plaguicidas, sustancias que sirven para combatir los parásitos de los cultivos, el ganado, de los animales domésticos, del hombre y su ambiente, ha conseguido aumentar la producción de los alimentos y mejorar la salud humana (8), sin embargo, es importante conocer los riesgos y la toxicidad de estos compuestos, para asegurar que su aplicación se lleve a cabo adecuadamente, reduciendo los daños colaterales a otras especies, cuando se emplean de manera masiva.

Existe una preocupación constante por los efectos nocivos derivados de la utilización de plaguicidas en las actividades agrícolas, ya que, el número de plaguicidas usados en la actualidad es muy elevado y de una diversa de composición química, por lo que los efectos tóxicos y ambientales derivados de su utilización son complejos y diversos (9). Por otro lado, la introducción por el agricultor de nuevas especies más productivas genera desequilibrios ecológicos que tienen como consecuencia la proliferación de plagas debidas a la desaparición de los predadores naturales y como consecuencia el uso de mayor cantidad de plaguicidas, aumentando así el riesgo laboral de exposición en poblaciones de agricultores o floricultores y generando una amplia gama de efectos tóxicos en estas poblaciones en riesgo, tales como la reducción de la calidad espermática por la disminución en el conteo de espermatozoides por eyaculado y la reducción del porcentaje de viabilidad (1, 2). Desde el punto de vista toxicológico se espera en este proyecto que la espermatogénesis sea vulnerable a la exposición a los xenobióticos debido a la gran cantidad de divisiones celulares, así como por los diferentes procesos de maduración de los espermatozoides. De hecho, un gran número de estudios en roedores aportan datos claros de la relación entre las fases del desarrollo de células de esperma y tóxicos específicos (10). La espermatogénesis humana puede ser vulnerable a los agentes químicos tales como plaguicidas a niveles muy bajos de exposición (11).

La industrialización y el uso indiscriminado de plaguicidas han aumentado los riesgos para la salud humana. Estudios epidemiológicos recientes plantean una preocupación por la reproducción masculina debido a la baja calidad del semen y a las cuentas reducidas de espermatozoides viables (12). Existe evidencia de la relación entre la disminución en la calidad



del semen y el aumento en el daño al ADN espermático con la presencia de metabolitos urinarios de insecticidas piretroides (13).

Por otra parte, resultados de diversos análisis han mostrado que el empleo de plaguicidas aumenta el riesgo de generar rupturas en las cadenas sencilla o doble del ADN, demostrado a través del ensayo cometa (4, 13). Asimismo, los polimorfismos de los genes de susceptibilidad de la familia de la glutatión S-transferasa (GST), de acuerdo a la capacidad que da su ausencia o presencia (GSTT1 y GSTM1), pueden participar en la detoxificación y biotransformación de muchos xenobióticos, tales como los plaguicidas, al incrementar su solubilidad y facilitar su excreción del organismo (3).

Para dilucidar la relación exacta de la exposición laboral a plaguicidas con los daños a la salud se requiere abandonar los modelos de investigación disciplinaria e *in vitro*, y empezar la vinculación de varias disciplinas que permitan conocer el problema en forma integral. Por lo que este trabajo pretende aportar información para vincular la exposición laboral con la calidad espermática, el daño al ADN y su correlación con la presencia o ausencia de los polimorfismos de GST en los individuos en estudio.



## MARCO TEÓRICO

### *I. Plaguicidas*

Una de las principales preocupaciones del hombre es el control de organismos cuyo aumento en sus poblaciones causa serios problemas, como la destrucción de cultivos de diversa índole y la producción o transmisión de enfermedades, entre otros. Los plaguicidas han sido uno de los principales recursos utilizados para el control de algunos de estos organismos (14).

Desde los antiguos sumerios, quienes utilizaban el azufre para combatir plagas agrícolas y los chinos quienes 3000 años a. C. utilizaban sustancias derivadas de las plantas como insecticidas (15), el uso de este tipo de sustancias se ha extendido de manera notable. Sin embargo, fue posterior a la segunda guerra mundial cuando el uso de insecticidas orgánicos creció de manera notable, los cuales fueron utilizados en el control y combate de insectos vectores de enfermedades humanas, sobre todo en áreas tropicales. Su éxito motivó su uso y aplicación con fines agrícolas.

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) en el artículo 2° del *Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas*, define a los plaguicidas como cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales, que causen perjuicios o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y sus derivados o alimentos para animales o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. La utilización de los plaguicidas ha conseguido aumentar la producción de alimentos y mejorar la salud humana (16, 17).

En México, la mayor parte de los estudios sobre los efectos de los plaguicidas en la salud se han enfocado en las exposiciones agudas. Pero el conocimiento sobre los efectos crónicos de estas sustancias es muy limitado, aún en el ámbito internacional (18).





El mercado de estos productos en nuestro país ha registrado un constante aumento: en 1960 se vendían 14 mil toneladas; en 1972, 22 mil; en 1983, 34 mil y en 1986, alrededor de 60 mil (19). Es indudable que a partir del TLC las tendencias del alto consumo se deben a que se comercializan sin impuestos ni restricciones arancelarias entre los tres países firmantes (20).

La aplicación intensiva de plaguicidas sintéticos se inició en el país hacia 1948, con la introducción del DDT y, posteriormente, de otros plaguicidas organoclorados. Después se agregaron diversos organofosforados, carbamatos y una gran variedad de herbicidas y fungicidas, todo lo cual estuvo relacionado con la llegada de la Revolución Verde (21).

Estos compuestos, los cuales pueden tener diferentes grados de toxicidad y de persistencia, son de origen sintético o natural (22).

Los plaguicidas sintéticos han contribuido sustancialmente al mejoramiento de la productividad agrícola en el mundo. Paralelamente, su uso ha tenido efectos adversos que incluyen el deterioro ecológico y el daño a la salud humana. Debido a las ventajas que ofrece el uso de plaguicidas, su uso se ha generalizado a nivel mundial, penetrando en los mercados de productos agroquímicos (18).

Durante el siglo pasado se produjo gran variedad de plaguicidas. Se han comercializado más de un millar de estos compuestos, con el fin de controlar plagas (23). En el caso de la agricultura no se puede evitar su uso sin causar escasez de alimentos (24). En México durante 2008 se comercializaron 93 mil toneladas de plaguicidas para uso agrícola de los cuales 22 mil toneladas fueron insecticidas, 40 mil toneladas fueron fungicidas y 31 mil toneladas herbicidas (25), todos ellos con un potencial altamente tóxico para la salud humana y animal (16).



Figura 1. Ejemplo del tipo de almacenamiento inadecuado de plaguicidas en Villa Guerrero.

Algunos plaguicidas son muy tóxicos para el hombre. En México se usan 14 (60%) de los 22 plaguicidas que son considerados como perjudiciales para la salud y el medio (27). De ellos, 10 se fabrican en el país. De 90 plaguicidas que han sido cancelados o restringido en los Estados Unidos, 30 se siguen usando en México (26).

En los últimos años se ha visto la necesidad de evaluar la exposición ambiental y laboral a agentes tóxicos como los plaguicidas, así como el efecto que pueden tener sobre la salud con énfasis en la calidad espermática (27). Debido a su alta actividad biológica y en algunos casos de su persistencia en el ambiente, el uso de plaguicidas puede causar efectos adversos a la salud humana (28, 29).

### ***1.1. Clasificación de los plaguicidas***

Debido a la amplia gama de sustancias o combinaciones de compuestos empleadas en la elaboración de plaguicidas, sus efectos tóxicos a la salud o al ambiente, se han clasificado de la siguiente manera:

1. **De acuerdo al organismo que desean controlar:** Los plaguicidas están dirigidos a mermar el crecimiento de algunos organismos diversos, en la Tabla 1 se muestran algunos ejemplos de los plaguicidas y los organismos que controlan.



Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas de acuerdo al organismo que deseen controlar.

Plaguicida	Organismo que ataca
Insecticidas	Insectos
Fungicidas	Hongos
Herbicidas	Hierbas
Acaricidas	Ácaros
Nematicidas	Nemátodos
Molusquicidas	Moluscos
Avicidas	Aves
Rodenticidas	Ratones
Bactericidas	Bacterias

Maroni, 1999.

2. **De acuerdo a su origen:** A los plaguicidas, como a muchas sustancias o grupos de sustancias, se les puede clasificar en naturales y sintéticos. Algunos ejemplos de los pertenecientes al grupo de los naturales son la nicotina y las piretrinas, mientras que en el caso de los plaguicidas sintéticos podemos mencionar al DDT, Lannate, Tamaron, etc.
3. **Según su persistencia en el ambiente:** Otra forma de clasificar a los plaguicidas es con base en su persistencia en el ambiente, así hay plaguicidas no persistentes, moderadamente persistentes, persistentes y permanentes. En la Tabla 2, se presenta un ejemplo de cada uno de estos grupos y el correspondiente intervalo de vida media. Esta clasificación es útil pero, para estudiar un grupo tan grande y diverso como los plaguicidas – como ocurre con las anteriores clasificaciones- no permite agrupar la información sobre una base concreta y uniforme, ya que cada grupo incluye sustancias de muy diversa naturaleza química y de comportamiento toxicológico y ambiental muy variado (30, 32, 33).

Tabla 2. Clasificación de los plaguicidas según su persistencia en el ambiente.

Clase	Vida media	Ejemplo
No persistentes	0 - 12 semanas	Malation
Moderadamente persistentes	1 - 18 meses	Atrazina 2, 4 D
Persistentes	Menos de 20 años	DDT
Permanentes	Más de 20 años	Arsenicales y mercuriales

WHO, 2009.



4. **Según el grado de toxicidad aguda obtenida por vía oral o dérmica:** La organización Mundial de la Salud (OMS) propone la clasificación en función de su riesgo para la salud, basándose en su comportamiento tóxico en ratas u otros animales de laboratorio administrando por vía oral y dérmica y estimando la dosis letal media ( $LD_{50}$ ) (30).

Esta clasificación ordena de menor a mayor la toxicidad en números del I al IV, siendo extremadamente peligrosos (Ia), altamente peligrosos (Ib), moderadamente peligrosos (II), poco peligrosos (III), normalmente no ofrecen peligro bajo uso normal (IV, a veces no clasificados) (16, 31). La Tabla 3 muestra la clasificación basada en la toxicidad aguda de cada sustancia, en donde se puede apreciar que la vía de entrada es relevante, pues algunos compuestos como el dieldrín con menos de 5 mg/dL vía oral ocasiona la  $DL_{50}$  y se requieren más de 10 mg/dL para tener el mismo efecto si se administra por vía dérmica. También es importante considerar que de acuerdo a la toxicidad del compuesto se requiere diferente cantidad para tener el mismo efecto, por ejemplo con menos de 5mg/dL de compuestos muy tóxicos como el bromuro de metilo se obtiene la  $DL_{50}$ , y se requieren más de 4000 mg/dL de un compuesto clasificado como de “cuidado” como es el malation, para obtener el mismo efecto.



Tabla 3. Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad aguda.

Clasificación de la OMS según los riesgos	DL <sub>50</sub> Aguda en ratas (mg/dL)				Color
	Formulación líquida		Formulación sólida		
	DL <sub>50</sub> Aguda Oral	DL <sub>50</sub> Aguda Dermal	DL <sub>50</sub> Aguda Oral	DL <sub>50</sub> Aguda Dermal	
Clase I a. Extremadamente peligrosos. Ejemplo: Bromuro de Metilo, Paration, Dieldrín	> 20	> 40	< 5	> 10	Muy tóxico
Clase I b. Altamente peligrosos. Ejemplo: Diclorvos	20 - 200	40 - 400	5 - 50	10 - 100	Tóxico
Clase II. Moderadamente peligrosos. Ejemplo: DTT, Clordano	200 - 2000	400 - 4000	50 - 500	100 - 1000	Nocivo
Clase III. Ligeramente peligrosos. Ejemplo: Deltametrina, Malation	2000 - 3000	> 4000	500 - 2000	> 1000	Cuidado
Clase IV Productos que no ofrecen peligro. Ejemplo: Hidrametilnona	> 3000		> 2000		Cuidado

5. **De acuerdo a los efectos tóxicos que producen:** W.F. Almeida clasifica a los plaguicidas según sus efectos tóxicos en inmediatos y mediatos. Los primeros son provocados por una exposición única a compuestos como paration o cianuros los cuales desencadenan una intoxicación aguda, mientras que la exposición repetida a lindano o penicilina genera hipersensibilidad. Los segundos agrupan efectos a mediano y largo plazo, entre los que podemos mencionar al efecto retardado causado por Fosvel, la citotoxicidad de las dioxinas o la intoxicación por metales.



Tabla 4. Clasificación de los plaguicidas según los efectos tóxicos que producen.

Efectos tóxicos	Exposición única	Exposición repetida
Inmediatos	Intoxicación Aguda paration cianuros	Hipersensibilidad lindano penicilina
Mediatos	Efectos Retardados paraquat fosvel	Intoxicación Crónica metales  Efectos Citotóxicos dioxinas

Almeida, 1993.

6. **De acuerdo al grupo químico del principio activo.** Los plaguicidas, como muchos de los compuestos químicos se pueden dividir en diversas familias, dependiendo del grupo químico central de su principio activo, algunas de estas familias son: organofosforados, organoclorados, carbamatos, tiocarbamatos, piretroides, etc. Teniendo al DDT, malation, carbaril, mancozeb, permetrín como algunos ejemplos de cada una de ellas.

Tabla 5. Clasificación de los plaguicidas según el grupo químico del principio activo.

Familia Química	Ejemplos
Organofosforado	DTT, aldrín, endosulfán, endrín
Organoclorado	Bromophos, diclorvos, malation
Carbamato	Carbaril, metomilo, propoxur
Tiocarbamato	Ditiocarbamato, mancozeb, maneb
Piretroides	Cypermethrin, fenvalerato, permetrín
Derivados biperidilos	Cloromequat, diquat, paraquat
Derivados cloronitrofenólicos	DNOC, dinoterb, dinocap
Derivados de triazinas	Atrazina, ametryn, desmetryn, simazine
Compuestos orgánicos del estaño	Cyhexatin, dowco, plictrán
Compuestos inorgánicos	Arsénico, obpa, fosfito de magnesio, arsenato de plomo, bromuro de metilo, antimonio, etc.
Compuestos de origen botánico	Rotenona, nicotina, aceite de canola

CICOPLAFEST, 2002.

Los plaguicidas más empleados son: el benzimidazol, el triazol, los clorados, los piretroides, los organofosforados, la fenilamina, los ditiocarbamatos, el imidazol, los carbámicos, el lannate y la dicarboximida (9).



### Organoclorados (OC).

Desde el punto de vista estructural, constituyen un grupo de sustancias, muy heterogéneo, teniendo en común la presencia de estructuras monocíclicas o policíclicas con distinto número de sustituyentes cloro. Incluyen varios grupos:

- Ciclodienos: Aldrín y su epóxido, el Dieldrín, Mirex
- DDT (dicloro-difenil-tricloroetano): p-p'-DDT, o-p'-DDT, p-p'-Metoxiclor.
- Hexaclorociclohexano (HCH) y Hexaclorobenceno (HCB): HCH,  $\gamma$ -HCH, HCB.
- Indenos clorados: hepatacloro,  $\alpha$ -Clordano.
- Terpenos clorados: Toxafeno (32).

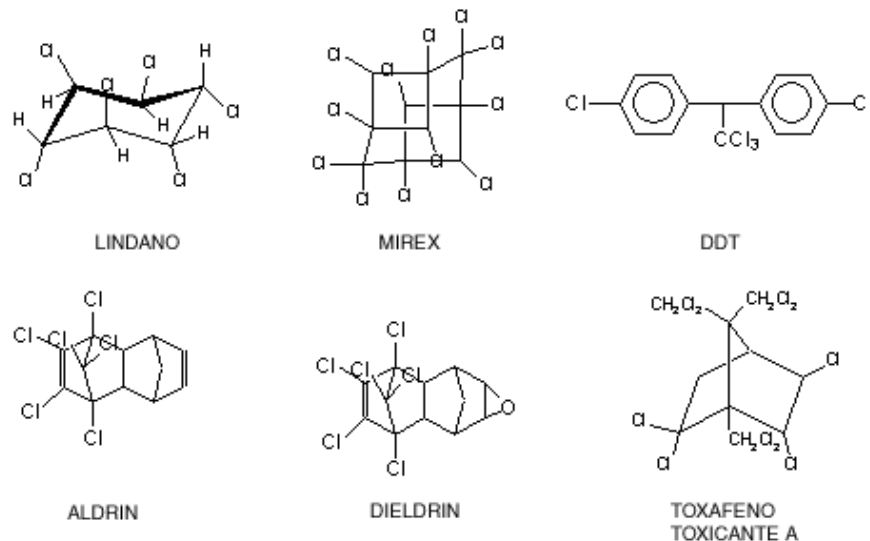


Figura 2. Ejemplos de plaguicidas organoclorados (OC).

**Absorción:** Por vía digestiva principalmente, a través de la piel cuando están en solventes lipídicos y a través de la vía respiratoria por su aplicación en forma de pulverizaciones (32).

**Distribución:** Una vez absorbidos, los plaguicidas organoclorados pasan a la sangre y son distribuidos por todo el organismo, se establece entonces un equilibrio de concentraciones entre los elementos grasos y proteicos constitutivos de la sangre y otros tejidos ricos en grasas, especialmente el tejido adiposo. También se pueden encontrar diferentes concentraciones en el hígado, riñones y otros órganos, dependiendo de la dosis absorbida (9).



**Metabolismo:** Los organoclorados son metabolizados lentamente, mostrando una gran acumulación y persistencia en los tejidos por periodos prolongados (9), por lo que algunos compuestos tales como dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), persisten en el ambiente y en el cuerpo por muchos años debido a su alta solubilidad en lípidos y a su resistencia a desdoblarse. El DDT y otros plaguicidas OC estables han sido detectados en leche materna y en el tejido adiposo de neonatos (33).

**Mecanismo de acción:** Poseen acción neurotrópa, aunque no se conoce bien el mecanismo sobre el sistema nervioso. A largo plazo, inducen las enzimas microsomales hepáticas. Son inductores en cantidades residuales, del orden de las que pueden estar acumuladas en el tejido adiposo.

En el hombre, al igual que en el medio ambiente, se degradan lentamente y se pudo determinar que tienen una gran afinidad por los tejidos grasos. Estas cantidades acumuladas en grasas preocupan, por ejemplo, en el caso de adelgazamiento brusco pasan a la circulación general y producen síntomas de intoxicación.

Preocupa también, porque pasan en cantidades considerables a la grasa de la leche. Los recién nacidos se pueden ir contaminando, debido a los residuos de plaguicidas presentes en su alimento natural (32).

Estudios recientes llevados a cabo en los Estados Unidos, han asociado la presencia de defectos congénitos del corazón en recién nacidos, por la exposición de las madres, antes y durante el embarazo, a herbicidas y rodenticidas (33). Actualmente, gran parte de la población de los Estados Unidos tiene niveles detectables de ciertos plaguicidas en el tejido adiposo (34).

Por otra parte, la exposición a las sustancias tóxicas, entre ellas los plaguicidas, puede causar disfunción inmune en el hombre y en especies de vida silvestre, lo que resulta importante solo si se está expuesto a agentes infecciosos o parásitos. El DDT y el endrín, reducen la habilidad de linfocitos humanos para multiplicarse y madurar hacia células B y células T (35). Adicionalmente, Mills y Yang encontraron que individuos que trabajan en granjas en California expuestos a niveles relativamente altos de organoclorados (lindano y heptacloro) experimentaron





alto riesgo de cáncer de próstata, en comparación con trabajadores expuestos a niveles bajos (36).

Estos compuestos son considerados de alto riesgo por sus efectos subletales a largo plazo, tales como alteraciones reproductivas, disturbios en el desarrollo e inmunológicos y por ser agentes cancerígenos. Así mismo, estos compuestos muestran evidencias de alteraciones endócrinas tanto en animales como en humanos. Esto quiere decir que tienen la habilidad de alterar los balances hormonales normales de los organismos vivos. Durante el desarrollo fetal, esos efectos pueden ser considerables, resultando en desordenes persistentes hasta la edad adulta. La implicación de contaminantes orgánicos persistentes (COP's) en riesgos de cáncer no son claras y resultan diferentes entre los distintos compuestos. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) tiene entre las sustancias reconocidas como cancerígenas al 2,3,4,7,8-pentaclorodibenzofurano, el más tóxico del grupo de los furanos (34).

Dada su persistencia, difusión y acumulación a través de las cadenas tróficas de los organoclorados, se ha señalado que la principal ruta de exposición de la población humana a estos plaguicidas son los alimentos (34).

De acuerdo con análisis de la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) en los 70s, se encontraron residuos de plaguicidas químicos en cerca de la mitad de las miles de muestras examinadas cada año. Cerca del 3% de las muestras contenían niveles que excedían los límites legales tolerados.

En un estudio realizado en el periodo de junio de 1964 a abril de 1966, residuos de plaguicidas organoclorados (DDT, dieldrín, lindano, entre otros) fueron identificados en carne de res, de peces, carne de pollo y otros productos de consumo diario, existiendo una baja aplicación directa en esos productos, lo que indica que fueron contaminados de manera indirecta. Efectos directos en el sistema nervioso y en el sistema hormonal no han sido totalmente demostrados en humanos, pero efectos de ese tipo se han presentado en otros vertebrados (37).



La implementación de acciones para reducir la exposición de esas sustancias, son importantes, en particular para proteger a los sujetos más vulnerables, por ejemplo, mujeres embarazadas, niñeras, y sujetos que viven cerca de fuentes locales de contaminación, entre otros (34).

### Organofosforados (OP).

Son sustancias biodegradables en la naturaleza, sin tendencia a acumularse en las grasas del organismo, pero con gran actividad neurotóxica que va a producir intoxicaciones agudas de gravedad. Son los insecticidas, junto con los carbamatos y piretroides, más ampliamente utilizados en la actualidad.

Sus estructuras químicas derivan de la sustitución por restos orgánicos en el fósforo pentavalente. Pueden clasificarse como:

- Derivados de la molécula del ácido fosfórico. Si los dos primeros oxhidrilos se esterifican con radicales alquílicos se obtienen los alquil-fosfatos o alquil-pirofosfatos, ejemplo: diclorvos. Si dichos oxhidrilos se sustituyen por amidas se obtienen las fosforamidas, ejemplos: metamidofos, acetato.
- Derivados de la molécula del ácido fosfortiónico: De este ácido derivarán a su vez numerosos ésteres tiofosfóricos, ejemplo: paration.
- Derivados del ácido fosfortiolotiónico, ejemplo: malation.
- Derivados del ácido fosfortiólico, ejemplos: malaoxón, demeton-S-metil.

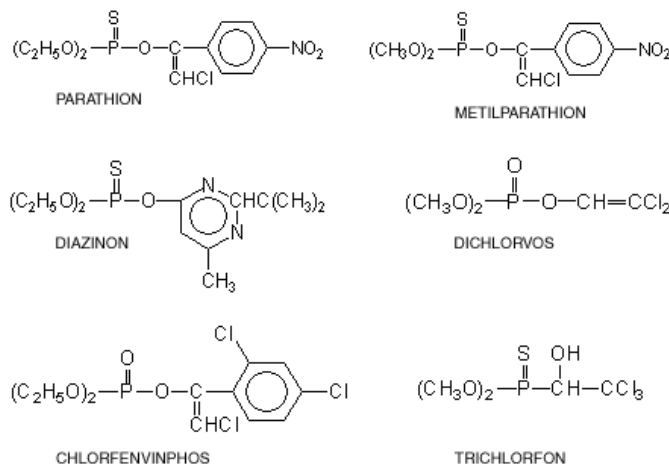


Figura 3. Ejemplos de plaguicidas organofosforados (OF).



**Mecanismo de acción:** Los insecticidas organofosforados actúan combinándose con gran afinidad con cierto tipo de esterasas, con la consecuente inactivación. Esta reacción, en el contexto de la fisiología de sus funciones, es irreversible. Los oxofosforados (enlaces P=O) son fuertes inhibidores, mientras que los tiofosforados (P=S) no son fuertes inhibidores y necesitarán de una biotransformación a la forma oxo para actuar como inhibidores.

En particular, la inhibición de las colinesterasas es la que va a derivar en los síntomas y signos de la intoxicación aguda. El papel fisiológico de la colinesterasa consiste en la hidrólisis de la acetilcolina, mediador químico en la transmisión del impulso nervioso. Se acumulan así grandes cantidades de acetilcolina en las sinapsis.

Existen dos tipos de colinesterasas: la colinesterasa verdadera, presente en eritrocitos y tejido nervioso y la pseudocolinesterasa presente en suero o plasma. Ambas enzimas son inhibidas por los compuestos organofosforados, pero la eritrocitaria es la que mejor refleja el estado de inhibición de la colinesterasa del sistema nervioso, por lo que se utiliza para evaluar el estado de intoxicación aguda de un paciente. Por otro lado, la colinesterasa plasmática o pseudocolinesterasa es la que más tarda en regenerarse, por lo que se utiliza en la evaluación de la exposición crónica a organofosforados.

**Absorción:** Los ésteres fosforados se absorben fácilmente a través de la piel y más rápidamente por vía digestiva. La absorción respiratoria es casi instantánea (38).

### *Carbamatos*

Forman parte de una gran familia de plaguicidas entre los que se hallan herbicidas, fungicidas e insecticidas. Todos ellos derivan del ácido carbámico:

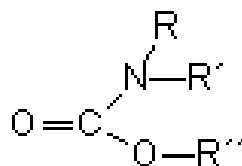


Figura 4. Estructura de los plaguicidas Carbamatos.



Se dividen en tres grupos:

- a) 1-N-metil carbamatos: uno de los hidrógenos del grupo amino es reemplazado por un grupo metilo, ejemplos: Aldicarb, Carbaryl, Carbofuran.
- b) 2-N, N, dimetil Carbamato: ambos hidrógenos del grupo amino son reemplazados por grupos metilos, ejemplos: Isolan, Pirolan.
- c) 3-N-fenil Carbamatos: un grupo fenilo sustituye a uno de los hidrógenos del grupo amino, ejemplo: N-(3-trifluorometil-4-me— toxifenil) carbamato de isopropilo.

**Mecanismo de acción:** Es equivalente al mecanismo de acción de los organofosforados, uniéndose a las colinesterasas e inactivándolas. Pero ésta unión es reversible espontáneamente en menos de una hora, de manera que en el curso de una intoxicación aguda por carbamatos se manifiestan los mismos signos y síntomas de la intoxicación por organofosforados pero con un curso más rápido hacia la recuperación (39).

**Utilidad:** Los plaguicidas organofosforados y los carbamatos son utilizados en todo el mundo para controlar una gran variedad de insectos y otros invertebrados, así como hongos, aves, mamíferos y plantas herbáceas. Miles de productos, a base de estos compuestos, se aplican en una gran variedad de hábitats incluyendo cultivos agrícolas, bosques, humedales, invernaderos y ciudades (40).

Todos estos plaguicidas son inevitablemente detectados en suelos y aguas, que son elementos fundamentales para la productividad primaria de los ecosistemas, de tal manera que muchos de los elementos biológicos son, frecuentemente y de manera crítica, contaminados con plaguicidas organofosforados y carbamatos (22).

Estos plaguicidas son de vida relativamente corta, rápidamente metabolizados o excretados por la mayoría de los animales y no se concentran en las cadenas tróficas (40).

Los compuestos organofosforados son un grupos de compuestos químicos estructuralmente diversos, variando su reactividad en función de su estructura química; la electrofilicidad del fosfato es crucial para las acciones biológicas de estos compuestos. Su mecanismo principal de



acción es la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE), una serina esterasa ampliamente distribuida. La AChE está presente en el sistema nervioso central y periférico de los vertebrados y su acción fisiológica normal es hidrolizar el neurotransmisor acetilcolina (ACh). La inhibición de la AChE resulta en la acumulación de ACh y el inicio de signos de toxicidad colinérgica. Los plaguicidas OP o sus metabolitos activos son compuestos electrofílicos con una moderada a alta potencia de fosforilación del grupo serina hidroxilo, localizado en el sitio activo de la AChE. En tanto la AChE permanece fosforilada, su actividad enzimática es inhibida y con ello se acumula ACh en las uniones neuromusculares, conduciendo a una sobrestimulación de los receptores colinérgicos (41).

La acumulación de ACh altera la función del sistema nervioso autónomo, las neuronas somáticas motoras y el cerebro por acción en los receptores nicotínicos y muscarínicos. El sistema nervioso autónomo controla las funciones viscerales del cuerpo. Las neuronas somáticas motoras controlan funciones voluntarias, incluyendo locomoción, respiración y postura (41).

Signos de intoxicación mediada por receptores nicotínicos en el sistema autónomo y somático incluyen taquicardia, hipertensión, fasciculaciones musculares (particularmente el parpado y los músculos faciales), temores, debilitamiento muscular y parálisis flácida (41).

Déficit persistente en la memoria y en el funcionamiento neurofisiológico han sido atribuidos al uso y contacto con plaguicidas OP (42). Esos efectos son manifestados meses o años después de que se han documentado exposiciones a plaguicidas, usualmente posterior a toxicidad colinérgica (41).

Algunos plaguicidas OP han sido asociados con toxicidad visual en animales de laboratorio y en humanos que padecen de un síndrome conocido como “Enfermedad de Saku” (43). La toxicidad visual puede resultar de la degeneración de la retina y del nervio óptico que puede surgir siguiendo una aparente recuperación de primeras exposiciones a OPs (41).



Algunos compuestos organofosforados (diclorvos) han sido asociados con un alto riesgo de cáncer de próstata, particularmente en trabajadores de granjas que son expuestos a niveles altos de estos compuestos (36).

Bustos-Obregón *et al.* citan daños en esperma de mamíferos domésticos, incubados en presencia de paration y paraoxon, afectando la habilidad en el momento de la fertilización (47).

Algunos estudios han demostrado que los plaguicidas pueden ser llevados hasta los hogares de los trabajadores que están expuestos a ellos, lo cual ha contribuido a la exposición de niños a estos plaguicidas. En el estado de Washington los hogares de trabajadores agrícolas tienen altas concentraciones de plaguicidas, por lo que los niños que viven en ellos han presentado altas concentraciones de metabolitos de organofosforados en la orina. Asimismo, en las muestras de polvo tanto de las casas como de los vehículos utilizados por los trabajadores se registraron plaguicidas como azinfosfometil, malation, M-paration, entre otros. Ello pone de manifiesto la importancia de la aplicación de prácticas de seguridad efectivas, particularmente en personas expuestas directamente, para un manejo adecuado de los plaguicidas (22).

### ***1.2. Propiedades fisicoquímicas de los plaguicidas***

Entre las propiedades físico-químicas de los plaguicidas que son importantes en su dinámica ambiental, se puede mencionar las siguientes:

#### **Solubilidad en agua**

Las sustancias con solubilidad acuosa mayor a 500 ppm son muy móviles en los suelos y en los otros elementos del ecosistema, su mayor concentración se encuentra en los ecosistemas acuáticos. Por otro lado, las sustancias con una solubilidad acuosa mayor de 25 ppm no son persistentes en los organismos vivos, en tanto que aquellas con una solubilidad acuosa menor a 25 ppm tienden a inmovilizarse en los suelos y a concentrarse en los organismos vivos. En general los plaguicidas organofosforados tienen una solubilidad acuosa mayor a los 25 ppm, en tanto que los plaguicidas organoclorados tienen una solubilidad menor a los 25 ppm.



## El coeficiente de partición lípido-agua

El coeficiente de partición lípido/agua de una sustancia muestra cuánto de una sustancia se disuelve en agua y cuánto en lípido; este coeficiente de una manera indirecta proporciona información sobre la solubilización y distribución de una sustancia en un organismo vivo. Por ejemplo el aldrín y el DDT tienen un coeficiente de partición lípido/agua mayor a uno, por lo tanto, son liposolubles y podemos inferir que se absorben fácilmente a través de las membranas biológicas y que se acumulan en el tejido graso.

## La presión de vapor

La presión de vapor de una sustancia determina su volatilidad. Las sustancias con presión de vapor mayor a  $10^{-3}$  mm de Hg a  $25^{\circ}$  C, tienen gran movilidad y por lo tanto, se dispersan hacia la atmósfera, existen sustancias ligeramente volátiles, con presión entre  $10^{-4}$  a  $10^{-6}$  mm de Hg a  $25^{\circ}$  C, y las no volátiles, que son más persistentes en suelos y agua, con presión de vapor menor a los  $10^{-7}$  mm de Hg. Por ejemplo los herbicidas tienen presiones de vapor muy bajas, las clorotriazinas, probablemente los herbicidas más utilizados, tienen presiones de vapor menores a los  $10^{-2}$  mm de Hg. Este grupo es de mayor persistencia y menor volatilidad que las metoxitriazinas, con presiones de vapor igual o mayores a los  $10^{-7}$  mm de Hg.

## Disociación e ionización

Las sustancias al solubilizarse se pueden o no disociar. Las que no se disocian son sustancias no iónicas, las que se disocian son sustancias iónicas, las cuales pueden tener carga positiva (catiónicas) o bien cargas negativas (aniónicas). Los plaguicidas aniónicos y los no iónicos son móviles en los suelos, en tanto los catiónicos son absorbidos y permanecen inmóviles en ellos. El paraquat y el diquat son sustancias catiónicas que se adsorben fuertemente a las partículas de los suelos, en tanto que los plaguicidas fenoxiacéticos, sustancias aniónicas, se movilizan fácilmente.



## Degradabilidad

Es importante considerar también las propiedades químico-biológico de degradabilidad de los plaguicidas. En la Tabla 6, se muestran algunos grupos de plaguicidas y sus características fisicoquímicas. Dicha propiedades se refieren a que la actividad de un plaguicida puede ser permanente o bien puede disminuir con el tiempo en función de su descomposición, ya sea química (quimiodegradabilidad), por acción de la luz (fotodegradabilidad), o por acción de sistemas microbianos (biodegradabilidad).

Los plaguicidas contaminan tanto los ambientes terrestres como los acuáticos. En los ambientes terrestres contaminan los suelos y la biota terrestre cuando se aplican directa y deliberadamente o se precipitan de la atmósfera, como consecuencia de las aspersiones aéreas, o bien por el uso para riego de aguas contaminadas.

Los plaguicidas en los suelos y en la biota pueden persistir desde unos días hasta años. La persistencia de un contaminante se puede definir como la propiedad de un compuesto para retener sus características físicas, químicas y funcionales en el medio a través del cual es transportado o distribuido por un periodo limitado después de su emisión. Si su vida media y su persistencia es mayor a la frecuencia con la que se aplica, el plaguicida tiende a acumularse tanto en los suelos como en la biota y en los seres humanos que están involucrados en su uso. El agua es contaminada por plaguicidas, ya sea porque se aplican directamente a un cuerpo de agua, o bien porque se encuentran en precipitaciones atmosféricas o en los deslaves de tierras, cultivos, etc. Tanto los plaguicidas solubles en el agua como los insolubles interaccionan con la biota acuática. Sin embargo, los hidrosolubles persisten en el medio según sus propias características antes señaladas, y los insolubles se adsorben a las partículas no solubles, a los sedimentos y se concentran en la biota acuática (22).





Tabla 6. Características de algunos plaguicidas.

Plaguicidas	Características	Ejemplo
Organoclorados	Solubles en lípidos; se acumulan en los tejidos grasos de los animales; son transferidos a través de la cadena alimenticia; tóxicos para una gran variedad de animales; persistentes a largo plazo.	DDT, aldrín, lindano, clordano
Organofosforados	Solubles en agua; se infiltran hasta alcanzar las aguas subterráneas; menos persistentes que los hidrocarburos clorados; algunos afectan al sistema general - son absorbidos por las plantas, transferidos a las hojas y tallos, donde quedan al abasto de insectos que comen hojas o se alimentan de sabia.	Malation, paration
Carbamatos	Derivados de ácidos carbámicos; matan a un espectro limitado de insectos, pero son altamente tóxicos para los vertebrados; persistencia relativamente baja.	Servín, carbaril
Diflubenesurón	Interfiere en la formación del exoesqueleto en las larvas de insectos que mudan. Se ha utilizado en el control de la mariposa lagarta, aunque no es selectivo, con lo cual afecta a todas las orugas de lepidopteros que están en fase de desarrollo en el momento de la aspersión.	Dimelin
Vegetales	Afectan el sistema nervioso, son menos persistentes que los plaguicidas; entre los más seguros en cuanto a su utilización; algunos son utilizados en insecticidas caseros.	Piretrinas,
Patógenos de insectos	Solo el <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt) y sus subespecies son utilizados con cierta frecuencia; aplicados contra plagas forestales y de cultivos, particularmente contra mariposas lagartas; también afectan a otras orugas.	Dispel, foley, thuricide 90 TS

Funes, 1992.

### ***1.3. Vías de ingreso de los plaguicidas al organismo***

La toxicidad ocasionada por los plaguicidas depende de la forma en que ingrese el compuesto al organismo, reconociendo principalmente tres vías:

Vía oral: El tóxico puede ser deglutido y pasar a tracto gastrointestinal y de ahí al sistema hepático y al circulatorio, desde donde puede ser eliminado: pero también puede ser reabsorbido, en su forma de metabolito activo, por la vía biliar o renal y de ahí pasar al tubo digestivo y a los sitios blanco para posteriormente ser eliminado.



Vía parenteral: Comprende distintas vías de entrada tales como la venosa, intraperitoneal, conjuntiva, dérmica, muscular y subcutánea. De las diversas vías de entrada, todas ellas desembocan en el sistema circulatorio, para que posteriormente se elimine o se deposite en el (los) órgano blanco.

Los plaguicidas pueden impactar la población humana mediante un envenenamiento secundario al contacto dérmico y su absorción a través de la piel generando signos de toxicidad a diferentes niveles como el nefrotóxico, reprotóxico, hematotóxico, etc. (22).

Vía inhalatoria: El tóxico asperjado es inhalado hacia los pulmones y de acuerdo al tamaño de la partícula y la presión con la que ingresa, puede llegar a los alveolos, de donde puede traspasar la barrera pleural y pasar al torrente sanguíneo y viceversa a través de intercambio de gases  $O_2$  -  $CO_2$  (45).

Se deben tomar en cuenta otros riesgos como son las reacciones adversas de hipersensibilidad o alergia por el contacto con los mismos, las cuales son difíciles de identificar ya que no dependen del grado de exposición al agente tóxico ni de la dosis y su sintomatología es tan variada que puede ser fácilmente confundida con otra enfermedad (46).



#### ***I.4. Riesgo en el manejo de plaguicidas y su uso en México***

Uno de los aspectos que mayormente se enfatizan en muchos de los análisis sobre plaguicidas, es el riesgo en su manejo inadecuado, ya que puede resultar en severas intoxicaciones agudas, en algunos casos, efectos adversos a la salud pueden también resultar en exposiciones a bajas concentraciones pero a largo plazo (28). Varios grupos de personas, caracterizados por diferentes patrones y grados de exposición, están en riesgo de sufrir efectos adversos. La exposición ocupacional ocurre en trabajadores involucrados en la manufactura y formulación de plaguicidas y entre los usuarios en la salud pública.

#### **Uso de plaguicidas en México**

En la República Mexicana se utiliza 60 % de los 22 plaguicidas clasificados como perjudiciales para la salud y el ambiente, el 42 % de los cuales se fabrican en el país. Asimismo, se emplean 30 plaguicidas de 90 que han sido cancelados o restringidos en EUA (25).

Dentro de la práctica de la floricultura se emplean principalmente insecticidas, fungicidas y acaricidas para contrarrestar las plagas que atacan frecuentemente a este cultivo, algunos ejemplos se encuentran descritos en la Tabla 7:

Tabla 7. Plagas que afectan a los cultivos y plaguicidas empleados.

<u>Tipo de plaguicida</u>	<u>Poblaciones sobre las que actúan</u>
Acaricidas	Ácaros
Fungicidas	Moho gris, mancha foliar anillada, mildeo veloso, royas, mildeo polvoso, hongos patógenos del suelo
Insecticidas	Pulgones y áfidos, minadores, mosca blanca, trips

Castillo Cadena, 2006.



### ***1.5. Plaguicidas y su efecto sobre la calidad espermática***

Los plaguicidas por su efecto sobre la calidad espermática se clasifican en dos grupos: los que contienen toxinas reproductivas y/o de desarrollo (RD) y aquellos que actúan como disruptores endócrinos (DE). La mayoría de los que se emplean en la agricultura y la horticultura pertenecen a uno de estos grupos, como ejemplos del primer grupo tenemos al alkepone, el DBCP, y el etileno dibromida o dibromoetano (47). En Villa Guerrero se emplean entre otros metomilo, metamidofos, monocrotofos, carbofuran, maneb, lindano y metil-paration, pertenecientes a los grupos organoclorados y organofosforados, por lo regular en mezclas (48).

Estudios recientes sugieren que los contaminantes ambientales como los plaguicidas organoclorados participan en la etiología de los abortos involuntarios recurrentes, relacionándolos con niveles altos de la gamma- HCH en sangre (49).

La exposición de los hombres o las mujeres a ciertos plaguicidas en dosis suficientes puede aumentar el riesgo de anomalías en el esperma, disminución de la fertilidad, un déficit de los hijos varones, aborto espontáneo, defectos congénitos o retardo del crecimiento fetal (50).

En Europa se reportó que en 15 mil individuos ha disminuido la concentración de semen, ya que al principio de la investigación se registró una concentración de 113 millones de espermatozoides por un mililitro de eyaculado, 5 años después, se contabilizaron 66 millones por mililitro, lo que puede incidir en la fertilidad (27).

Durante el proceso de la floricultura se requiere de la aplicación de agroquímicos dos o tres veces por semana, en actividades como la desinfección del suelo (fumigantes), fertilización, corte y recolección de las flores. Los plaguicidas empleados en mezclas con valores de toxicidad diversos, presentan actividad biológica específica para cada tipo de plaga, de la cual se derivan sus nombres en: insecticidas, fungicidas o nematicidas. Por ejemplo el Tamaron, el Temik y el Curacron que son altamente tóxicos (27).



Los hombres que aplican plaguicidas sin equipo de protección se encuentran en mayor riesgo de fragmentación del ADN espermático (51). Pueden ocurrir lesiones que no fragmenten el ADN pero que permanezcan y después de la fecundación puede provocar problemas en el desarrollo embrionario que finalmente lleve al aborto; en este entendido se destaca que la tasa de aborto espontáneo es de aproximadamente 2 veces mayor si un hombre tiene más de 30% de los espermatozoides anormales (52). Aunado a ello, experimentan un retraso de la concepción en el momento en que sus parejas quieren concebir por primera vez (53).

La comparación entre la calidad del semen de las personas expuestas a diferentes tipos de plaguicidas, como paraquat y malation, muestran una disminución significativa en la calidad del mismo, con una reducción en el recuento de espermatozoides, de la movilidad y un mayor porcentaje de terazoospermia, teniendo un riesgo de 3 a 9 veces mayor de tener parámetros anormales del semen (54).

### ***1.6. Daño al ADN por plaguicidas.***

Se ha encontrado una diferencia significativa entre los valores de daño al ADN en floricultores expuestos ocupacionalmente a plaguicidas y las obtenidas del grupo control no expuesto (1-3, 9, 13, 47, 48, 50, 52-56).

### **Alteraciones en la reproducción por plaguicidas.**

Existe evidencia que demuestra los efectos potencialmente adversos de la exposición ocupacional a plaguicidas y el riesgo de aborto espontáneo (SAB, por sus siglas en inglés Spontaneous Abortion). Se esboza una posible relación adversa entre su empleo en el sector florícola por mujeres embarazadas y SAB (57). Existen estudios en los que se identifican la magnitud y la frecuencia de exposición a factores físicos y químicos de mujeres embarazadas empleadas en campos agrícolas o florícolas para identificar el riesgo de complicaciones en el embarazo. Se ha demostrado un aumento del 1.8 % de embarazos anormales, por lo que a las mujeres en este estado se le debería impedir trabajar en estas condiciones nocivas después de la concepción (58).



Savitz *et al*, (59), sugieren la posibilidad de que la exposición laboral de hombres y mujeres puede desencadenar un aborto espontáneo o un parto prematuro, encontrando que la exposición ocupacional en el séptimo mes del embarazo se asociaron el riesgo de parto prematuro. El empleo de los hombres en profesiones industriales se asocia débilmente con aborto involuntario (1.6 a 1.8%) y fuertemente asociado con parto prematuro, en especial los que están laborando con agentes químicos como plaguicidas, caso en el cual aumenta hasta un 3%. Este estudio apoya el empleo de exámenes más centrados en los varones relacionándolos con el resultado del embarazo (59).

### ***1.7. Biomarcadores***

Representan la medida de la respuesta biológica, frente al efecto de una sustancia tóxica, a nivel sub-individual o individual. Es un índice que manifiesta el efecto producido por un tóxico a diferentes niveles biológicos (60).

A través de esta interacción se pueden generar una serie de respuestas celulares, moleculares, bioquímicas y/o fisiológicas. Estas reacciones desencadenadas por la exposición a agentes tóxicos que dependen de la herencia, las características adquiridas, como es el estilo de vida, así como las propiedades físico-químicas del compuesto y las circunstancias en las que se desarrolla el contacto. El resultado puede ser:

- Sin efecto
- Efecto adverso con recuperación
- Toxicidad con mortalidad (61)

Sin duda, la ventaja principal del empleo de biomarcadores estriba en que considera las variaciones interindividuales (diferencias en la absorción, biodisponibilidad, excreción o en los mecanismos reparadores del ADN) e incluso, intraindividuales como consecuencia de una alteración fisiopatológica concreta en un período de tiempo determinado. Ello conlleva una evaluación de la exposición individualizada (62).



Una de las limitaciones más importantes de los biomarcadores radica en que no pueden aplicarse a sustancias que ejercen sus efectos tóxicos de forma instantánea (por ejemplo, gases y vapores irritantes primarios) o sustancias que tienen una tasa de absorción muy pequeña (63).

Su importancia estriba en elucidar relaciones causa-efecto y dosis-efecto en la evaluación de riesgos para la salud, diagnóstico clínico y para propósitos de monitoreo (30).

Por lo que un *biomarcador ideal* implica que éste debe cumplir los siguientes requisitos:

- a) Recolección de la muestra y análisis fácil
- b) Específico
- c) Debe permitir adoptar medidas preventivas
- d) Debe ser éticamente aceptable
- e) Debe reflejar únicamente un cambio subclínico y reversible (64).

Se han identificado tres clases de biomarcadores:

1. Biomarcadores de exposición: Es una sustancia, su metabolito, o el producto de la interacción entre un agente xenobiótico y una molécula o célula blanco, que es medida en un compartimento del organismo como una célula, tejido u órgano (30).

Puede ser un compuesto exógeno (o un metabolito) dentro del organismo que refleja la exposición de éste a un xenobiótico. El análisis se realiza en fluidos corporales, sangre y orina, fundamentalmente, o incluso aire espirado. Con el empleo de estos biomarcadores se pueden evaluar la *dosis interna* y la *dosis biológicamente activa* (30). En el caso de tóxicos acumulativos, la *dosis interna* puede también reflejar la cifra de agente tóxico almacenado en uno o varios compartimentos corporales (65, 66). Además se puede evaluar la dosis biológicamente activa (9). Por ejemplo, la identificación del compuesto al que se está expuesto, ya sea en suero, plasma, sangre total u orina (30).

2. Biomarcadores de efecto: Los biomarcadores de respuesta o efecto son indicativos de cambios bioquímicos, fisiológicos o de comportamiento en un organismo como resultado



de la exposición a xenobióticos, asociado al deterioro de la salud o a una enfermedad específica (9).

Incluyen modificaciones en la composición celular sanguínea, alteraciones en actividades enzimáticas, aparición de aductos del ADN, incrementos localizados de ARN-m, aumento de determinadas proteínas, e incluso aparición de anticuerpos específicos (autoanticuerpos) contra un xenobiótico o frente a fracciones celulares como el núcleo, membrana, etc. (65). Proporcionan información sobre el efecto biológico temprano o tardío, dado por la exposición a un agente tóxico. Por ejemplo, los biomarcadores hematológicos, nefrotóxicos, hepatotóxicos, inmunotóxicos, de toxicidad pulmonar, de la reproducción y del desarrollo, de neurotoxicidad y de carcinogénesis química (30).

3. Biomarcadores de susceptibilidad: Es un indicador de la habilidad inherente o adquirida de un organismo para responder a la exposición a un xenobiótico (9).

Los biomarcadores de susceptibilidad permiten asociar la magnitud de una respuesta frente a un xenobiótico, con las características del individuo. También se utilizan para elucidar relaciones causa- efecto y dosis-efecto en la evaluación de riesgos para la salud, en diagnóstico clínico y monitoreo (67).

Con relación a los genes de susceptibilidad, los polimorfismos están presentes en algunas enzimas metabólicas de activación/desactivación, incluyendo las isoenzimas del citocromo P-450 y al menos una de las formas de la glutatión S-transferasa. Las diferentes proporciones de la actividad enzimática controlan la activación o detoxificación de los xenobióticos, surgiendo las diferencias en susceptibilidad incrementando o disminuyendo la dosis biológicamente efectiva del agente ambiental (30).

## **Genotoxicidad**

La respuesta a la exposición de un compuesto xenobiótico depende de la carga génica, de las características adquiridas, del estilo de vida, así como de las propiedades del compuesto y de las circunstancias de contacto. El resultado puede ser:





- Sin efecto.
- Efecto adverso con recuperación (tolerancia).
- Toxicidad con mortalidad.

La toxicidad genética es el estudio de la interacción de los agentes químicos y físicos con el material genético (68). Los plaguicidas y sus metabolitos electrofílicos pueden interactuar con los centros nucleofílicos de las macromoléculas, como el ADN y ocasionar cambios en su estructura (lesiones primarias). La célula cuenta con varios mecanismos de reparación para los diferentes tipos de daños en el ADN. Si las lesiones son reparadas incorrectamente o no son subsanadas, después de la división celular los daños son fijados y expresados como mutaciones (45).

La genotoxicidad es el resultado nocivo de la interacción de agentes químicos o físicos con el aparato hereditario de la célula, y se manifiesta como alteraciones genéticas y/o cambios en el número o estructura de los cromosomas, que pueden incorporarse en generaciones celulares subsecuentes llamadas mutaciones (69).

Las alteraciones genómicas asociadas con el uso de plaguicidas pueden implicar cambios a pequeña escala, como la sustitución de un solo nucleótido, o a gran escala, como reordenaciones cromosómicas, ganancia o pérdida de cromosomas (70).

Para evaluar la genotoxicidad existen varios ensayos tales como: Aberraciones Cromosómicas (AC), Micronúcleos (MN), Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH) y el Ensayo Cometa, entre otros.

### ***1.7.1. Ensayo cometa***

El ensayo cometa o electroforesis de una sola célula (SCGE) es un método rápido, y relativamente sencillo para detectar el daño al ADN. Combina la simplicidad de las técnicas bioquímicas para identificar las rupturas en los sitios susceptibles a álcalis con el simple



procedimiento de un ensayo citogenético típico (51). Es ampliamente utilizado como un método rápido y confiable de análisis de daño al ADN en las células individuales (71).

En 1978 Rydberg y Johanson (72) describieron un método para el análisis de células individuales basado en la lisis alcalina de las células previamente irradiadas. Posteriormente, esta técnica fue adaptada a la metodología de citometría de flujo mediante la encapsulación de las células en agarosa antes de la irradiación, seguido de una lisis alcalina. El desarrollo del “ensayo del halo” corrió a cargo de Roti Roti y Wright en 1987 (73), en el cual las roturas del ADN producen un relajamiento del superenrollamiento de la molécula, lo que permite la expansión del halo anclado a una matriz de proteínas en cada una de las células. Esto permite interpretar que una sola rotura en una hebra del ADN es suficiente para relajar al mismo (72).

En 1984 Ostling y Johanson, mejoraron la sensibilidad para detectar el daño en el ADN de células individualizadas, desarrollando un ensayo de electroforesis con microgeles de agarosa, una lisis celular para la formación de halos y posteriormente se sometió a un campo eléctrico, lo que permitió la migración del material que se extrajo del núcleo. Esta migración del ADN (cargado negativamente) desde el ánodo, incrementa la sensibilidad en la detección del daño, la cual se evidenció mediante un marcaje con naranja de acridina. La imagen obtenida fue como la de un cometa con una cabeza compuesta de ADN intacto y una cola compuesta de fragmentos de ADN de tal suerte que por esto se le nombró ensayo cometa. Sus ventajas son:

- La colección de datos a nivel de células individuales permitiendo un análisis estadístico más robusto, no es necesario un número grande de células en la muestra (<10,000 células).
- Bajo costo.
- Tiene gran sensibilidad para detectar el daño al DNA.
- Se usa en cualquier tipo de célula eucariota
- Brinda un análisis más específico de los niveles de daño al DNA.
- Se destaca por su versatilidad, simplicidad y fiabilidad.
- Posee una amplitud de posibles aplicaciones.
- Emplea una pequeña cantidad de material biológico (74).



La técnica está basada en embeber las células en un gel de agarosa, la membrana celular y nuclear se lisa con detergentes y se agrega una concentración alta de células para desacoplar las histonas (4). Al relajar el ADN con un una solución alcalina de pH no regulado, las hebras del mismo pierden su superenrollamiento, por la electroforesis, se forma una cola o cauda que, cuando se tiñen con un colorante fluorescente, puede ser analizada por microscopía de fluorescencia (71). El corrimiento del extendido forma la cauda que depende directamente del daño al ADN presente en las células. Es importante mencionar que las lesiones al ADN consisten en ruptura de las cadenas después del tratamiento alcalino o sin éste, e incluso se puede añadir un tratamiento con ciertas enzimas, como las glucosidasas, que participan en reparación para identificar daños específicos en el ADN. Los rompimientos del ADN pueden originarse por agentes químicos o sus metabolitos, así como en los procesos de la reparación y en la apoptosis (4).

El ensayo cometa se utiliza en una amplia gama de estudios de biomonitoreo de la exposición ocupacional y ambiental (55) a diferentes xenobióticos, incluyendo los plaguicidas, en poblaciones establecidas, muestra relaciones dosis respuesta y emplea para su desarrollo varios tipos de células humanas, incluyendo los espermatozoides (74). Sin embargo, existen factores que pueden influir para la selección de las poblaciones de estudio a las que se les va a aplicar esta prueba como son: la edad, el tiempo y la vía de exposición, el ejercicio, hábitos como tomar o fumar y la historia reproductiva (55).

A través del ensayo cometa se demostró que existen rompimientos en el ADN y sitios lábiles al álcali, en poblaciones expuestas a xenobióticos, tales como los plaguicidas (4).

### ***1.8. Genes de susceptibilidad***

Los genotipos son responsables de las diferencias interindividuales para activar o inactivar los agentes genotóxicos y son considerados como biomarcadores de susceptibilidad (9).

Sirven como indicadores de sensibilidad individual al efecto de un xenobiótico o grupo de compuestos tóxicos. Se deben generalmente a factores genéticos, reconocibles por estudios de



ADN y sus fragmentos de restricción (RFLPs), estudio de genes e investigación de polimorfismos de actividades enzimáticas (65). Podemos distinguir dos tipos (66):

1. Marcadores de polimorfismos de sistemas activadores: Permiten la medida de actividad de los enzimas del citocromo P-450. Las hemoproteínas conocidas como citocromos P450 (CYP) están implicadas en la toxicidad de numerosos xenobióticos. El sistema isoenzimático microsomal del citocromo P450 humano está constituido por un mínimo de 30 genes diferentes, que se agrupan en distintas familias (en función de la semejanza de secuencias aminoacídicas) de las cuales las más importantes son las familias I, II, III y IV (75-77) que a su vez, se agrupan en subfamilias (A, B, C, D,.....) constituidas por genes polimórficos, de los cuales los más importantes son el CYP1A1 de la familia I representa la actividad de la arilhidrocarburo hidroxilasa y el CYP1C8 y CYP1D6, de la familia II.
2. Marcadores de polimorfismos de sistemas detoxificadores: son medidas de actividad de enzimas tales como la glutatión-S-transferasa, la acetiltransferasa, la sulfotransferasa, la glucuroniltransferasa o la paraoxonasa. Un ejemplo es la glutatión-S-transferasa  $\mu$ , enzima implicada en la detoxificación de metabolitos reactivos que se ha relacionado con el cáncer pulmonar de células escamosas. La mitad de la población no posee alelos funcionales para esta enzima o su actividad es baja o incluso inexistente, lo que hace que se incremente el posible riesgo de dicho cáncer (66).

### ***1.8 1. Glutation S-Transferasa (GST)***

La Glutation S- transferasa (GST), que pertenece al complejo de enzimas de Fase II, el cual participa en la transformación de tóxicos en metabolitos que puedan ser eliminados más fácilmente del organismo (3), está constituida por una familia de genes que tienen un papel importante en la depuración de radicales libres, y por lo tanto, protege a la célula de los efectos nocivos del estrés oxidativo (78). Estas enzimas catalizan el ataque nucleofílico del sustrato fisiológico, glutatión reducido o GSH (g-Glu-Cys-Gly) sobre el centro electrófilo de un gran número de estructuras tóxicas de origen endógeno y exógeno, por la actividad de la peroxidasa de las GSTs dependientes del glutatión. Sin embargo, las GSTs también están involucradas en el proceso de activación de algunos carcinógenos, como los haloalcanos y haloalquenos (78, 79).

En mamíferos estas isoenzimas (GSTs) existen como homodímeros o como heterodímeros, tienen una masa molecular de aproximadamente 25 kDa por subunidad y un sitio activo por monómero. En humanos se han identificado en diferentes tejidos y órganos como: riñón, pulmón, intestino, piel, cerebro, sangre, corazón, músculo e hígado. En la Figura 5 se muestra de manera general la reacción que llevan a cabo las isoenzimas de GST, en donde el glutatión en presencia de un xenobiótico y las enzimas GST, realizan la conjugación, obteniéndose un producto formado por el glutatión y el xenobiótico (80).

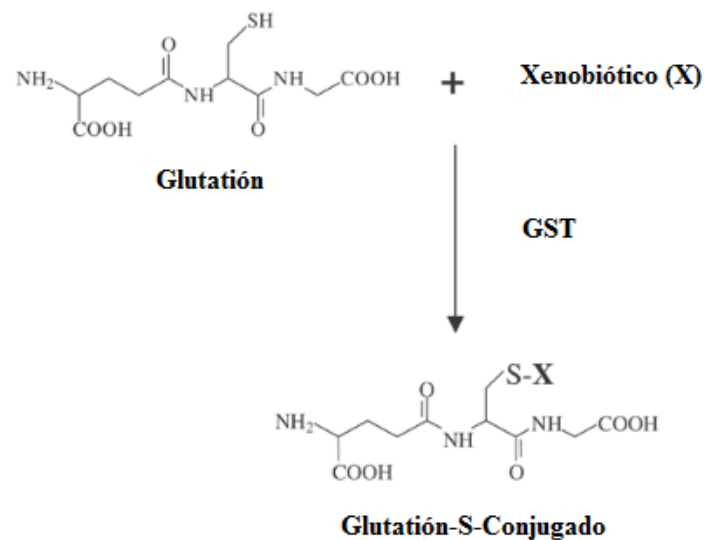


Figura 5. Reacción general de las isoenzimas GST.

Se clasifican en tres grandes familias, dos de ellas son: cistólicas y mitocondriales, las cuáles son enzimas solubles; y la tercera familia incluye GSTs microsomal, conocidas como proteínas asociadas a membrana. También se clasifican en ocho clases, Alpha ( $\alpha$ ), Mu ( $\mu$ ), Pi ( $\pi$ ), Kappa ( $\kappa$ ), Theta ( $\theta$ ), Omega ( $\omega$ ), Sigma ( $\epsilon$ ) y Zeta ( $\zeta$ ), que se diferencian tanto en su secuencia, propiedades inmunológicas y papel fisiológico (79).

Se ha demostrado que la presencia de polimorfismos en los genes que codifican para GST pueden alterar su función y el estudio de estos puede ayudar al entendimiento del riesgo de exposición a diferentes xenobióticos en la población, sub-población y de manera individual.



Además la existencia de polimorfismos en estas enzimas explica en parte las diferencias en cuanto a la susceptibilidad individual. Ante un agente genotóxico, en este caso plaguicidas como el lindano, el alaclor, la atrazina, el DDT y el metilparation, el organismo responde generando un aumento en la actividad enzimática de la GSTT1 y la GSTM1 (80).

### **GSTM1**

Los genes polimórficos de la Glutation S-Transferasa M1 (GSTM1) se heredan de forma autosómica recesiva (80). La secuencia de este gen está conformado por cinco regiones: M1, M2, M3, M4 y M5, siendo el M1 hasta ahora el más estudiado, el cual está ubicado en el cromosoma 1, región p13.3, está formado por ocho exones, tiene una longitud de 4.2 kb y es polimórfico, ya que cuenta con cuatro variantes alélicas: A, B, C y 0 (alelo nulo). Entre los posibles polimorfismos que presenta, GSTM1 nulo es el más frecuente en aproximadamente el 50% de los individuos. Las deleciones homocigotas de GSTM1 nulo dan lugar a la ausencia de la actividad enzimática. Existe evidencia del efecto del genotipo GSTM1 sobre la formación de aductos de DNA y proteínas, mutagenicidad, clastogénesis, aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátides hermanas y micronúcleos. Su ausencia o por sí mismo provoca estos efectos (81).

### **GSTT1**

La secuencia de este gen se encuentra ubicado en el cromosoma 22, región p11.2 está conformado por cinco exones y se encuentra flanqueado por dos regiones homólogas HA3 y HA5. Es polimórfico y posee dos variantes, GSTT1 silvestre y GSTT1 0 o nulo. Este último polimorfismo es consecuencia de una recombinación homóloga de las regiones HA3 y HA5 que dan como resultado una deleción de 5,4 kb y en consecuencia la enzima no se traduce. Los genes de la Glutation S-Transferasa T1 (GSTT1) producen una enzima que cataliza la desintoxicación de los monohalometanos y plaguicidas (78).

En un estudio transversal de susceptibilidad que se llevó a cabo en agricultores mayas del sureste de México crónicamente expuestos a plaguicidas, sobre todo los organofosforados (OP), se



reporta que las células en todas las etapas de la espermatogénesis son objeto u órgano blanco de los OP y existe una interacción entre la exposición a los mismos y el polimorfismo PON1Q192R, el cual se puede emplear como un marcador de susceptibilidad para demostrar que pueden desarrollar efectos tóxicos reproductivos por exposición a OP (56).

### ***1.9. Espermatobioscopía***

La espermatobioscopía es un método adecuado de evaluación de daño a los espermatozoides por exposición a agentes tóxicos (82).

Una de las estrategias para el estudio reproductivo es el espermograma, el cual es un examen paraclínico que brinda una visión de la calidad espermática del varón. Es de bajo costo y está considerado como el método más importante y sencillo para iniciar la evaluación de la fertilidad masculina. La espermatobioscopía directa consiste en la toma de una muestra de semen, obtenida en el laboratorio por medio de masturbación que se recolecta en un recipiente estéril. Se evalúan los aspectos físicos del semen, como el volumen, pH, viscosidad, color y olor y los aspectos celulares del espermatozoide con relación al número, movilidad, morfología y vitalidad. También ofrece información valiosa sobre la presencia de otras células como macrófagos, linfocitos, leucocitos, bacterias y hongos (83).

Junto con la espermatobioscopía se recomienda la obtención de la historia reproductora por medio de la aplicación de cuestionarios, como primera evaluación a la que deben tener acceso todos los trabajadores adscritos a un invernadero, debido a los efectos nocivos potenciales sobre la reproducción que representa esta labor. Una reducción de la cuenta espermática puede ser evidencia de problemas de salud, sin embargo algunas veces se requiere de dos o tres años de exposición para evidenciarla y no necesariamente por defectos en el tracto reproductivo (84).

La alteración de la morfología del espermatozoide (Figura 6) y el daño provocado al epitelio germinal se han relacionado con la toxicología reproductora (85). La mayoría de los estudios indican que los espermatozoides con morfología alterada muestran modificaciones en la movilidad y la capacidad para llevar a cabo la reacción acrosomal, lo que impide que fertilicen al ovocito (86).

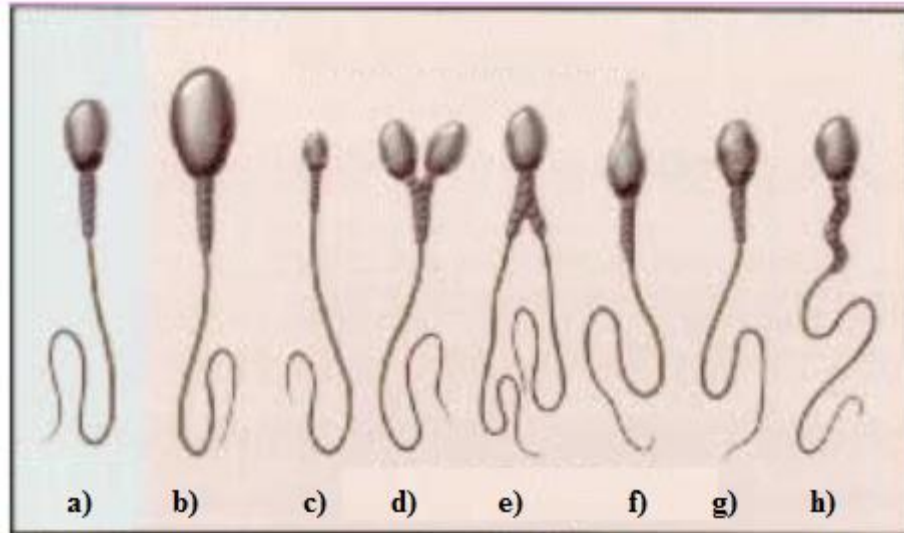


Figura 6. Tipos de anomalías en la morfología de los espermatozoides: a) espermatozoide normal, b) cabeza aumentada, c) cabeza disminuida, d) doble cabeza, e) doble cola, f) cabeza de alfiler, g) cola larga y h) cuello doble.

En los últimos cincuenta años se ha observado una baja en la concentración espermática en el hombre, descendiendo de un rango entre 113-106 millones de espermatozoides/ml a 106-66 millones de espermatozoides/ml. El hecho de que estos problemas reproductivos se hayan dado en un periodo tan corto, sugiere que éstos pudieran deberse a la exposición de agentes potencialmente genotóxicos (87).

#### ***1.10. Villa Guerrero, Estado de México***

El Estado de México ocupa menos del 1% de la superficie agrícola, que representan 6,740 hectáreas para la producción de flores. Sin embargo, se ha colocado en el primer lugar nacional en su producción. Aunque no existe un padrón definido del número de productores, se estima que hay entre 12 y 15 mil de ellos, generando alrededor de 75 mil fuentes de empleo, de los cuales 25 mil son directos y 50 mil son indirectos (26).

Villa Guerrero es un municipio localizado a 100 km del sur de la Ciudad de México, donde el 70% de la población trabaja en la floricultura (88), la cual ha alcanzado niveles de gran calidad





ya que produce cerca del 80% de las flores que se exportan en el país y se calcula que existen aproximadamente 5 mil 536 floricultores, siendo el municipio con el mayor porcentaje de invernaderos que tiene el Estado, por lo que es considerada la principal actividad económica en esta zona (26).



Figura 7. Localización de Villa Guerrero.

Castillo Cadena, 2006.

Actualmente la floricultura en la entidad representa el 60 % de la producción total nacional. La región florícola del Estado de México está conformada por los municipios de Coatepec Harinas, Ixtapan de la Sal, Tenancingo, Tonatico, Villa Guerrero y Zumpahuacán (89).

Villa Guerrero, Estado de México contribuye con el 80% de la cuota de exportación de flores hacia Estados Unidos, Canadá y algunos países europeos. La aplicación de plaguicidas en forma de mezclas se realiza cada tercer día o a veces diariamente para el control de diversas plagas, con el mínimo equipo de protección, empleando para tal labor a hombres, mujeres, niños y ancianos, los cuales trabajan en promedio 8 horas diarias, a excepción del domingo, en el que sólo laboran el tiempo suficiente para realizar el corte y la fumigación (9).



En esta zona, la actividad florícola se caracteriza por un abundante uso de plaguicidas, tanto en ambientes abiertos como cerrados (invernaderos), además, la disposición geográfica de la localidad, rodeada de un sistema montañoso, genera condiciones geográficas que contribuyen sustancialmente a la permanencia de estas sustancias en la atmósfera. Esta situación, aunada a la falta de una cultura de prevención de riesgos en el uso de plaguicidas, genera un aumento en los posibles efectos adversos observados a la salud humana. A pesar de que algunos plaguicidas, como las  $\delta$ -endotoxinas de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt), son de elevada seguridad (90), actualmente se utilizan como insecticidas específicos bajo nombres comerciales como Dipel y Thuricide y son considerados respetuosos con el medio ambiente por su especificación, ya que su efecto sobre los humanos, sobre la vida silvestre, sobre los polinizadores y sobre muchos otros insectos beneficiosos es mínimo o casi nulo (91). Muchos otros son carcinogénicos ya que inducen cambios en el ADN que a largo plazo se manifiestan en diferentes formas de cáncer y/o teratogénicos, inducen malformaciones congénitas (92).

Un análisis de los plaguicidas empleados por los floricultores realizado a través de encuestas y muestreo de envases de plaguicidas enviados al centro de acopio, indica que en la zona se emplean más de 82 compuestos activos de plaguicidas, entre los cuales se identifican organofosforados, carbamatos, tiocarbamatos, piretroides y organoclorados como los compuestos más frecuentemente usados, y se sabe que los metabolitos de algunos de ellos, como la etilentiourea que deriva de algunos carbamatos, pueden presentar efectos mutagénicos. En una comunidad denominada San Mateo Coapexco, un 26% de los plaguicidas usados fueron clasificados como plaguicidas extremadamente tóxicos en términos de su toxicidad aguda. Se concluyó que los individuos ocupacionalmente expuestos están siendo afectados por los agroquímicos con mayor intensidad que los habitantes que se dedican a otras actividades, pero por las condiciones en que se desarrolla la floricultura, toda la población está en riesgo de exposición a estos compuestos (89).



Figura 8. Disposición final de los envases de plaguicidas.

Actualmente, las medidas preventivas y de manejo de riesgos en la región estudiada se encuentran a cargo del Programa de Control y Fomento Sanitario de la Salud Ambiental, auspiciado por la Coordinadora de la Región de Tenancingo, Estado de México, e involucra a los municipios de Coatepec, Ixtapan de la Sal, Tenancingo, Tonatico, Villa Guerrero y Zumpahuacán. En materia de plaguicidas, las funciones más importantes de este programa consisten en orientar, capacitar, verificar y, dado el caso, aplicar las medidas de seguridad y sanciones correspondientes (93).

Para tal efecto se coordina con productores, comercializadores y consumidores, en apego a lo que establecen las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) y otras disposiciones aplicables.

Además, el Programa genera datos que permiten rehabilitar, conservar y mejorar las condiciones deseables de salud para toda la población, así como propiciar en el individuo las actitudes, valores y conductas que promuevan la salud humana (94).

El manejo de plagas se ha asumido, en la práctica, como sinónimo de uso de plaguicidas, y el uso masivo de éstos agroquímicos se sustenta o se estimula por los siguientes factores:



- a. Temor a que los métodos alternativos de control de plagas no sean eficientes.
- b. Desconfianza del nivel de control de plagas que se puede lograr con un uso racional de plaguicidas.
- c. Carencia de sistemas confiables de muestreo de plagas.
- d. Carencia de umbrales de decisión y de modelos de pronóstico de plagas y enfermedades.
- e. Poca conciencia del impacto que los plaguicidas pueden tener en el ambiente y en la salud humana.
- f. Por su rentabilidad, los cultivos ornamentales “permiten” un gasto económico innecesario de plaguicidas.
- g. El sector gubernamental rara vez vigila el cumplimiento de la normatividad aplicable, por lo que la salud humana, en la práctica, es una cuestión meramente administrativa.
- h. Los técnicos responsables del control de plagas están sometidos a fuertes presiones para obtener una cosecha libre de los daños que ocasionan las plagas. Pese a que existen claras excepciones, es común que la empresa florícola considere de mayor prioridad la “calidad” de la cosecha que la vida de los seres humanos (93).

La Norma Oficial Mexicana NOM-017-STPS- 1994 (95) menciona que en zonas tratadas con plaguicidas debe usarse equipo de protección personal. Este deberá ser proporcionado por el empleador. Sin embargo, en la zona de estudio se constató que es raro el uso de equipo de protección, además de que no se cuenta con lugares para el lavado y descontaminado tanto de la ropa como del equipo (9).

El 80% no utiliza equipo especial para su protección, aun cuando se sobreexpone a los plaguicidas. Contrario a estos hechos, la Norma Oficial Mexicana NOM-003-STPS-1999, en su fracción 5, apartado 5.10, establece como responsabilidad del empleador proporcionar, cuando menos al personal ocupacionalmente expuesto, el equipo de protección personal. Cabe destacar que a veces la falta de uso de equipos de seguridad no se debe a que los jornaleros no los posean, sino a que en forma voluntaria no los utilizan dadas las incomodidades que producen por el alto calor imperante o simplemente por razones como la burla de sus compañeros de trabajo o la puesta en duda de su valentía (96).



Además, cerca del medio día, los trabajadores toman un receso para ingerir alimentos en áreas contaminadas con plaguicidas y sin medidas de prevención, en dichos lugares se carece de avisos indicativos de la contaminación señalada. De hecho, los mismos trabajadores entrevistados señalaron que desde muy temprano se percibe un fuerte olor a plaguicida no solo en las áreas de trabajo, sino también en el poblado, lo cual indica que el plaguicida es arrastrado por el viento lejos de la zona de aplicación, exponiendo a toda la población. Los olores de esta naturaleza no son una medida confiable del nivel real de contaminación, por lo que de hacerse un estudio cuantitativo, este podría arrojar niveles más alarmantes de presencia peligrosa de plaguicidas en la atmósfera (97).

Los efectos reproductivos o de desarrollo adversos, en varios países se han asociado con la exposición a mezclas de plaguicidas hechas en estos lugares de trabajo, sobre todo cuando el equipo de protección personal no se usa, debido a que es difícil de toleraren un clima caluroso y húmedo, o puede no estar disponible o ser inaccesible, como en el caso que viven los floricultores de Villa Guerrero (2, 13, 47, 50, 53, 57-59, 84, 98, 99).

En esta zona los riesgos a la salud son muy grandes, particularmente sobre los daños potencialmente asociados al uso de agroquímicos, tales como malformaciones congénitas, fallas reproductivas, cáncer, hepatotoxicidad, problemas dermatológicos y de vías respiratorias (48).

Cada clase de plaguicidas tiene al menos un agente capaz de afectar a un criterio de valoración reproductiva o del desarrollo en animales de laboratorio o de personas, en especial los organofosforados y los organoclorados. Ayudar a evaluar los niveles de exposición, sopesar los riesgos y beneficios, adoptar prácticas para reducir o eliminar la dosis absorbida y planear con anticipación, ofrece la mejor oportunidad de reducir el riesgo por exposición a plaguicidas (50).



## JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia económica que la floricultura representa, los agricultores y habitantes de la comunidad de Villa Guerrero, Estado de México, están dejando de lado las consecuencias y riesgos a la salud que conlleva esta práctica debido al mal uso de agroquímicos.

Algunos de los problemas que se han identificado por el uso indiscriminado de plaguicidas son los generados a la salud de los individuos expuestos, los cuales han sido determinados en diferentes sistemas de prueba, siendo los menos en poblaciones ocupacionalmente expuestas.

Por lo antes expuesto, es que se considera de gran importancia conocer el riesgo que implica la exposición laboral a plaguicidas sobre la calidad espermática, el daño al DNA y su asociación con los polimorfismos de GST.

## HIPÓTESIS

El daño medido con la espermatobioscopía y el ensayo cometa será mayor en los floricultores y su susceptibilidad se relacionará con los polimorfismos nulos de la Glutation S-Transferasa M1 y T1.

## OBJETIVOS

### General

Determinar si la exposición laboral a las mezclas de plaguicidas produce daños a los espermatozoides en floricultores, y su asociación con el daño al ADN y los polimorfismos de los genes de la GSTs.



## Específicos

- Realizar las espermatobioscopías en hombres expuestos ocupacionalmente a plaguicidas y en los no expuestos.
- Determinar el daño al ADN empleando el ensayo cometa en los individuos expuestos ocupacionalmente a plaguicidas y en los no expuestos.
- Identificar los polimorfismos GSTM1 y GSTT1 de la Glutation S-transferasa en ambos grupos.
- Determinar si existe correlación entre los polimorfismos de la GSTT1 y la GSTM1, el daño al DNA y a los espermatozoides en los floricultores.



## II. METODOLOGÍA

Se trata de un estudio transversal, comparativo y descriptivo.

El proyecto consideró la inclusión de todas las muestras de semen que se recolectaron desde hace un año, de floricultores de Villa Guerrero, Estado de México y el mismo número de muestras de individuos de la comunidad universitaria UAEM, que no estén expuestos ocupacionalmente a plaguicidas. La meta mínima es obtener 30 muestras de cada grupo.

Se gestionó en Villa Guerrero el acceso a los invernaderos para conseguir las muestras y se recabó información sobre el estilo de vida, tipo y tiempo de exposición, los plaguicidas empleados y la fecha de su última aplicación. De la misma forma se hizo una invitación abierta a los varones miembros de la comunidad universitaria para su inclusión dentro del estudio, aplicándoles el mismo cuestionario.

Los individuos que aceptaron participar, firmaron una carta de consentimiento informado, haciéndoles saber que los resultados se les harían llegar de manera individual y confidencial.

Se tomó una muestra de 3 mL de sangre periférica con heparina y se recogió la muestra de semen. Con la sangre se determinaron los polimorfismos de los genes GSTT1, GSTM1, con el procedimiento de Abdel-Rahman (1996) (7), haciendo la extracción de DNA y la PCR seguida de la electroforesis. Empleando el gen CyP1A1 como control de la PCR. Asimismo con la muestra de semen se procedió a la realización de la espermátobioscopía y el ensayo cometa, éste último se realizó con el procedimiento modificado de Hauser *et al*, 2007 (67), el daño se evaluó con el tail moment, empleando el programa Comet Assay IV (100). La espermátobioscopía consideró la determinación de los siguientes parámetros: volumen, pH, viscosidad, color; así como el número de espermatozoides, su movilidad, morfología y vitalidad, utilizando los criterios establecidos por la OMS/OPS (5).





Los criterios de participación de los individuos para el estudio fueron:

#### Criterios de inclusión

Grupo expuesto: Floricultores de cualquier edad fértil, que se encuentren actualmente laborando en los invernaderos de Villa Guerrero, Estado de México.

Grupo no expuesto: Hombres de cualquier edad fértil, de la comunidad universitaria que no estén expuestos laboralmente a plaguicidas y decidan cooperar voluntariamente en el estudio.

#### Criterios de exclusión

Hombres de ambos grupos que en el momento del muestreo tengan algún padecimiento crónico y/o enfermedad.

Hombres de ambos grupos con problemas de fertilidad y que se encuentren bajo tratamiento hormonal.

#### Criterios de Eliminación

Resultados confusos. Muestras hemolizadas, mal tomadas o insuficientes.

#### *Análisis estadístico*

Se analizaron los datos según su distribución. Para los datos no paramétricos se aplicó la prueba de U de Mann-Whitney para determinar diferencias entre el grupo expuesto y no expuesto para los parámetros de movilidad, recuento, pH, volumen seminal. Para el recuento de espermatozoides normales y anormales se empleó la prueba de Shapiro-Wilk.

Se evaluó el daño al ADN espermático mediante la medición de tail moment en los individuos expuestos y no expuestos empleando la prueba de U de Mann-Whitney.

Se realizó la prueba de chi cuadrada ( $X^2$ ) para determinar la posible asociación entre los polimorfismos de GSTM1 y GSTT1 en los grupos en estudio.

Las pruebas se realizaron con el programa Sigma-Plot 12.0 Systat Software Inc.



**Efecto de la exposición laboral a plaguicidas sobre la calidad espermática, daño al ADN y su asociación con los polimorfismos de GST**

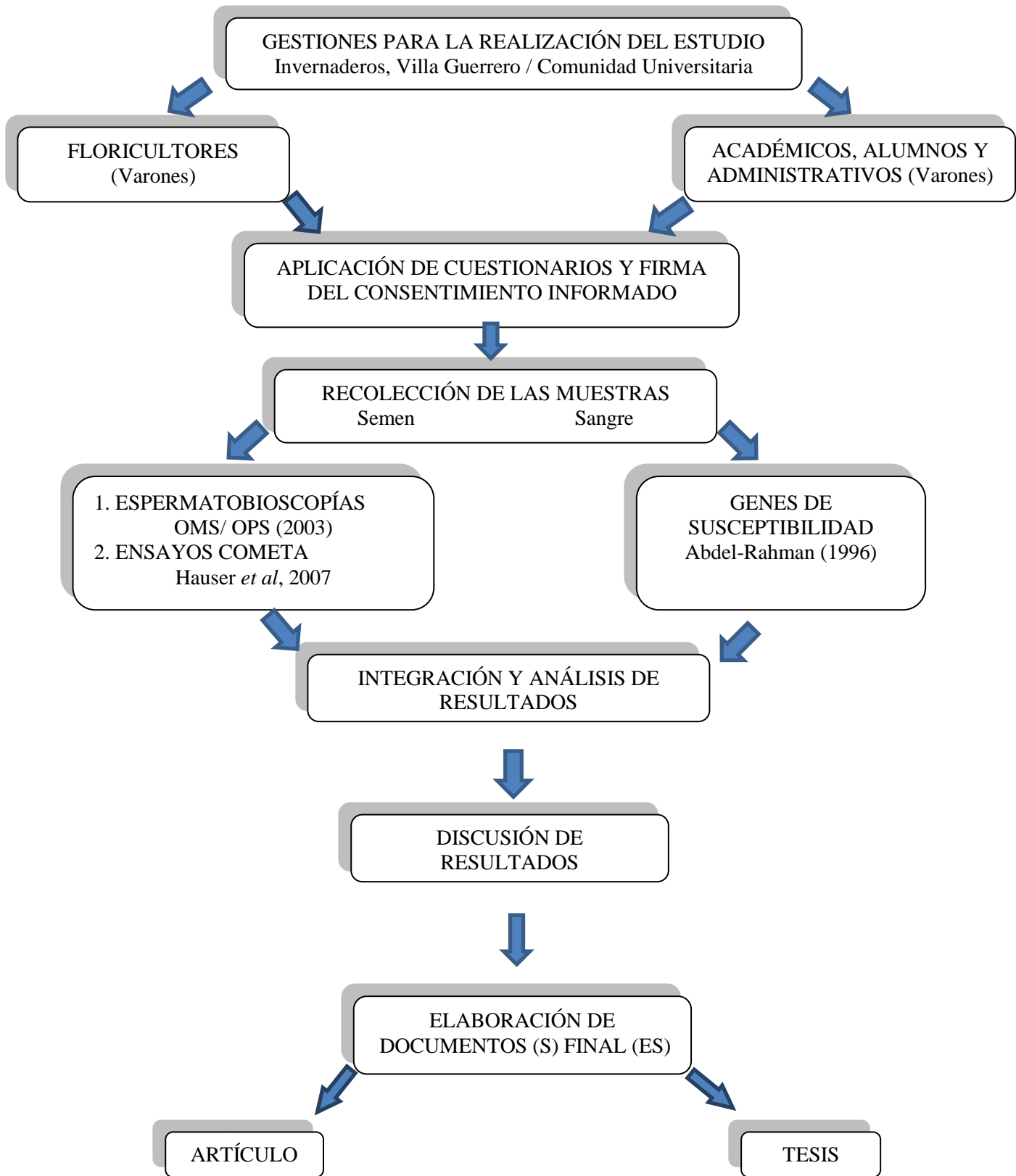


Figura 9. Secuencia metodológica.



## II.1. Espermátobioscopía

Una vez obtenida la muestra de semen se procedió a la realización de los siguientes exámenes:

### *Examen macroscópico*

En este análisis se anotaron las características físico-químicas de la muestra (aspecto, color, pH, volumen, viscosidad y tiempo de licuefacción), señaladas por la OMS-OPS (2010) (5), considerando los siguientes valores de referencia:

1. Color: gris opalescente, blanco purulento, amarillento o marrón
2. Volumen: > a 2 mL
3. Viscosidad: 5-10 mm
4. Tiempo de licuefacción: Parcial o Total
5. pH: 7.2 - 8.0

### *Examen microscópico*

1. Movilidad: Se realizó una preparación en fresco de aproximadamente 10  $\mu\text{L}$  de semen sobre un portaobjetos. Se analizó al microscopio caracterizando el tipo de movimiento de 100 espermatozoides y se reportó en %, basándonos en los siguientes criterios:

Tabla 8. Tipos de movilidad espermática y sus características.

Tipo de movilidad	Características
Grado a-b: Progresiva rápida	Movimiento rectilíneo, rápidos, recorren más de 25 $\mu\text{m/s}$ .
Grado c-d: No progresiva	No desplazamiento del espermatozoide pero si movilidad flagelar o inmovilidad.

2. Morfología: Se realizó un frotis con 10  $\mu\text{L}$  de semen , se contaron 100 espermatozoides y se reportó en porcentaje las características morfológicas
  - a) Cabeza: doble, aumentada, diminuta, en forma de alfiler
  - b) Cuello: doble
  - c) Cola: doble, corta, larga, sin cola



3. Recuento de espermatozoides: Se hizo una dilución 1:20 con solución de Macomber y Saunders. Se colocó en una cámara de Neubauer para su conteo.
4. Efectuar los cálculos y reportar en No. de espermatozoides  $\times 10^6/\text{mL}$  (61).

La Figura 10 muestra la cámara de Neubauer y sus partes, la cual sigue siendo el instrumental más usado para el recuento espermático. Consta de 2 placas de vidrio, entre ellas se puede alojar un volumen conocido, consta de un canal transversal y cuatro canales longitudinales.

A. Cámara de Neubauer. B. Cuadrícula de dimensiones conocidas y que es visible al microscopio óptico para realizar el conteo celular.

C. Cámara con un cuadro de 4x4 y otros cuadros dentro de este que también son de 4x4 pero más pequeños, los recuadros en rojo muestran las áreas en donde se cuentan las células espermáticas, se suman y se multiplican por un millo.

D. Para contar células espermáticas se agrega una gota de la dilución 1:20 de semen-formol en el borde del cubre, rellenando la cámara de recuento por capilaridad, esperar unos minutos para que se sedimenten los espermatozoides en el fondo y se pueda empezar a leer al microscopio.

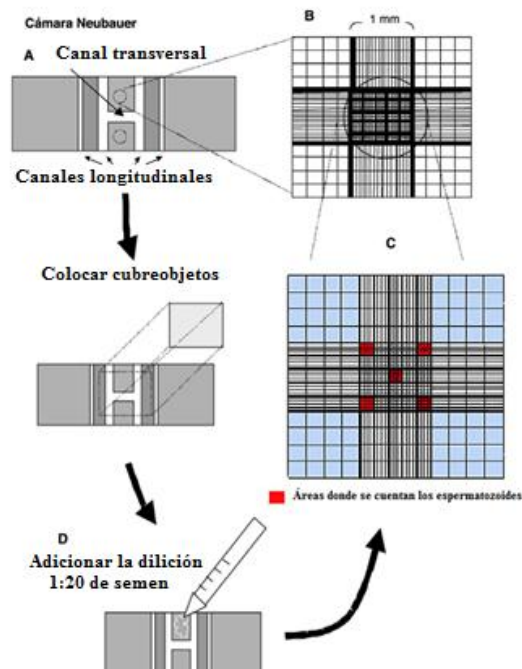


Figura 10. Cámara de Neubauer.



## II.2. Ensayo cometa

Se tomó como realizaron modificaciones al método de Hauser *et al*, 2007, el cual consta de las siguientes etapas:

**Preparación de las laminillas de agarosa:** Cada laminilla se cubrió con 2 capas de agarosa Electroendoosmosis (EEO).

**Preparación de la muestra:** Se preparó una dilución 1:20 de semen con BTS (Betsville Thawing Solution), embebiendo 100  $\mu$ L de la misma con 100  $\mu$ L de agarosa de bajo punto de fusión sobre las laminillas previamente preparadas.

**Lisis de las células para la liberación del ADN:** Se sumergieron las laminillas en la solución de lisis (2.5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub> EDTA, 10 mM TRIS, 1% Na Sarcosinato, DMSO 10 % y 1% TRITON x100) durante 1 hora en el refrigerador a 4°C. Posteriormente se colocaron en una segunda lisis con Dithiothreitol 0.005mM, Proteinasa K (10 mg/mL) por 18 horas en una cámara húmeda a 37°C.

**Tratamiento alcalino para el relajamiento del ADN y la expresión de rupturas:** Las laminillas se pusieron en la cámara de electroforesis, sumergidas en una solución de corrimiento (300 mM NaOH, 1mM Na<sub>2</sub> EDTA) con un pH mayor a 13 y se dejaron por 20 minutos para permitir el desenrollamiento del ADN.

**Electroforesis en condiciones alcalinas:** La electroforesis se llevó a cabo a 20 V (0.73 V/cm) y 300 mA a pH mayor a 13 por 15 minutos.

**Neutralización del medio básico:** Colocar las laminillas en una charola y enjuagar cada una dos veces con solución TRIS (0.4 M TRIS pH 7.5).

**Tinción y análisis de las laminillas:** Cada laminilla se tiñó con 60  $\mu$ L de bromuro de etidio y se analizó en un microscopio de fluorescencia. Se midió el tail moment de cada célula. Cada muestra se montó por duplicado y en cada laminilla se leyeron 50 células (101).



### II.3. Genotipificación: GSTM1, GSTT1

**Extracción de ADN:** Se utilizó el paquete de extracción de ADN Zymo Research Zr Genomic DNA II, el cual consta de los siguientes pasos:

1. Lisar la muestra de sangre con 400  $\mu$ L de Genomic Lysis Buffer.
2. Romper las membranas en un vórtex de 4 a 6 segundos.
3. Separar los componentes celulares por medio de una centrifugación a 10 000 rpm por 1 minuto.
4. Colocar la 200  $\mu$ L solución de lavado (DNA Pre-Wash Buffer) para limpiar el ADN
5. Centrifugar a 10 000 rpm por un minuto.
6. Adicionar 250  $\mu$ L de g-DNA Wash Buffer para terminar de limpiar el ADN.
7. Centrifugar un minuto a 10 000 rpm.
8. Eliminar ARNasas de la muestra colocando 50  $\mu$ L de DNA Elution Buffer a 60°C e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
9. Centrifugar 45 segundos a 14 500 rpm.

Una vez extraído el ADN se cualifica por medio de una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1 %, por 30 minutos a 100 V/35 A. Las muestras fueron congeladas a menos 79°C hasta la realización de la amplificación.

#### **PCR**

Para el desarrollo de la PCR se siguió el procedimiento de Abdel-Rahman (1996) con modificaciones de Soto Quintana (7), para detectar la presencia o ausencia de los genes GSTM1 y GSTT1, empleando ambos indicadores específicos en la mezcla de amplificación y también con los iniciadores del gene CYP1A1, gen constitutivo que sirve como control positivo.

En la Tabla 9 se muestra la secuencia de los iniciadores de cada gene y el tamaño del producto de amplificación.



Tabla 9. Secuencia de los iniciadores de los genes GSTT1, GSTM1 y CYP1A1.

Gene	Iniciadores	Amplicon
<b>GSTT1</b>		
f	5'- TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC-3'	480 pb
r	5'-TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA-3'	
<b>GSTM1</b>		
f	5' GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C 3'	215 pb
r	5' GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G 3'	
<b>CYP1A1</b>		
f	5' GAA CTG CCA CTT CAG CTG TCT 3'	312 pb
r	5' CAG CTG CAT TTG GAA GTG CTC 3'	

Abdel-Rahman, 1996.

En la Tabla 10 se señalan los reactivos que se emplean para la realización de la master mix.

Tabla 10. Reactivos empleados por muestra en la mezcla de amplificación.

Reactivos	Cantidad ( $\mu$ L)
Agua desionizada	7.1
5x Buffer PCR	5
MgCl <sub>2</sub> (2mM)	3.5
dNTPs (50 $\mu$ M)	1
CYP1A1 <sub>foward</sub> (30 pM)	1
CYP1A1 <sub>reverse</sub> (30 pM)	1
GSTM1 <sub>foward</sub> (30 pM)	1
GSTM1 <sub>reverse</sub> (30 pM)	1
GSTT1 <sub>foward</sub> (30 pM)	1
GSTT1 <sub>reverse</sub> (30 pM)	1
Taq polimerasa (5U/ $\mu$ L)	0.4
DNA	2
Volumen final de la muestra = 25 $\mu$ L	

Abdel-Rahman, 1996.

Cada tubo se colocó dentro del Termociclador para llevar a cabo la PCR bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, desnaturalización a 95°C por 45



segundos, alineación a 59°C por 45 segundos, extensión a 72°C por 45 segundos y extensión final a 72°C por 7 minutos, por 35 ciclos de amplificación.

**Electroforesis:** Los productos de amplificación de la PCR se corrieron en campo eléctrico un gel de agarosa al 2 % a 100 volts, 35 Amperes por 60 minutos.

**Tinción:** Se tiñeron con una solución de bromuro de etidio al 2% por 15 minutos y se revela en el trasluminador.

**Lectura:** La presencia o ausencia del fragmento específico de GSTT1 y GSTM1 se detectó por la presencia o ausencia de las siguientes bandas, como se muestra en la figura 11:

1. Control de la PCR: El gen CYP1A1 con una banda de 312 pb
2. GSTT1: Con una banda de 480 pb
3. GSTM: Con una banda de 215 pb (7).

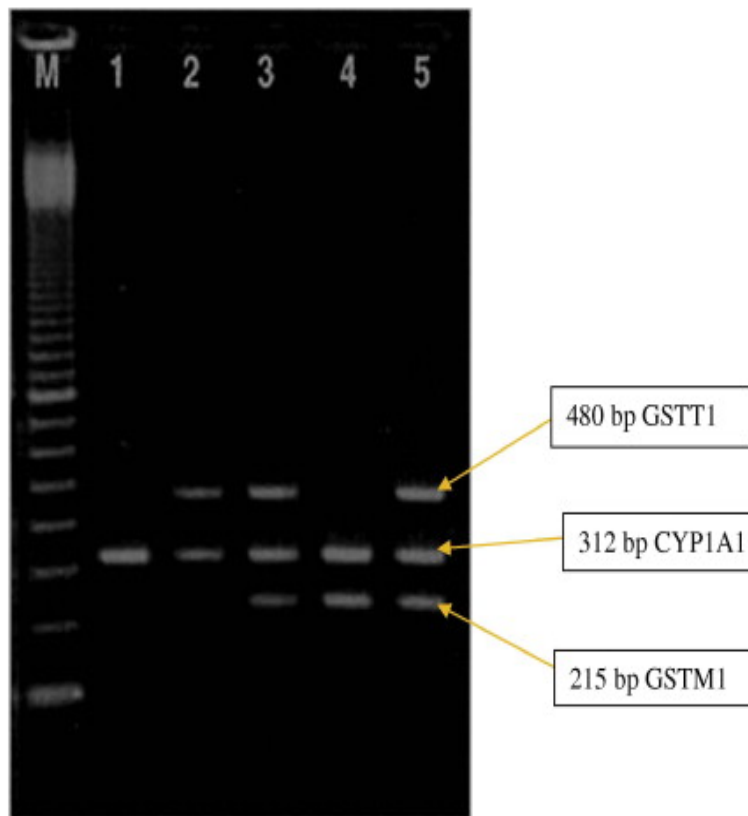


Figura 11. Gel de agarosa que muestra las bandas de los genes GSTT1, GSTM1 y CYP1A1.





Carril 1. Control de la PCR: gen CYP1A1, banda de 312 pb.

Carril 2. GSTT1, banda de 480 pb.

Carril 4. GSTM1, banda de 215 pb.

Carril 3 y 5. Muestras positivas para GSTT1 y GSTM1.

Los detalles de cada procedimiento se encuentran en los anexos A, B y C.



### III. RESULTADOS

#### *Resultados a publicar: Artículo científico*

RV: Submission Confirmation



Dr. Jorge Serment Guerrero 24/01/2014  
Para: Grace M Luna

Acciones

-----Mensaje original-----

De: ees.mutgen.0.25f431.610a6302@eesmail.elsevier.com [mailto:ees.mutgen.0.25f431.610a6302@eesmail.elsevier.com] En nombre de Mutation Research  
Enviado el: lunes, 16 de diciembre de 2013 03:30 p.m.  
Para: Jorge Humberto Serment Guerrero; serment6@hotmail.com  
Asunto: Submission Confirmation

Dear Dr. Serment-Guerrero,

Your submission entitled "Improved procedure to assess DNA breakage in spermatozoa by means of the comet assay" has been received by Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/mutgen/>.

Your username is: jorge.serment@inin.gob.mx

If you need to retrieve password details, please go to: [http://ees.elsevier.com/MUTGEN/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/MUTGEN/automail_query.asp)

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System  
Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis



**Improved procedure to assess DNA breakage in spermatozoa by means of the comet assay**

**Martínez-Luna G<sup>a</sup>, Serment-Guerrero J<sup>b\*</sup>, Castillo-Cadena J<sup>a</sup>.**

<sup>a</sup>Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón esq. Paseo Tollocan s/n, CP 50100, Toluca, Estado de México.

<sup>b</sup>Departamento de Biología, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Carretera México Toluca S/N, La Marquesa, Ocoyoacac, México

\*Corresponding author

Postal address: Apartado Postal 18-1027, CP 11801, México DF. México.

Email address: [jorge.serment@inin.gob.mx](mailto:jorge.serment@inin.gob.mx).

Phone: +52 5329 7230:

Fax: + 52 5329 7387.

**KEYWORDS:** Genotoxicity; spermatozoa; comet assay.



## ABSTRACT

The comet assay is a relatively inexpensive, fast, sensitive and reliable method to detect DNA breakage upon individual cells. The most widely used cell type in this technique is lymphocyte, because they are easy to obtain and handle, and because they are continually exposed to xenobiotics that enter into the body. However, is important to consider the possibility to use other cell types for very specific purposes. Sperm cells are of special interest because they could be used as a biomonitor to risk assessment in populations occupationally exposed to xenobiotics. Besides, the fact that there are not functional DNA repair mechanisms in these cells could increase the sensitivity of the system. We have improved the comet assay methodology to determinate DNA breakage in sperm cells with reliable results.



## 1. Introduction.

Genotoxicity is defined as any change in basic DNA chemical structure as a result of the interaction of harmful chemical or physical agents with genetic material. These changes will finally lead to three possible outcomes: cell death, total repair or imperfect repair that may result in the appearance of mutations. Those genetic alterations would be transmitted to subsequent generations through germ cells such as sperm (Clayson, *et al.*, 1992). Thus, it is imperative to assess and identify xenobiotic agents capable of producing such DNA damage. Genotoxicity bioassays are usually employed to evaluate the risk to human, health in order to establish prevention and control regulations (Cortinas, *et al.*, 1990).

One of the most popular genotoxicity tests is the single cell gel microelectrophoresis, commonly called comet assay, a sensitive, fast and inexpensive method to examine DNA breakage in individual cells (Berwick, *et al.*, 2000; Collins, 2004). This assay has positioned itself in a privileged position into the battery of biomonitoring studies used to evaluate hazardous agents in environmental toxicology (Hartman, *et al.*, 2003), in occupational exposure to xenobiotics and as a biomarker capable to demonstrate dose-effect relationships (Jakubowski and Trzcinka-Ochocka, 2005).

The comet assay allows the detection of single or double strand DNA breakage or alkaline-labile sites in individual cells, with relatively high sensitivity. Briefly, cells are mixed with low melting point agarose (LMP) to form a microgel on top of a microscope slide and then lysed *in situ* to remove all cellular membranes and proteins. Then, slides are put into an electrophoresis cell and a voltage is applied. Fragmented DNA will migrate out of the lysed cell towards the anode (Nadin, *et al.*, 2001), forming a structure similar to a “comet” (Hughes, *et al.*, 1996; Collins, 2004).



Although a wide range of cell types can be used, lymphocytes has been traditionally used in this techniques, because of the ease to obtain and also because these cells are circulating in the peripheral blood as part of the immune response; therefore they are continually exposed to xenobiotics that enter into the body either through the skin, oral, digestive or respiratory mucosae, so a high degree of DNA damage could be assessed by these cells (Moller, *et al.*, 1989; Orson, *et al.*, 1989; McCarthy, *et al.*, 1990; Rödl, *et al.*, 1990). Indeed, the damage to individual somatic cells such as lymphocytes, as measured by the comet assay, detects changes in DNA structure that can lead to genomic instability.

In germ cells, such as spermatozoa, which carry genetic information passed from one generation to the next, is important to evaluate individuals with occupational exposure to detect possible DNA damage that could lead to malformations in future generations. Another possible advantage in using this kind of cells is that they can be considered as packages of DNA, so for *in vitro* test repair events could be avoided, increasing the sensitivity of the system. However, even though several methodologies have been reported, we couldn't reach consistent results with any of them, therefore we tried to improve the protocol proposed by Hauser, *et al.*, (2007) for comet assay with human spermatozoa, making changes that permit obtaining reliable results.

## 2. Material and methods.

The procedure for evaluation of DNA damage in human sperm with the general modifications is shown below.

### 2.1 Chemicals and solutions.

Glucose, KCl and NaOH were purchased from J.T. Baker; NaCl was from BDH; Dithiothreitol was from Gibco BRL; Proteinase K was from Thermo Lab, and the rest of



chemicals were purchased from Sigma-Aldrich. Casiopeina III-Ea was synthesized, purified and provided by Dr. Lena Ruiz-Azuara, from the school of Chemistry, UNAM (Ruiz-Ramírez, *et al.*, 1991; Ruiz-Azuara, 1993). A 100 mM stock solution of the casiopeina was prepared in 1% DMSO, and subsequent dilutions were made in sterile milliQ water. Previous results indicate that Casiopeina III-Ea has genotoxic activity and produce DNA breakage in lymphocytes and *Hella* cells (Serment-Guerrero, *et al.*, 2011).

## 2.2 Semen sample collection.

Semen was obtained by masturbation after a recommended abstinence period of 48 hours, and collected in a sterile plastic cup. Liquefaction was performed at 37°C for 60 minutes, and semen was diluted 1:20 in BTS (Glucose 0.2M; Na<sub>2</sub> EDTA 3 mM; NaHCO<sub>3</sub> 0.015 M; Citrate Na<sub>3</sub>.2H<sub>2</sub>O 0.02 M and KCl 0.01 M, pH 7.2), (Medina-Robles, *et al.*, 2008; Mapeka, *et al.*, 2012), and frozen at -20°C (Pursel, *et al.*, 1975) for later analysis. When needed, samples were thawed by gently shaking in a water bath at 37°C for 10 minutes and semen was immediately processed for comet assay.

## 2.3 *In vitro* exposure and treatments

Inducing damage in spermatozoa, to be demonstrated by the comet assay, placed 180 µL of 1:20 sperm-BTS dilution (10 µL of semen with 190 µL of BTS), in a microtube with 10 µL of Casiopeina III-Ea (each sample was made in duplicate), the mixture was then incubated in a 37°C water bath for 30 minutes and centrifuged for 10 minutes at 2,500 rpm, the supernatant was discarded and the pellet suspended in 180 µL BTS.



#### 2.4 Comet assay.

Clear slides were previously prepared with 90  $\mu$ L of Type I: Low EEO agarose at 0.6 % and let too dry at 37°C, then a second layer was applied the drying step was repeated.

Cell suspension was mixed with an equal volume of 1% low melting point agarose to reach a final concentration of 0.5%, then 90 $\mu$ L were applied on previously prepared slides and topped with a cover slip, placed on a metal tray and placed to solidify in the refrigerator for 5 minutes. Afterwards, cover slip was removed and slides were immersed in cold lysing solution (2.5 M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM Na<sub>2</sub>.EDTA, 10% DMSO, 1 % N-lauroyl sarcosine, 1% Triton X-100, pH 10.0) for 1 hour. Afterwards, slides were withdraw from the lysis solution and 60  $\mu$ L of a solution of proteinase K (1 mg/mL) and DTT (77.1  $\mu$ g/mL) in the same lysis solution reported above were applied and incubated overnight (18-20 hours) at 37°C in a humidity chamber. Slides were placed on a horizontal electrophoresis cell, covered with electrophoresis solution (0.3 M NaOH, 0.1 mM Na<sub>2</sub>.EDTA; pH 12.0) for 20 minutes to allow DNA unwinding and then a current was applied (20 V, 300 mAmp, 15 minutes at 4°C).

Later, slides were removed from the electrophoresis chamber, gently rinsed three times with neutralization buffer (0.4 M Tris-HCl; pH 7.5), staining with 60  $\mu$ L of ethidium bromide (20  $\mu$ g/ml) and finally observed under a Hund Wetzlar epifluorescence microscope with a 40x objective using a 515-560 nm (green light) exciting filter. Two slides were prepared for each treatment. One hundred randomly selected cells were scored by means of the Comet Assay IV Analyzer (Perceptive Instruments Inc.). DNA breakage was evaluated





as percentage of cells with fragmented DNA and/or tail moment, which is the relation between comet tail length and DNA fluorescence intensity (Collins, 2004).

### 3. Results and discussion

In our laboratory we are interested in monitoring the effect of xenobiotics in spermatozoa from occupationally exposed population, so it was essential to have a reliable comet assay procedure to assess DNA breakage. However, when we used the standard methodology report by Singh we did not obtain good results. We tried then to use the one reported by Hauser (2007), specifically designed for spermatid cells, unsuccessfully. Therefore, we decided to try to improve the procedure to make it functional for our needs.

In first place, we implement the use of clear slides, to reduce the background noise caused by the different layers of agarose on fully frosted slides. Hauser used a first layer of normal agarose, a second layer of LMP mixed with cells and a final third layer of LMP (as proposed earlier by Tice, *et al.*, 2000) to ensure that sperm are confined to the slide. In this work, we used two layers of Type I: Low EEO; once dried, the agarose crystals serve as a frosting that allow the next layer of LMP agarose to become firmly attached to the slide. Another advantage of using this technique is that the preparation of slides is faster, so treated cells can go into the lysis solution in less time.

The lysis solution reported by Tice is quite functionally for lymphocytes and some other cell types, however it doesn't work for spermatid cells, since spermatozoa have a plasmatic membrane with a unique lipid and protein composition allowing for very little or no substance exchange, therefore it is necessary to use a mucolytic agent capable of lysing these cells to liberate the genetic material (Davies, 1999). This is why, Hauser proposed a



lysis procedure in which the use of RNase and proteinase k were included. We considered unnecessary the use of RNase and introduced an additional treatment with dithiothreitol (DTT). At first, the technique was implemented using only proteinase K, but lysis did not occur, therefore we decided to add DTT as a mucolytic agent, which is able to disrupt the protein disulfide bonds (-SS-) that are present in sperm, allowing fully deployment and separation of protein subunits of a multimeric protein. Dithiothreitol is routinely used in DNA extraction for forensic purposes to make accessible the chromatin of the sperm head (González-Estrella, *et al.*, 1994; Bartmzt, *et al.*, 1994). The amount of DTT seems to be very important; at first we added DTT and proteinase k straight into the lysis solution for 60, 90, 120 and 180 minutes, unsuccessfully. Besides, the addition of DTT in the lysis solution increased dramatically the cost of the assay, so we decide to apply a DTT/proteinase k solution directly on the slides after 1 hour in standard lysis solution, and further incubate them for 18-20 hours in a humidity chamber at 37°C. Under microscope we found images that resembled "smashed" cells instead of comets (figure 1), indicating that lysis actually occurred but DNA migration did not, most probably because the electric charge of the DTT interfered with the negative charge of DNA.

We tried several concentrations of DTT; when a 0.001mM solution or lower, lysis did not happen, in the other hand at concentrations of 0.1 mM or higher DNA migration was no good. At 0.005 mM of DTT lysis was excellent and so was DNA migration. In figure 2 can be observed the comet images obtained after an *in vitro* incubation using a DTT (0.005 mM)/proteinase k (1mg/ml) solution.



Another parameter that changed in this work was the diluent used for semen. Hauser used the classical PBS solution; however, in our conditions controls were not good, with more than ten percent of comets in untreated cells, so results could not be trustworthy. Then we tried the BTS solution reported by Pursel (1976) with a dual advantage, since it acts as a handling solution and is excellent for freezing preservation of semen. Indeed, frozen cells with more than three weeks at  $-70^{\circ}\text{C}$ , produced results in the comet assay that were highly correlated with results from freshly obtained samples.

It has to bear in mind that cell concentration is an important issue in this technique, since too many cells will result in comet overlapping and too few will take too long for scoring. In average the samples used in this work has  $7 \times 10^7$  cells/mL, we routinely use a 1:20 dilution of the ejaculated in BTS and from there 100  $\mu\text{L}$  were used per treatment, reaching a final concentration of  $1 \times 10^5$  cells/mL approximately.

Finally, electrophoresis time was also adjusted. The original procedure indicated 20 minutes at 20 V (300 mA), however, spermatozoa are haploid cells (n) with half the genetic material contained in any other cell type. When we use 20 minutes for migration we obtained long tails but a low tail moment value and dose response correlation was not good, so we decided to reduce the electrophoresis time to 15 minutes with good results (Fig. 3).

To verify the optimal performance of the methodology described above we decided to use a molecule recently reported as an actual genotoxic, Casiopeina III-Ea ([Cu (4, 7-dimethyl-1, 10-phenanthroline) acac] NO<sub>3</sub>), figure 4). Casiopeina is the generic name of a group of compounds, with a central cooper atom bound to organic ligands designed to be used as



antineoplastics. Different concentrations of CasIII-Ea were apply to as suspension of spermatozoa diluted in BTS for 30 minutes at 37°C, then mixed with LMP agarose and lysed as described above. Experiments were scored by means of the Comet Assay IV (Perceptive Instruments, UK) and tail moment was taken into account. Under microscope, we found comets in which tail increased along with the concentration, as can be seen in figure 5.

The results confirmed the genotoxic activity of CasIII-Ea and, moreover, showed that this improved methodology is more sensitive than when lymphocytes are used, most probably because of the lack of DNA repair mechanisms in spermatic cells.

#### **4. Conclusions**

The results so far indicate that the improvements to the methodology proposed by Hauser show DNA damage in spermatic cells. Apply a solution of dithiothreitol/proteinase k directly on the slides permitted an optimal disruption of spermatic cells membrane without teasing cost of the assay. Due to relatively low amount of DNA in spermatic cells the tail moment was no representative parameter for genotoxicity since, as stated above, genetic material in the tail was too dispersed. By reducing the electrophoresis time to 15 minutes, we could find a good correlation between tail moment and the dose applied. This was demonstrated by the use of CasIII-Ea; results showed an increase in tail moment along with the concentration of this compound. In our conditions, the use of spermatic cells seems to increase the sensitively of the comet assay, compared with others types of cells.



## 5. Conflict of interest

The authors declare that there is not conflict of interest concerning this manuscript.

## 6. Acknowledgements

This project was partially funded by the UAEMex, Project Agreement No. 3107/2011 and by the Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares.

## 7. References

Bartmazz, M.J., Karabinus, D., Dalkin, B.L., 1994. Dithiothreitol effects of human sperm quality. *The Journal of Urology*. 52(2), 2287-2290.

Berwick, M., Vineis, P., 2000. Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review. *Journal of the National Cancer Institute*. 92(11), 874-897.

Bravo-Gómez, M.E., García-Ramos, J.C., Gracia-Mora, I., Ruíz-Azuara, L., 2009. Antiproliferative activity and QSAR study of cooper (II) mixed chelate [Cu(N-N)(acetylacetonato)] NO<sub>3</sub> and [Cu(N-N)(glycinato)] NO<sub>3</sub> complexes, (Casiopinas ®). *Journal of Inorganic Biochemistry*. 103(2), 299-309.

Clayson, D.B., Grant, D.L., 1992. The assessment of mutagenicity. Health protection branch mutagenicity guidelines. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 21, 15-37.

Collins, A.R., 2004. The comet assay for ADN damage and repair. *Molecular Biotechnology*. 26, 249-261.

Cortinas, N.C., Aguirre, E.J., 1990. Cáncer y ambiente, bases epidemiológicas para su investigación y control. *Modulo Carcinogénesis*. Centro Panamericano de Ecología



Humana y Salud, Programa de Salud Ambiental, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de La Salud. México.

Davies, Morel, M.C.G., 1999. Equine artificial insemination. Wallingford, Oxon: CAB International.

González-Estrella, J.A., Coney, P., Ostash, K., Karabinus, D., 1994. Dithiothreitol effects on the viscosity and quality of human semen. *Fertility and sterility*. 62(6), 1238-1246.

Hartmant, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, B., Tice, R.R., 2003. 4<sup>th</sup> International Comet Assay Workshop. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay. *Mutagenesis*. 18, 45-51.

Hauser, R., Meeker, J.D., Singh, N.P., Silva, M.J., Ryan, L., Duty, S., Calafat, A.M., 2007. DNA damage in human sperm is related to urinary levels of phthalate monoester and oxidative metabolites. *Human Reproduction*. 22(3), 688–695.

Hughes, C.M., Lewis, S.E., McKelvey-Martin, V.J., Thompson, W., 1996. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Molecular Human Reproduction*. 2(8), 613-619.

Jakubowski, M., Trzcinka-Ochocka, M., 2005. Biological monitoring of exposure: trends and key developments. *Journal of Occupational Health*. 47, 22-48.

Mapeka, M.H., Lehloenya, K.C., Nedambale, T.L., 2012. Comparison of different extenders and storage temperature on the sperm motility characteristics of Kolbroek pig semen. *South African Journal of Animal Science*. 42(Issue 5, Supplement 1), 530- 534.

McCarthy, M.A., Michalsky, J.P., Sears, E.S., McCombs, C.C., 1990. Inhibition of polyamine synthesis suppresses human lymphocyte proliferation without decreasing



cytokine production of interleukine 2 receptor expression. *Immunopharmacology*. 20(1), 11-20.

Medina-Robles, V.M., Pérez-Duarte, B.A., Cruz-Casallas, P.E., 2008. Efecto de la incubación postdescongelación sobre la calidad de espermatozoides crioconservados de cerdo. *Orinoquia*. 12(2), 149-161.

Moller, J., Hoffman, B., Langhoff, E., Damgård-Jacobsen, K., Odum, N., Dickmeiss, E., Ryder, L.P., Thastrup, O., Scharff, O., Foder, B., 1989. Immunodeficiency after allogenic bone marrow transplantation in man. Effect of phorbol ester (phorbolmyristate acetate) and calcium ionophore (A23187) *in vitro*. *Scandinavian Journal of Immunology*. 30(4), 441-447.

Nadin, S., Vargas-Roig, L.M., Ciocca, D.R., 2001. A silver staining method for single-cell gel assay. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 49(9), 1183-1186.

Orson, F.M., Saadeh, C.K., Lewis, D.E., Nelson, D.L., 1989. Interleukin 2 receptor expression by T cells in human aging. *Cellular Immunology*. 124(2), 278, 291.

Pursel, V.G., Johnson, L.A., 1975. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal of Animal Science*. 40, 99-102.

Rödl, S., Fuchs, G., Khoshsorur, G., Iberer, F., Tscheliessnigg, K.H., 1990. Lipoprotein-induced modulation of cyclosporine-a-mediated immunosuppression. *European Journal of Clinical Investigation*. 20(3), 248-252.

Ruíz-Azuara, L., 1993. US Patent, Ap. 21 (1992), No.5,107,005; US Patent, Re 35,458, February 18 (1997); US, Patent November 19 (1996), No. 5,576,326, 407543 SECOFI.

Ruíz-Ramírez, L., Gracia, M.I., Moreno, E.R., Gasque, L., Huerta, L., Mayet, L., Ortiz, V., Lomeli, C., 1991. The antitumor activity of several transition metal complexes. *Journal of Inorganic Biochemical*. 43, 615.



Serment-Guerrero, J.H., Cano-Sánchez, E., Reyes-Pérez, F., Velázquez-García, M.E., Bravo-Gómez, L., Ruíz-Azuara, L., 2011. Genotoxicity of the cooper antineoplastic coordination complexes casiopeinas<sup>®</sup>. *Toxicology in vitro*. 25, 1377.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 35, 206-221.

#### Figure captions

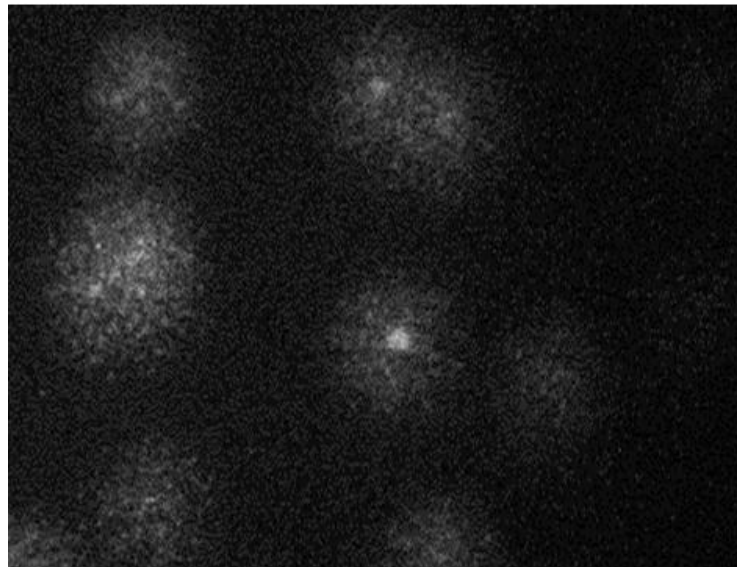


Figure 1. Images resembling smashed cells when a relatively high concentration of DTT is used during cell lysis.





Figure 2. Comets obtained when spermatozoa were lysed with 60ml of a DTT (0.005 mM)/proteinase K (1 mg/ml) solution and incubated overnight .

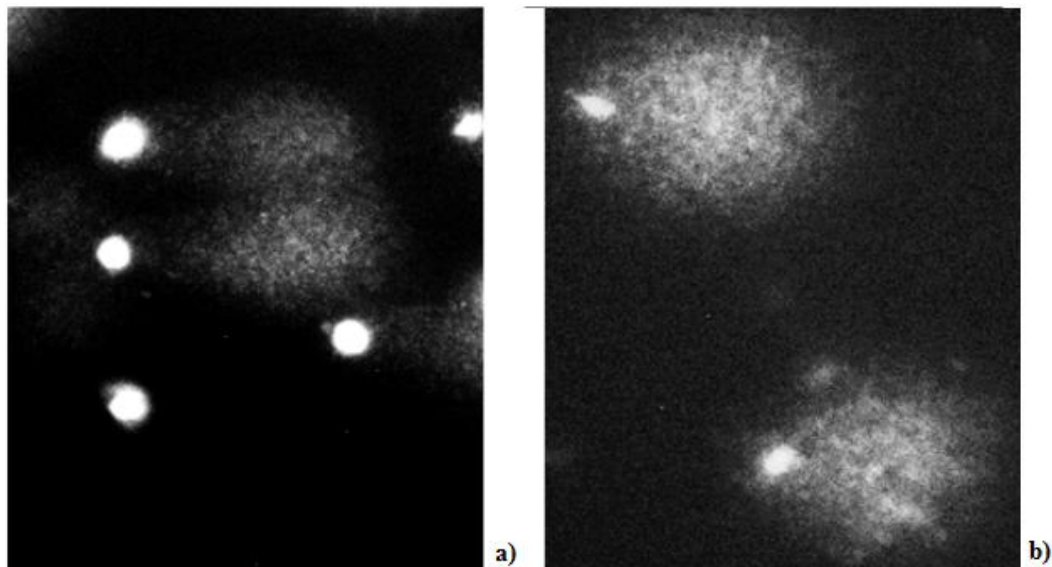


Figure 3. Comparison between comets obtained with different times of electrophoresis. a) 20 minutes; b) 15 minutes.



Figure 4. Chemical structure of Casiopeina CasIII-Ea [Cu(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline)acac]NO<sub>3</sub> (Bravo-Gómez, *et al.*, 2009).

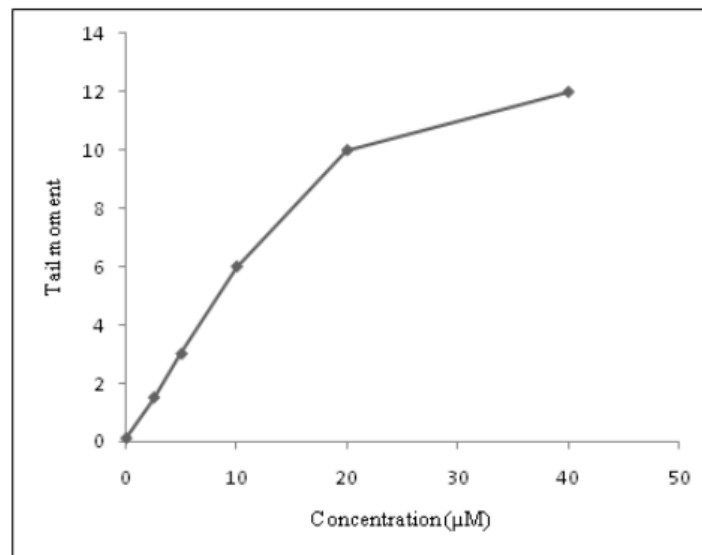


Figure 5. DNA breakage (expressed as tail moment) in spermatic cells produced by CasIII-Ea.



**Resultados no publicados.**

**1. Resultados sociodemográficos de los individuos en estudio**

Se obtuvieron muestras de 30 varones para cada uno de los grupos: expuestos y no expuestos.

Los individuos expuestos a plaguicidas: fueron provenientes de la comunidad de Villa Guerrero, Estado de México, mientras que los individuos no expuestos fueron pertenecientes a la comunidad universitaria de la UAEM en Toluca, Estado de México.

La edad promedio de los individuos fluctuó para el grupo expuesto entre 17 y 56 años, siendo el promedio 29 años; en los no expuestos el rango fue de 18 a 63 años, con un promedio de 27 años, ver Tabla 11.

Tabla 11. Edad de los individuos de los grupos en estudio.

Edad (años)	Expuestos	No Expuestos
15-20	6	3
21-25	6	15
26-30	5	7
31-35	7	3
36-40	2	1
41-45	2	
46-50	1	
51 o más	1	1
Edad Promedio	29	27

En cuanto al nivel de estudios, del grupo expuesto se obtuvieron los siguientes resultados: 13% tuvieron primaria incompleta, 27% primaria terminada, 13% secundaria incompleta y 24% terminada, 10% preparatoria incompleta, 7% preparatoria terminada y 3% licenciatura incompleta y 3% terminada. El nivel de estudios en el grupo no expuesto fue: 37% tuvieron licenciatura terminada, 34% fueron estudiantes de licenciatura, 13% con posgrado, 10% preparatoria terminada y el 3% secundaria terminada y preparatoria incompleta, ver Tabla 12.



Tabla 12. Nivel de escolaridad de los grupos expuesto y no expuesto.

	Expuestos	No expuestos
	%	%
Primaria incompleta	13	-
Primaria terminada	27	-
Secundaria incompleta	13	-
Secundaria terminada	24	3
Preparatoria incompleta	10	3
Preparatoria terminada	7	10
Licenciatura incompleta	3	34
Licenciatura terminada	3	37
Posgrado	-	13

La actividad laboral del grupo expuesto (Tabla 13) fue la floricultura, desempeñando labores tales como siembra (17%), desbotone (14%), corte (17%), realización de bonches (15%), fumigación (18%), deshierre (13%) y otras actividades como riego, abonar o empacar ocuparon un 6%.

Tabla 13. Actividad laboral del grupo expuesto.

Actividades realizadas	(%)
Siembra	17
Desbotone	14
Corte	17
Bonche	15
Fumigar	18
Deshierre	13
Otras	6

Como producto de la información obtenida de los cuestionarios, se identificaron los plaguicidas más empleados por los floricultores participantes en el estudio. Los aplican en forma de mezclas, en las cuáles pueden ir compuestos con diferente actividad biológica, de diferentes grupos químicos, con toxicidad y persistencia variables. En la Tabla 14 se muestran los plaguicidas utilizados, el nombre comercial, principio activo, grupo químico, actividad biológica y la clasificación toxicológica a la que pertenece cada uno.



**Efecto de la exposición laboral a plaguicidas sobre la calidad espermática, daño al ADN y su asociación con los polimorfismos de GST**

Tabla 14. Plaguicidas empleados por los floricultores.

Nombre comercial	Principio activo	Grupo químico	Actividad biológica	Clasificación toxicológica	No. de personas que los emplean
Lannate	metomilo	Carbamato	Insecticida	Sumamente tóxico	25
Manzate 200	maneb	Ditiocarbamatos	Fungicida	Ligeramente tóxico	22
Furadan	carbofuran	Carbamato	Insecticida	Sumamente tóxico	22
Tamaron	⊙metamidofos	Organofosforado	Insecticida	Moderadamente tóxico	21
Agrimec	abamectina	Lactona	Insecticida-Acaricida	Moderadamente tóxico	20
Ridomil Gold	metalaxil-M	Ácido éster metilpropionico	Fungicida	Ligeramente tóxico	18
Cascade	flufenoxuron	Acilureas	Insecticida	Ligeramente tóxico	16
Benlate	benomilo	Tiocarbamato	Fungicida	Ligeramente tóxico	15
Talstar	bifrentin	Carboximidias	Insecticida	Ligeramente tóxico	14
Nuvacron	⊙monocrotofos	Organofosforado	Insecticida-Acaricida	Sumamente tóxico	13
Tecto	tiabendazol	Benzimidazol	Fungicida	Ligeramente tóxico	13
Pentaclor 600F	⊙quintozeno	Clorobenceno	Fungicida	Ligeramente tóxico	12
Fungicel	mancozeb	Ditiocarbamatos	Fungicida	Ligeramente tóxico	11
Curacron 500EC	profenofos	Organofosforado	Insecticida-Acaricida	Sumamente tóxico	5
Omite	propargite	Éster de sulfito	Acaricida	Moderadamente tóxico	5
Proclaim 05 SG	emectina	Benzoato	Insecticida-larvicida	Ligeramente tóxico	3
Ziram	carbamato de zinc	Ditiocarbamatos	Fungicida	Ligeramente tóxico	2
Folpet	Folpet	Ftalamidas	Fungicida	Ligeramente tóxico	1
Folpan	N-[(tricloro metil)tio]ftalimida	Ftalamidas	Fungicida	Ligeramente tóxico	1
Saprol 200CE	triforine	Derivado piperazina	Fungicida	Ligeramente tóxico	1
Cupravit	oxicloruro de cobre	Cúpricos	Fungicida	Ligeramente tóxico	1
Zine Captan	captan	Benzimidazoles	Fungicida	Ligeramente tóxico	1
Rubigan	fenarimol	Pirimidina	Fungicida	Moderadamente tóxico	1
Sportak	procloraz	Imidazol	Fungicida	Ligeramente tóxico	1
Consist rox	trifloxystrobin tebuconazole	Triazoles	Fungicida	Ligeramente tóxico	1
Infinito	floupicolide	Carbamato	Fungicida	Ligeramente tóxico	1
Counter FC 15G	terbufos	Organofosforados	Insecticida- nematicida	Sumamente tóxico	1
Clorotalonil	clorotalonil	Bencenoderivado	Fungicida	Ligeramente tóxico	1
Biogib	ácido giberélico	Ácido giberélico	Fitohormona	Ligeramente tóxico	1
Lorsban 4 EC	clorpirifos	Organofosforado	Insecticida	Moderadamente tóxico	1

⊙ Plaguicidas prohibidos en otros países y empleados en México



Adicionalmente, con esta información se pudo identificar la frecuencia de uso de los plaguicidas en Villa Guerrero, Estado de México. Podemos mencionar al Lannate, Manzate 200, Furadan, Tamaron, Agrimec y Ridomil gold como los más utilizados, solos o en forma de mezclas.

En relación con el uso del equipo de protección por los floricultores de los cuestionarios se obtuvo lo siguiente: 41% informó emplear botas durante su jornada laboral, 23% utilizar mandil, 18% ocupar mascarilla y 9% guantes, gorra o sombrero, ver Tabla 15.

Tabla 15. Uso del equipo de protección por los floricultores.

Equipo de Protección	%
Botas	41
Mandil	22
Mascarilla	22
Guantes	11
Gorra o sombrero	4

En la Tabla 16 se muestra la actividad laboral de los individuos del grupo no expuesto, en donde el 64% fueron estudiantes, 24% empleados y 3% médicos, comerciantes, albañiles y microempresarios.

Tabla 16. Actividad laboral del grupo no expuesto.

Actividad laboral	%
Estudiante	64
Empleado	24
Albañil	3
Microempresario	3
Comerciante	3
Profesionista	3

En cuanto a la residencia, en la Tabla 17 se muestran los lugares en donde radican los individuos del grupo expuesto: San Felipe (34%), Villa Guerrero (23%), Tenancingo



(20%), Zumpahuacán (10%), Santa María Aranzazú (7%), Buenavista y Cantarranas con 3% cada uno.

Tabla 17. Lugar de residencia del grupo expuesto.

Municipio	%
San Felipe	34
Villa Guerrero	23
Tenancingo	20
Zumpahuacán	10
Santa Ma. Aranzazú	7
Buenavista	3
Cantarranas	3

En el grupo no expuesto el 50% fueron residentes de Toluca, 17% de Metepec, 15% del México, DF y 3% de San Mateo Atenco, Lerma, Taxco, Zitácuaro, Jalisco y Veracruz, ver Tabla 18.

Tabla 18. Lugar de residencia del grupo no expuesto.

Lugar de residencia	%
Toluca	50
Metepec	17
México, DF	15
San Mateo Atenco	3
Lerma	3
Taxco, Guerrero	3
Zitácuaro, Michoacán	3
Jalisco	3
Veracruz	3

## 2. Espermatobioscopías

En cuanto a los resultados obtenidos en las espermatobioscopías, los resultados de los diferentes parámetros fueron:

### Movilidad espermática

Se realizó el recuento del tipo de movilidad de 100 espermatozoides, clasificándolo en progresiva rápida y no progresiva, en las muestras del grupo expuesto y no expuesto, y se reportó el porcentaje en base con los criterios de la OMS mostrados en la Tabla 19:



Tabla 19. Criterios de movilidad. OMS, 2010.

Tipo de movilidad	Características
Grado a-b: Progresiva rápida	Movimiento rectilíneo, rápidos, recorren más de 25 $\mu\text{m/s}$ .
Grado c-d: No progresiva	No desplazamiento del espermatozoide pero si movilidad flagelar o inmovilidad.

#### Movilidad Progresiva Rápida (MPR)

Se midió la Movilidad Progresiva Rápida en los individuos expuestos y no expuestos, los promedios fueron 71.4% contra 83.8%, siendo los valores de las medianas de 71 y 86 respectivamente. Para identificar las diferencias entre ambos grupos se empleó la prueba de U de Mann-Whitney con un intervalo del 95 % de confianza, se encontró diferencia significativa con  $p < 0.001$ , ver Tabla 20.

#### Movilidad Progresiva Lenta (MPL)

Se midió la Movilidad Progresiva Lenta en el grupo de individuos expuestos y no expuestos, los promedios fueron de 28.6% y 15.2% y las medianas de 29 y 14 respectivamente, ver Tabla 20. Para ver las diferencias entre ambos grupos se empleó la prueba de U de Mann-Whitney con un intervalo del 95% de confianza, se encontró diferencia significativa, con  $p < 0.001$ .

#### Recuento espermático

Se calculó el recuento espermático en No. de espermatozoides  $\times 10^6/\text{mL}$  en ambos grupos. El promedio del grupo expuesto fue de  $66.3 \times 10^6/\text{mL}$  y el del grupo no expuesto de  $94.4 \times 10^6/\text{mL}$ . Se empleó la prueba de U de Mann-Whitney con un intervalo del 95% de confianza, para buscar diferencias entre ambos grupos, se encontró diferencia significativa, con  $p=0.006$ , ver Tabla 20.

#### pH

Se cuantificó el pH del semen en ambos grupos, ver Tabla 20. Los promedios obtenidos por grupo fueron de 8.13 y 8.2. Por medio de la prueba de U de Mann-Whitney con un





intervalo del 95% de confianza, se buscaron las diferencias de pH entre ambos grupos y no hubo diferencia significativa,  $p= 0.522$ .

#### Volumen seminal

Se analizó el volumen seminal de cada muestra en mililitros (ver Tabla 20), de los grupos expuestos y no expuestos siendo los promedios de 2.17 contra 2.6 y las medianas de 2 y 2.3 respectivamente. Por medio de la prueba de U de Mann-Whitney con un intervalo del 95% de confianza, se buscó diferencias entre ambos grupos, se encontró que no hubo diferencia significativa,  $p=0.454$ .

#### Recuento de espermatozoides normales

Se cuantificó el número de espermatozoides normales en el grupo de individuos expuestos (Promedio= 48.6%) y no expuestos (Promedio = 59.8%). Se empleó la prueba de Shapiro-Wilk, para comparar los promedios entre ambos grupos, se encontró diferencia significativa con  $p= <0.001$  (ver Tabla 20).

#### Recuento de espermatozoides anormales

Del mismo modo, se realizó el recuento de espermatozoides anormales en el grupo de individuos expuestos y no expuestos, encontrando valores promedio de 51.4% y 40.1% respectivamente, mostrados en la Tabla 20. Por medio de la prueba de Shapiro- Wilk se buscó deferencias entre ambos grupos y se encontró diferencia significativa con  $p < 0.001$ .

#### Anormalidades morfológicas de los espermatozoides

Se realizó la identificación en los espermatozoides encontrando las siguientes anomalías:

##### Cabeza aumentada

Los promedios de cada muestra con respecto a la presencia de cabezas aumentadas en los espermatozoides de los grupos expuesto fue de 9.9% y no expuesto de 7.4%, a través de la prueba de U de Mann-Whitney con un intervalo del 95% de confianza, se encontró diferencia significativa con  $p= 0.003$  (ver Tabla 21).



#### Cabeza disminuida

Asimismo, se analizó el número de espermatozoides con cabezas disminuidas en los individuos expuestos y no expuestos, obteniendo los promedios de 8.4% y 5%, ver Tabla 21. A través de la prueba de Shapiro-Wilk, con un intervalo de confianza del 95%, se buscó diferencias entre ambos grupos y se encontró diferencia significativa con  $p < 0.001$ .

#### Cabeza de alfiler

Igualmente, se realizó el recuento del número de espermatozoides con cabezas de alfiler en ambos grupos, obteniendo como promedio 8.6% para el grupo expuesto contra 9.5% para el no expuesto y medianas de 9 y 10 respectivamente. Utilizando la prueba de U de Mann-Whitney, con un intervalo del 95% de confianza, para dilucidar diferencias entre ambos grupos, no se encontró diferencia significativa,  $p=0.103$ , ver Tabla 21.

#### Cabeza doble

También, se efectuó la cuantificación del número de espermatozoides con doble cabeza en ambos grupos, encontrando valores promedio de 1.9% y 1.5%. Para dilucidar diferencias entre ambos grupos, se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney, con un intervalo del 95% de confianza y se encontró diferencia significativa,  $p=0.007$  (ver Tabla 21).

#### Cuello Doble

Del mismo modo, se identificaron los espermatozoides que presentaron cuello doble en los grupos expuestos y no expuestos (ver Tabla 21), los promedios de 1.93% y 1.90% respectivamente ofrecieron la posibilidad de comparar los valores de la mediana para cada grupo. Se corrió la prueba de U de Mann-Whitney, con un intervalo del 95% de confianza, para dilucidar diferencias entre ambos grupos, no se encontró diferencia significativa,  $p=0.920$ .

#### Cola Doble

En cuanto a las alteraciones reconocidas en la porción distal del espermatozoide, se registró el número de espermatozoides con cola doble en ambos grupos, siendo los valores



promedio de 1.6% (expuestos) contra 1.2% (no expuestos) y medianas de 1.0 para ambos grupos (ver Tabla 21). Se aplicó la prueba de U de Mann-Whitney, con un intervalo del 95% de confianza, para esclarecer diferencias entre ambos grupos y no se encontró diferencia significativa,  $p=0.163$ .

#### Cola Corta

Se ponderó también, el número de espermatozoides con cola corta en los individuos expuestos (promedio=7.7%) y no expuestos (promedio=4.5%) ver Tabla 21, utilizando la prueba de U de Mann-Whitney, con un intervalo del 95% de confianza para dilucidar diferencias entre ambos grupos, se encontró diferencia significativa,  $p<0.001$ .

#### Cola Larga

Los promedios del recuento de espermatozoides con cola larga en los grupos en estudio fueron de 9.7% para los floricultores y 7.6% en los no expuestos. Al emplear la prueba de U de Mann-Whitney, con un intervalo del 95% de confianza, para dilucidar diferencias entre ambos grupos, se encontró diferencia significativa,  $p=0.028$ , ver Tabla 21.

#### Sin Cola

Por último, se realizó el conteo del número de espermatozoides sin cola en los individuos expuestos y no expuestos, siendo el valor promedio igual para ambos grupos de 1.4% y de la mediana de 1.0 cada grupo. Al usar la prueba de U de Mann-Whitney, con un intervalo del 95 % de confianza, para dilucidar diferencias entre ambos grupos, no se encontró diferencia significativa,  $p=0.994$ , ver Tabla 21.



**Efecto de la exposición laboral a plaguicidas sobre la calidad espermática, daño al ADN y su asociación con los polimorfismos de GST**

Tabla 20. Análisis estadístico de los resultados del seminograma en los grupos en estudio.

Grupo	n	Movilidad		Recuento No. esp x 10 <sup>6</sup> / mL	pH	Volumen mL	Espermatozoides	
		MPR %	MPL %				Normales %	Anormales %
Expuestos	30	71	29	61	8	2.0	46.5	53.5
No expuestos	30	86*	14*	84*	8	2.3	59.0*	41.0*
p		<0.001	<0.001	0.006	0.522	0.454	<0.001	<0.001

\* Diferencia significativa

Tabla 21. Análisis estadístico de las anomalías de los espermatozoides en los grupos en estudio.

Grupo	n	Cabeza				Cuello			Cola		
		Macro	Micro	Alfiler	Doble	Doble	Doble	Corta	Larga	Sin	
Expuestos	30	9.5	8	9.0	2.0	2.0	1.0	8.0	10.0	1.0	
No expuestos	30	7.0*	5*	10.0	1.0*	2.0	1.0	4.0*	7.0*	1.0	
P		0.003	<0.001	0.103	0.007	0.920	0.163	<0.001	0.028	0.994	

\* Diferencia significativa



### 3. Resultados del Ensayo Cometa.

El control positivo empleado en el ensayo cometa fue una solución de Casiopeína III Ea (100  $\mu$ M) en espermatozoides, el cual dio un valor promedio de tail moment = 17.2. El valor del control negativo o sea sin aplicar ningún tratamiento previo, dio un promedio de tail moment = 0.240.

Se evaluó el daño al ADN espermático mediante la medición de tail moment en los individuos expuestos y no expuestos, siendo los promedios de 0.139 contra 0.128 y las medianas de 0.0887 y 0.0743 respectivamente. A través de la prueba de U de Mann-Whitney, con un intervalo de confianza del 95%, se buscó diferencia significativa entre ambos grupos y no se encontró,  $p=0.384$ .

Tabla 22. Análisis estadístico del daño al ADN evaluado con el tail moment de ambos grupos.

Grupo	N	Mediana
Expuestos	30	0.0887
No expuestos	30	0.0743

U de Mann-Whitney,  $p = 0.384$ .

#### Genotoxicidad *in vitro* de los diferentes plaguicidas

Debido a estos resultados, se decidió correr un ensayo adicional de exposición *in vitro* de los plaguicidas más empleados por los individuos en el estudio: tamaron, lannate y manzate, solos y en mezclas. Se aplicaron en concentraciones de 100, 200 y 300 ppm respectiva y directamente sobre linfocitos y espermatozoides de donadores voluntarios no expuestos.

Se leyeron al menos 50 células por laminilla, por duplicado en cada tratamiento. Se encontró mayor daño en los linfocitos, comparado con el observado en los espermatozoides. El manzate solo o en mezcla indujo más daño que el tamaron y el lannate en ambas células. La mezcla de los tres ocasionó el mayor daño en linfocitos, no así en el semen.



Este ensayo permitió conocer que los espermatozoides son células más resistentes al daño genotóxico ocasionado por los plaguicidas más empleados por los floricultores ya que el daño fue menor en comparación con los linfocitos. El detalle de los datos obtenidos en esta prueba se muestra en la Tabla 23.

Tabla 23. Resultados de la exposición in vitro de espermatozoides y linfocitos a los plaguicidas

Plaguicida	Promedio de tail moment	
	Semen	Linfocitos
Tamaron (100ppm)	0.08	0.82
Lannate (200 ppm)	0.07	0.68
Manzate (300 ppm)	17.14	25.41
Tamaron + Lannate	0.34	1.87
Tamaron + Manzate	2.98	10.77
Manzate + Lannate	0.02	0.19
Tamaron + Lannate + Manzate	0.02	38.22
Control positivo (Casiopina III Ea)	25.77	29.81
Control negativo	0.04	0.02

#### 4. Distribución de frecuencias de los polimorfismos de GSTT1 y GSTM1.

Se llevó a cabo la extracción de ADN de 30 muestras de individuos expuestos y 30 de no expuestos y se cualificó el ADN extraído por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1 %, mezclando 8  $\mu$ L de DNA con 1  $\mu$ L de buffer de carga Orange 6x, dejándolo correr por 30 minutos a 100 V/35 A.

En la Figura 12 se muestra un ejemplo de los resultados de corrimiento en gel de agarosa de ocho muestras de ADN.

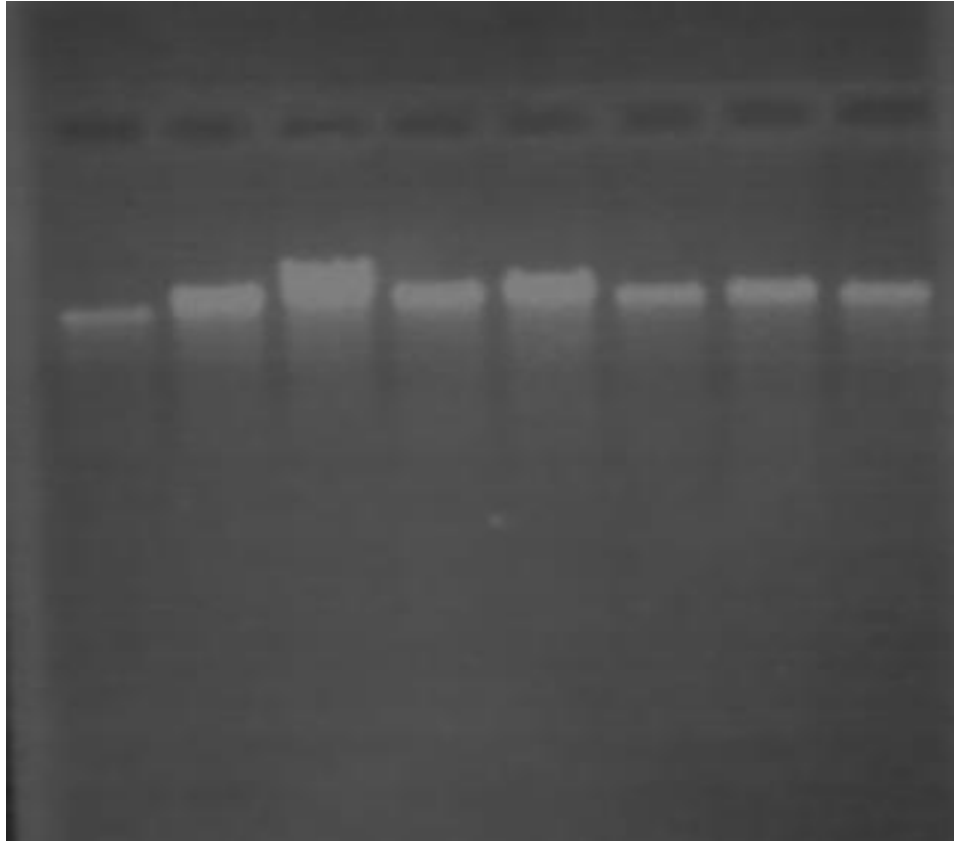


Figura 12. Resultados de la extracción de 8 muestras de ADN.

Posteriormente, se determinó la frecuencia de los polimorfismos de la Glutation S-Transferasa, tanto del grupo expuesto como del no expuesto a través de la amplificación de los genes GSTM1 y T1, usando el gen CYP1A1 como control de la PCR. Los resultados se muestran en la Tabla 24.



**Efecto de la exposición laboral a plaguicidas sobre la calidad espermática, daño al ADN y su asociación con los polimorfismos de GST**

Tabla 24. Resultados de los polimorfismos de GSTM1 y GSTT1 en los grupos de estudio.

Individuo	Expuestos		No Expuestos	
	GSTM1	GSTT1	GSTM1	GSTT1
1	-	-	-	-
2	-	-	+	-
3	+	-	+	-
4	-	-	-	-
5	+	-	-	-
6	+	+	-	-
7	-	-	-	-
8	+	-	+	-
9	+	-	+	-
10	+	-	+	-
11	-	-	-	-
12	-	-	-	+
13	-	-	-	+
14	+	+	-	-
15	-	-	+	+
16	-	-	-	-
17	-	+	+	+
18	-	+	-	-
19	-	-	-	-
20	-	+	-	-
21	+	+	-	+
22	+	+	-	+
23	+	+	+	-
24	+	-	-	-
25	-	+	-	-
26	-	+	-	-
27	+	-	+	-
28	+	+	+	+
29	-	+	+	-
30	+	+	-	+

Interpretación: (-) Nulo; (+) Presente.

-	-
-	+
+	-
+	+



Un ejemplo de 13 muestras procesadas y resultados obtenidos al llevar a cabo esta técnica se presenta en la Figura 13, en donde se pueden apreciar las bandas características de cada gen por su tamaño: GSTM1 con 215 pb, CYP1A1 con 312 pb y GSTT1 con 480 pb, el marcador de peso molecular empleado fue de 100 pb.

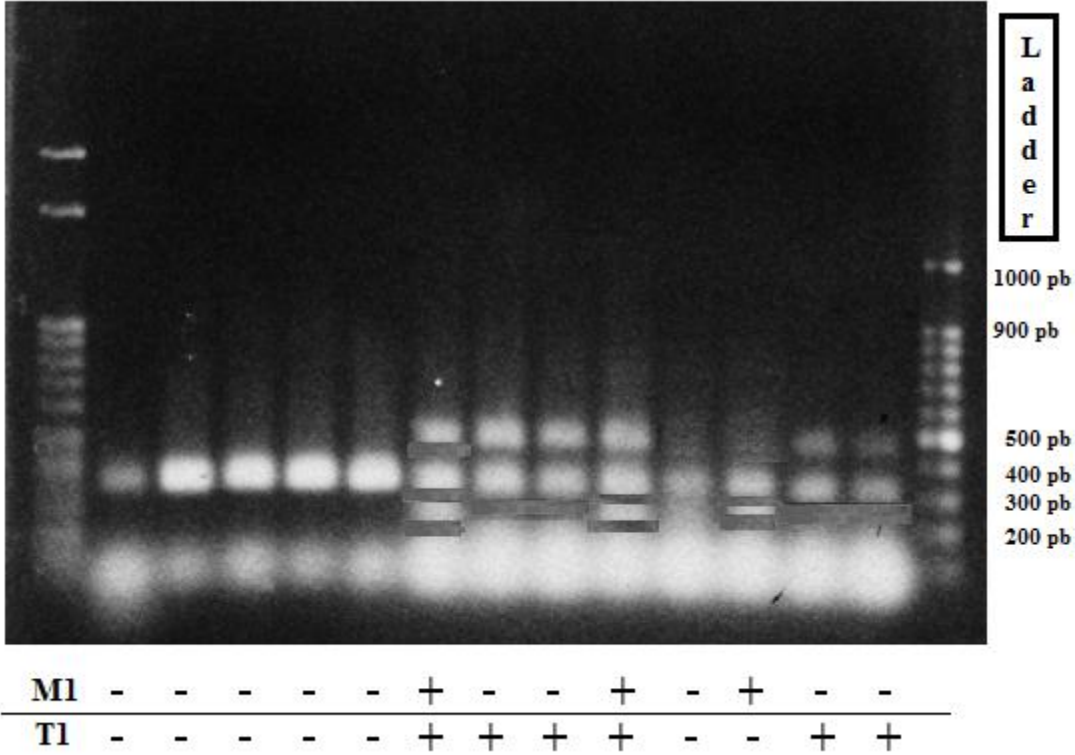


Figura 13. Resultados de amplificación de genes GSTM1 y T1 de 13 muestras.

Se determinaron las frecuencias de los polimorfismos de GSTM1 y GSTT1, tanto en el grupo expuesto como en el no expuesto y se encontró que el 57% fueron nulos para GSTT1 (17/30) del primer grupo y el 73% (22/30) del segundo respectivamente. Por otro lado, el 57% (17/30) fueron nulos para el gen GSTM1 en los expuestos y 63% (19/30) en los no expuestos.

En cuanto al genotipo combinado de GSTM1 y T1 se encontró un 46 % de dobles nulos en el grupo no expuesto contra un 34% del grupo expuesto. Asimismo, el porcentaje de dobles positivos fue menor en los dos grupos en estudio (10% en expuestos contra 23% en no expuestos). En la Tabla 25 se muestra el porcentaje de distribución de los genes GSTT1 y GSTM1 en ambos grupos.



Tabla 25. Frecuencia de los polimorfismos de los genes GSTT1 y GSTM1 en los grupos en estudio.

		Expuestos (%)	No Expuestos (%)
M1	+	13 (43)	11 (37)
	-	17 (57)	19 (63)
T1	+	13 (43)	8 (27)
	-	17 (57)	22 (73)
M1 + T1	-/-	10 (34)	14 (46)
	-/+	6 (20)	5 (17)
	+/-	7 (23)	8 (27)
	+/+	7 (23)	3 (10)

En donde (-) es nulo y (+) es presente.

Para conocer si las frecuencias de los polimorfismos de estos genes fueron diferentes entre los grupos, se hizo una  $\chi^2$ , encontrando que entre la población no expuesta y la expuesta a plaguicidas, no existe diferencia significativa,  $p=0.792$  para GSTM1 y  $p=0.279$  para GSTT1.



#### IV. DISCUSION DE RESULTADOS

El uso de plaguicidas dentro de la floricultura acarrea riesgos de intoxicación tanto para animales, como para los individuos ocupacionalmente expuestos, los cuales deben ser tomados en cuenta, en especial por las personas que los manipulan y aplican. Esta exposición puede ocurrir directamente en el lugar de trabajo o indirectamente por la contaminación del agua, aire, suelo o alimentos.

En comunidades como Villa Guerrero, que forma parte del corredor hortiflorícola del Estado de México, existe una gran diversidad de patrones de uso de estos compuestos. A ello se le suma la existencia de una amplia gama de productos cuya finalidad es no superar los límites de acumulación en las distintas matrices biológicas, que origina una exposición no controlada de animales, plantas y humanos a combinaciones o mezclas cada vez más complejas en cuanto a su composición, concentración y toxicidad.

Esta toxicidad es función de las características fisicoquímicas del compuesto, de la dosis absorbida, la vía de entrada del xenobiótico, el tipo, duración y frecuencia de la exposición, la acumulación y la persistencia en el organismo, además de la complejidad de las mezclas y el riesgo de aditividad o sinergismo de sus posibles combinaciones (105-107).

En cuanto a las características sociodemográficas de los individuos en estudio, la edad promedio básicamente fue la misma, pero hubo una marcada diferencia en cuanto a la escolaridad. Los individuos expuestos residen fundamentalmente en la zona hortiflorícola del Estado de México en contraste con los no expuestos, en donde la mayoría viven en zonas urbanas, destacando Toluca, Metepec y el DF.

Se sabe que algunas características como la edad, puede modular el efecto genotóxico de los xenobióticos, a pesar de esto, en el caso de los plaguicidas no es posible concluir de manera definitiva aún, ya que en reportes anteriores se tienen resultados de dos tipos: ausencia de efecto, o una correlación positiva con respecto a una o más variables, entre ellas la edad (112-128).



Por otro lado, los floricultores informaron realizar las diferentes actividades que requiere el cultivo de la flor durante la misma jornada de trabajo, es decir, pueden fumigar y cortar el mismo día, lo que impide una asociación directa con el grado de exposición a los plaguicidas, así como el empleo de las diferentes mezclas de estos compuestos con diferente actividad biológica y grado de toxicidad.

A través del cuestionario aplicado a los floricultores, se encontró que el lannate, manzate, tamaron y agrimec, solos o en forma de mezclas, son los plaguicidas más empleados en Villa Guerrero, y han dado resultados positivos en ensayos genotóxicos (104, 122-123, 126-128, 130).

Por otro lado, Shakkebaek, *et al*, (2001) demostró que algunos plaguicidas tales como fungicidas, herbicidas e insecticidas, actúan como "disruptores endócrinos" (DE), los cuales son compuestos persistentes, organohalogenados y bioacumulables que interfieren con la producción, liberación, transporte, metabolismo, unión, acción biológica o eliminación de las hormonas causantes del mantenimiento de la homeostasis, modificando los procesos normales de reproducción y desarrollo. Sus efectos se producen a dosis muy bajas, en general muy por debajo de los límites legalmente establecidos (108).

En este trabajo, uno de los plaguicidas más empleados por los floricultores fue el metomilo (Lannate®), que es un carbamato y del cual se sabe que es estrógeno ambiental que altera el sistema reproductor aumentando la cantidad de esperma anómalo en ratones (109); otro de los más usados fue el mancozeb (Manzate®), fungicida ditiocarbamato que aumenta la cantidad de esperma anormal en ratones; también el benomilo (Benlate®), fungicida benzimidazólico que actúa como estrógeno ambiental disminuyendo el peso de los testículos, el número de esperma y provoca degeneración de los testículos en ratones (110).

Asimismo, está consensuado que la exposición a DE no tiene porqué ser de idéntica repercusión sobre todos y cada uno de los individuos expuestos, de hecho, se ha evidenciado que la edad del individuo en la cual está en contacto con estos químicos es



crucial para determinar el efecto biológico, destacando que en la etapa embrionaria y fetal existe un riesgo crítico para desencadenar las alteraciones antes enunciadas (111).

Es importante mencionar la baja proporción de los trabajadores que vestían y usaban equipo de protección personal. Existen autores que reportan que el uso de éstos marca una diferencia (130), hecho que se refleja en este trabajo debido a que la mayoría de los floricultores incluidos en este estudio refirieron sólo el uso de botas como equipo de protección personal.

Se ha informado sobre la decadencia de la calidad seminal del hombre en las últimas 5 décadas, destacando un descenso en el número de espermatozoides que llega al 50%, lo que supone una disminución del 1% anual (90), tanto en Europa (112-118) como en otros continentes (119-123), con el uso de plaguicidas liberados al medio ambiente, los cuales tienen un efecto sobre el sistema endocrino del hombre y de los animales.

En este sentido, nosotros comparamos el efecto de la exposición laboral a plaguicidas en floricultores de Villa Guerrero, Estado de México, versus individuos de la comunidad universitaria de la UAEM que no están ocupacionalmente expuestos, sobre la calidad espermática, encontrando disminución en la movilidad progresiva rápida, el recuento espermático, así como en el número de espermatozoides normales y anormales y aumento de anomalías estructurales de los espermatozoides entre ambos grupos, lo que refleja el efecto perjudicial del uso de plaguicidas sobre los parámetros seminales, con lo cual el esperma puede tener menor probabilidad de una fecundación fortuita, hecho que está apoyado por estudios como el de Hauser *et al*, (2003) quien estableció la relación directa entre una mayor exposición medioambiental a plaguicidas y una menor movilidad, concentración y porcentaje de espermatozoides móviles (124). Abell, *et al*, (2000) por su parte, analizaron el papel de la exposición química en los lugares de trabajo sobre la función reproductiva masculina, asociándola con la calidad seminal, y encontraron que la espermatogénesis es afectada de forma severa, aunque el mecanismo de acción no se ha aclarado totalmente (125).



No obstante, se han requerido años de seguimiento y esfuerzo de diversos grupos de trabajo para acumular la evidencia necesaria para considerar a los plaguicidas como xenobióticos estrogénicos y con una presencia medio ambiental tremendamente importante. Sin embargo las instancias reguladoras del uso de sustancias químicas, encargados de prevenir la exposición inadvertida a tales compuestos parecen no estar capacitados para intervenir a menos que se presente una evidencia absoluta en la relación exposición/efecto. Tal evidencia es difícil de conseguir, máxime cuando los ejemplos nos advierten del efecto tardío en el tiempo.

Debido a lo anterior, diversos autores han realizado investigaciones para determinar las alteraciones genotóxicas en poblaciones que producen o usan este tipo de compuestos, dentro de los que podemos mencionar el trabajo de Irvine *et al*, (2000) quienes relacionaron el daño al ADN con los parámetros de calidad del semen, encontrando una correlación negativa entre ambos (126). Otros estudios muestran que las alteraciones en las características del espermatozoide se asocian con un aumento del número de espermatozoides con el ADN fragmentado (127-128), sin embargo los resultados del ensayo cometa en este trabajo, no mostraron daño estadísticamente diferente entre los espermatozoides de ambos grupos.

La susceptibilidad genética y algunos factores ambientales parecen modular el nivel de riesgo, como lo sugieren los estudios en los que se los resultados negativos del ensayo cometa al igual que los obtenidos en esta investigación, coinciden con los reportados en la bibliografía (131, 132).

En este trabajo, se encontró que en algunos casos existe una asociación entre el efecto de la exposición a plaguicidas y los parámetros de la calidad espermática. Sin embargo, no se encontró una relación entre la exposición a estos compuestos y los resultados del ensayo cometa *in vivo* en espermatozoides, ya que no existió diferencia significativa entre los floricultores y los individuos no expuestos. Sin embargo, se encontró un daño al ADN inducido por la exposición directa de plaguicidas en linfocitos y en células espermáticas, mostrando mayor daño en los linfocitos. En este sentido, Bustos-Obregón *et al*, (2003)



citan daños esperma de mamíferos domésticos, incubados en presencia de paration y paraoxon, afectando la habilidad en el momento de la fertilización (47).

En los floricultores al entrar en contacto con los plaguicidas y penetrar al organismo activan la primera línea de los procesos de desintoxicación de fase I y luego de fase II, la primero representada principalmente por las enzimas del citocromo P450 hepático y la segunda entre otras, por las pertenecientes a la familia de genes de la glutatión S-transferasa, los cuales reducen significativamente la vida media y la concentración plasmática de los plaguicidas y sus metabolitos. Por otro lado, existen barreras físicas que aíslan de la circulación general las estructuras de gran importancia como las gónadas y el sistema nervioso central. Además, la estructura de la membrana del espermatozoide está constituida por mayor concentración molar colesterol-fosfolípido que la hace menos permeable a los xenobióticos (129), por lo tanto, es posible esperar una menor probabilidad de que el material genético contenido dentro de los espermatozoides sufra un daño significativo, como lo mostraron nuestros resultados con el ensayo cometa.

Los efectos genotóxicos inducidos por los plaguicidas pueden mostrar diferencias debido a las poblaciones estudiadas, el cuestionario aplicado y lo extenso e intenso de la exposición, entre otros. Cuando los individuos se exponen a mezclas es difícil predecir el efecto genotóxico por la interacción que puede ocurrir entre los agentes y los individuos involucrados, potencializando o antagonizando sus efectos. Debido a la complejidad de estas mezclas, se dificulta saber la naturaleza precisa de las moléculas que causan daño al ADN espermático y/o linfocítico. Sin embargo, es posible que las múltiples actividades enzimáticas de los linfocitos así como la presencia de los polimorfismos de la glutatión S-transferasa disminuyan la toxicidad de algunos intermediarios que pueden generar daño al ADN espermático (15, 57, 59, 124-126).

Además, el biomonitoreo de compuestos específicos para la evaluación de la exposición puede ser complejo debido a que la información sobre los ingredientes activos de cada plaguicida o de las formulaciones empleadas, no es suficiente para evaluar el riesgo de los efectos adversos a la salud por exposición a las mezclas de los mismos. En este sentido,



Sram *et al.*, (1998) relacionaron la exposición a plaguicidas en floricultores y los polimorfismos del gene GSTM1 y encontraron que la frecuencia de células con daño al ADN, aumenta en individuos con la ausencia del gen. En el presente trabajo, la frecuencia de los genes GSTM1 y GSTT1 nulos sí estuvo asociada con la disminución de la calidad espermática (84). Sin embargo, el procedimiento que aplicamos no permite la identificación de los heterocigotos M+/M- o T+/T-, por eso solo se reportaron las frecuencias obtenidas como presentes (+) o nulos (-).

Los resultados de esta investigación son hasta ahora el primer reporte de la presencia de polimorfismos GSTM1 y T1 en población del corredor hortiflorícola del Estado de México, relacionados con datos de calidad espermática, los cuales pueden ser de utilidad como un valor de referencia en diversos estudios tales como aquellos que pretendan conocer los efectos adversos de los plaguicidas sobre la salud.

La realización de estudios de seguimiento capaces de caracterizar en detalle las diversas exposiciones, son de gran ayuda para evidenciar las asociaciones entre la exposición y los efectos sobre la salud reproductiva de poblaciones humanas, ya que los efectos tardíos suponen una mayor dificultad para identificar los plaguicidas empleados.

Por tal motivo, el análisis multidisciplinario de la interacción gen-ambiente puede ser la mejor alternativa para observar e identificar algún cambio en los floricultores ocupacionalmente expuestos a plaguicidas sobre la calidad espermática, daño al ADN y la posible modulación de estos por los genes de susceptibilidad de la familia de la glutatión S-transferasa.

Debido a ello, es necesario tener presente que la demostración definitiva de una asociación entre plaguicidas que actúen como disruptores endocrinos y la generación de efectos reprotóxicos no es inmediata, dada la dificultad del desarrollo de estudios epidemiológicos y multifactoriales en donde la relación causa-efecto puede verse dificultada en el tiempo. Se propone, por tanto, acogerse a las indicaciones de la duda razonable y el principio de precaución para actuar de forma preventiva sin esperar a tener pruebas irrefutables.





## V. CONCLUSIONES

La exposición laboral a plaguicidas ocasiona alteraciones en la calidad espermática, tales como disminución en la movilidad, en el recuento y porcentaje de espermatozoides normales, pero no causan daño al ADN de espermatozoides medido con el ensayo cometa.

Los plaguicidas Tamaron, Lannate y Manzate solos o en mezclas, inducen daño al ADN si se aplican directamente en los linfocitos y en los espermatozoides, siendo más lábiles los linfocitos.

No se encontró diferencia en la distribución de los polimorfismos del gen GSTM1 y T1 entre los grupos en estudio, por lo tanto, pertenecen al mismo grupo de mestizos mexicanos.

Al encontrar una asociación válida, la pregunta siguiente es si dicha relación estadística es una relación causa-efecto entre la exposición y el efecto. Sin embargo, juzgar la causalidad rebasa los resultados de un solo estudio; para ello se deben considerar otros criterios, como la magnitud de la asociación, la consistencia de los hallazgos de todos los demás estudios, la presencia de una relación dosis-respuesta, y la plausibilidad biológica.

Por lo anterior, la presente investigación tiene un alcance limitado, pues en primer lugar se trata de un estudio piloto que considera un tamaño de muestra que no representa por sí misma lo que puede estar pasando en una población expuesta a plaguicidas como es el caso de los floricultores.

Por otro lado, el procedimiento empleado para la identificación de polimorfismos de GSTM1 y GSTT1, no permite la discriminación entre los heterocigos y homocigos positivos.



Es deseable la implementación de las otras familias de la GST tal como GSTP1, para la identificación de los genotipos y su participación en la modulación del daño ocasionado por los plaguicidas.

Estos resultados invitan a continuar con la búsqueda de los daños ocasionados en las células gaméticas por la exposición laboral a los plaguicidas, para lo cual se podría documentar la historia reproductiva de las parejas de floricultores, conocer la edad y el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios en los adolescentes de esta comunidad, así como implementar una batería de biomarcadores de genotoxicidad capaces de ser implementados en células germinales.



## REFERENCIAS

1. Hanke W, Jurewicz J. The risk of adverse reproductive and developmental disorders due to occupational pesticide exposure: An overview of current epidemiological evidence. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*. 2004; 17(2): 223-43.
2. Golec J, Hanke W, Dąbrowski S. Fertility and occupational exposure to pesticides. *Medycyna Pracy*. 2003; 54(5): 465-72.
3. Giwercman A, Bonde JP. Declining male fertility and environmental factors. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 1998; 27(4): 807-30.
4. Li YF, Lin H, Ma MF, Li LB, Cai M, Zhou NY, *et al.* Semen quality of 1346 healthy men, results from the Chongqing area of southwest China. *Human Reproduction*. 2009; 24(2): 459-69.
5. Castillo J, Contreras S, Poblano R, Posadas R, J Ramírez. Actividad de la enzima glutation S-transferasa T1 en floricultores expuestos a plaguicidas. *Bioquímica*. 2007: 138.
6. Faust F, Kassie F, Knasmüller S, Boedecker RH, Mann M, Mersch-Sundermann V. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2004; 566(3): 209-29.
7. World Health Organization (WHO). Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5a ed. Ginebra: WHO; 2010: 10-11, 13-16, 21-26, 32-44.
8. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. 1988; 175(1): 184-91.
9. Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA, Anwar WA, Au WW. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Letters*. 1996; 107(2): 229-33.
10. Primo-Yúfera E, Carresco-Dorrién JM. Plaguicidas y fitorreguladores. En: *Química Agrícola. Volumen II*. Madrid: Alhambra; 1986: 35-40.
11. Castillo Cadena J. Análisis genotóxico, inmunológico y de los polimorfismos de la glutation S-transferasa en floricultores expuestos a plaguicidas. [tesis de Doctorado]. México, DF: Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas; 2006.
12. Málaga CY, Ortiz ND, Hernández MI, Tovar JM, Ayala RA. Detención de la espermatogénesis. *Ginecología y Obstetricia de México*. 2005; 73: 500-8.
13. Robbins WA, Wei F, Elashoff DA, Wu G, Xun L, Jia J. Y:X sperm ratio in boron-exposed men. *Journal of Andrology*. 2008; 29(1): 115-21.
14. Tiwari AK, Pragma P, Ravi Ram K, Chowdhuri DK. Environmental chemical mediated male reproductive toxicity: *Drosophila melanogaster* as an alternate animal model. *Theriogenology*. 2011; 76(2): 197-216.
15. Meeker JD, Ehrlich S, Toth TL, Wright DL, Calafat AM, Trisini AT, *et al.* Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic. *Reproductive Toxicology*. 2010; 30(4): 532-9.
16. Newman EI. *Applied ecology*. Canada: Blackwell Scientific Publications. 1993: 328.
17. Smith RL, Smith TM. *Ecología*. 4a ed. España: Addison Wesley; 2001: 642.



18. Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas 103 (CICOPLAFEST). Catálogo oficial de plaguicidas. México: CICOPLAFEST; 2002.
19. Ortiz-Hernández M, Sánchez-Salinas E, Vázquez-Duhalde R, Quintero-Ramírez R. Plaguicidas organofosforados y ambiente. *Biotecnología* 3. 1997; 129-51.
20. López L, López M. Efecto de la exposición a organofosforados en los niveles de colinesterasa sérica. *Environmental Health Perspectives*. 1993; 48: 359-63.
21. Restrepo I. Los plaguicidas en México. México, D.F.: Comisión Nacional de Derechos Humanos; 1992: 49-74.
22. Funes C. Mercado de Plaguicidas. En: Asociación Mexicana de la Industria de Plaguicidas y Fertilizantes, editores. México: CANACINTRA; 1992: 6-9.
23. Albert AL. Panorama de los plaguicidas en México. En: 7° Congreso de Actualización en Toxicología Clínica. México: Servicios de Salud de Nayarit y Comisión Federal de Protección contra Riesgos Sanitarios; 2005: 1-17.
24. Badii M, Landeros J. Plaguicidas que afectan a la salud humana y la sustentabilidad. *CULCyT //Toxicología de Plaguicidas*. 2007; 4(19): 21-34.
25. Yáñez L, Ortiz D, Calderón J, Batres L, Carrizales L, Mejía J, *et al.* Overview of human health and chemical mixtures: Problems facing developing countries. *Environmental Health Perspectives*. 2002; 110(Supplement 6): 901-9.
26. Dési I, Nagymajtényi L, Schulz H, Nehéz M. Epidemiological investigations and experimental model studies on exposure of pesticides. *Toxicology Letters*. 1998; 96-97(1): 351-9.
27. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). Encuesta Industrial mensual. Resumen anual 1999. 1a ed. México, D.F.: INEGI, México; 2000.
28. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). Encuesta Industrial mensual Ampliada a 230 clases. Resumen anual 2009. 1a ed. México, D.F.: INEGI; 2010.
29. Resendiz Maguay A. Efecto de los insecticidas y dos herbicidas sobre los patrones de movilidad espermática, analizado por computadora. [tesis de Licenciatura]. México, D.F.: Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa, Ciencias Biológicas y de la Salud; 2004.
30. Maroni M, Fait A, Colosio C. Risk assessment and management of occupational exposure to pesticides. *Toxicology Letters*. 1999; 107(1): 145- 53.
31. Benerjee B. The influence of various factors on immune toxicity assessment of pesticide chemical. *Toxicology Letters*. 1999; 107(1): 21-31.
32. World Health Organization. International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 155. Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principle. Génova: WHO; 1993:1-57.
33. World Health Organization (WHO). The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification. Ginebra: WHO; 2009; 19-34.
34. Almeida, WF. Peligros y Precauciones. *Salud Mundial*. 1984; Agosto-Septiembre: 10-11.
35. Organización Mundial de la Salud (OMS), Organización Panamericana de la Salud (OPS). Plaguicidas organoclorados. México: OMS/OPS, Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud; 1990. (Serie Vigilancia 9).



36. Loffredo C, Silbergeld E, Ferencz C, Zhang J. Association of transposition of the great arteries in infants with maternal exposures to herbicides and rodenticides. *American Journal of Epidemiology*. 2001; 156 (6): 529-36.
37. Fattore E, Fanelli R, La Vecchia C. Persistent organic pollutants in food: public health implications. *Journal of Epidemiology and Community Health*. 2000; 56 (11): 831-2.
38. Fairbrother A. Immunotoxicology of captive and wild birds. En: *Wildlife toxicology and population modeling*. Boca Ratón, Florida: Lewis Publishers; 1994: 251-61.
39. Mills P, Yang R. Prostate cancer risk in California farm workers. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*. 2003; 45(3): 249-58.
40. Kormondy E. *Concepts of ecology*. 3a ed. Englewood cliffs, NJ: Prentice Hall; 1984: 185-6.
41. López, CL. Exposición a plaguicidas organofosforados. En: *Volumen 18 de Perspectivas en Salud Pública*. México: Instituto Nacional de Salud Pública. 1993: 45-50.
42. Briggs, SA. *Basic guide to pesticides. Their characteristics and hazards*. Washington: Taylor and Francis; 1992: 159.
43. Hill E. Capítulo 39: Organophosphorus and carbamates pesticides. En: Hoffman DJ, Rattner DA, Burton DA Jr, Cairns Jr, editors. *Field Manual of Wildlife Diseases: Birds. Handbook of Ecotoxicology*. Boca Ratón, Florida: Lewis; 1995: 287-93.
44. Mileson B, Chambers J, Chen W, Dettbarn W, Ehrich M, Eldrefrawi A, *et al*. Common mechanism of toxicity: a case study of organophosphorus pesticide. *Toxicology Science*. 1998; 41(1): 8-20.
45. Rosenstock L, Keifer M, Danielle W, McConnell R, Claypoole K. Chronic central nervous system effects of acute organophosphate pesticide intoxication. *Lancet*. 1991; 338(8761): 223-7.
46. Boyes W, Dyer R. Pattern reversal visual evoked potentials in awake rats. *Brain Research Bulletin*. 1983; 10(6): 817-23.
47. Bustos-Obregón E, Ortiz JC. Morphofunctional damage of mammalian sperm incubated in organophosphoric agropesticides. *Andrology*. 2003; 35(1): 4-5.
48. Córdoba PD. Capítulo III: Toxicología. En: Córdoba PD, editores. *Toxicología*. 4a ed. Colombia: El Manual Moderno; 2006: 346-61.
49. Vega, S. *Toxicología I: Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales*. México: Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, OPS, OMS; 1985: 69.
50. Jurewicz J, Hanke W, Sobala W, Buczyńska A. Current use of pesticides in Poland and the risk of reproductive disorders. *Medycyna Pracy*. 2004; 55(3): 275-81.
51. Castillo J, Tenorio-Vieyra L, Quintana-Carabia I, García-Fábila M, Juan ER-S, Madrigal-Bujaidar E. Determination of DNA damage in floricultorists exposed to mixtures of pesticides. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2006; 97896: 1-12.
52. Pathak R, Mustafa MD, Ahmed RS, Tripathi AK, Guleria K, Banerjee BD. Association between recurrent miscarriages and organochlorine pesticide levels. *Clinical Biochemistry*. 2010; 43(1-2): 131-5.
53. Frazier LM. Reproductive disorders associated with pesticide exposure. *Journal of Agromedicine*. 2007; 12(1): 27-37.
54. Proshin SN, Glushakov RI, Stepanov GV, Tapil'skaya NI. 37 morphological features of spermatozoa (like "head-in-tail" anomaly) and "comet assay" from patients with declined quality of semen. *Reproductive BioMedicine Online*. 2010; 20(Supplement 3):3-8.



55. Evenson DP, Wixon R. Environmental toxicants cause sperm DNA fragmentation as detected by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®). *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005; 207(Supplement 2): 532-7.
56. Petrelli G, Lauria L, Figà-Talamanca I. Occupational exposures to toxic substances and male fertility. An italian multicenter study conducted among exposed populations. *La Medicina del Lavoro*. 2001; 92(5): 307-13.
57. Hossain F, Ali O, D'Souza UJA, Saw Naing DK. Effects of pesticide use on semen quality among farmers in rural areas of Sabah, Malaysia. *Journal of Occupational Health*. 2010; 52(6): 353-60.
58. Moller P, Knudsen LE, Loft S, Wallin H. The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2000; 9(10): 1005-15.
59. Pérez-Herrera N, Polanco-Minaya H, Salazar-Arredondo E, Solís-Heredia MJ, Hernández-Ochoa I, Rojas-García E, *et al.* PON1Q192R genetic polymorphism modifies organophosphorous pesticide effects on semen quality and DNA integrity in agricultural workers from southern Mexico. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2008; 230(2): 261-8.
60. Handal AJ, Harlow SD. Employment in the Ecuadorian cut-flower industry and the risk of spontaneous abortion. *International Health and Human Rights*. 2009; 9(1): 25.
61. Makowiec-Dabrowska T, Radwan-Włodarczyk Z, Koszada-Włodarczyk W, Siedlecka J, Wilczyński J. The influence of chemical and physical factors in the work environment on the amount of risk for abnormal pregnancy outcome. *Medycyna Pracy*. 1997; 48(3): 239-59.
62. Savitz DA, Brett KM, Dole N, Tse C-KJ. Male and female occupation in relation to miscarriage and preterm delivery in central North Carolina. *Annals of Epidemiology*. 1997; 7(7): 509-16.
63. Amdur MO, Doull J, Klaassen C. Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons. *Toxicology Letters*. 1996; 85(1): 64-5.
64. Clayson D, Grant D. The assessment of mutagenicity. *Health protection branch mutagenicity guidelines. Environmental and Molecular Mutagenesis*. 1992; 21: 15-37.
65. Hernández-Guevara C, Díaz-Olguín AR, Ruíz-Flores LE, Díaz-Barriga AS, Madrigal-Bujaidar E. Electroforesis unicelular (ensayo cometa) como bioindicador de antigenotoxicidad inducida por *Amphipterygium adstringens*. En: 2º Congreso Nacional de Química Médica. Querétaro, Qro., México: Facultad de Química, Instituto de Neurobiología de la UNAM y Universidad Autónoma de Querétaro (Facultad de Ciencias Naturales, Medicina y Química); 4-8 de Septiembre de 2006 [Citado 2013 jun 11]; [9 páginas]. Disponible en: [http:// www.respyn.uanl.mx/especiales/.../44\\_hernandez-guevara\\_y\\_col..pdf](http://www.respyn.uanl.mx/especiales/.../44_hernandez-guevara_y_col..pdf).
66. McArt DG, McKerr G, Howard CV, Saetzier K, Wasson GR. Modelling the comet assay. *Biochemical Society Transactions*. 2009; 37(4): 914-7.
67. Rydberg B, Johanson K. Estimation of single strand breaks in single mammalian cells. *DNA repair mechanisms*. 1978: 464-8.
68. Roti JR, Wright W. Visualitation of DNA loops in nucleoids from HeLa cells: assays for DNA damage and repair. *Journal of the International Society for Advancement of Cytometry Part A*. 1987; 8(5): 461-67.



69. Dusinska M, Collins AR. The comet assay in human biomonitoring: Gene-environment interactions. *Mutagenesis*. 2008; 23(3): 191-205.
70. Peakall D, Kennedy S. Introduction to the special issue on biomarkers *Ecotoxicology*. 1999; 8(5): 327.
71. World Health Organization (WHO). *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction*. 4a. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2003: 20-6.
72. Lauwerys RR. Introduction. En: Lauwerys RR, Hoet P, editores. *Industrial chemical exposure: Guidelines for biological monitoring*. 20 ed. USA: Lewis; 1993: 1-13.
73. Lauwerys R. Occupational Toxicology. En: Amdur M DJ, Klaassen C, editores. *Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons*. 40 ed. USA: McGraw-Hill; 1991: 916-20.
74. Grandjean P, Brown S, Reavey P, Young D. Biomarkers of chemical exposure: State of the art. *Clinical Chemistry*. 1994; 40(7): 1360-2.
75. Repetto R, Baliga S. Pesticides and the immune system: The public health risks. Washington, DC: World Resources Institute; 1996: 58.
76. Van Cauteren H, de Kok M, Van Schooten F. Cancer risk evaluation. En: Niesink RJ, de Vries J, Hollinger MA, editores. *Toxicology: Principles and applications*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1996: 385-412.
77. Hauser R. Urinary phthalate metabolites and semen quality: A review of a potential biomarker of susceptibility. *International Journal of Andrology*. 2008; 31(2): 112-6.
78. Tukey R, Johnson E. Molecular aspects of regulation and structure of the drug-metabolizing enzymes. *The basis of Pharmacology*. 30a ed. USA [s.n.]; 1990: 423-68.
79. Paine A. Heterogeneity of cytochrome P450 and its toxicological significance. *Human and Experimental Toxicology*. 1995; 14(1): 1-7.
80. Sanz P. Los polimorfismos genéticos como causa de variabilidad individual de la toxicidad. En: Repetto M, editor. *Toxicología avanzada*. Madrid: Díaz de Santos; 1995: 87-116.
81. Coles B, Ketterer B. The role of human glutathione and glutathione transferases in chemical carcinogenesis. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 1990; 25(1): 47-70.
82. Wilce M, Parker M. Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 1994; 1205(1): 1-18.
83. Seidegård J, Ekström G. The role of human glutathione transferases and epoxide hydrolases in the metabolism of xenobiotics. *Environmental Health Perspectives*. 1997; 105(4): 791-9.
84. Srám J. Effect of glutathione S-transferases M1 polymorphisms on biomarkers of exposure and affects. *Environmental Health Perspectives*. 1998; 106(Supplement 1): 231-9.
85. Altamirano-Lozano M, Roldán E, Bonilla E, Betancourt M. Effect of metal compounds on boar sperm motility *in vitro*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1998; 444: 105-10.
86. Vásquez F, Vásquez D. Espermograma y su utilidad clínica. *Salud Uninorte*. 2007; 23(2): 220-30.
87. Levine RJ. Methods for detecting occupational causes of male infertility. Reproductive history versus semen analysis. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*. 1983; 9(5): 371-6.



88. Contreras HR, Bustos-Obregón E. Morphological alterations in mouse testis by a single dose of malathion. *Journal of Experimental Zoology*. 1999; 284(3): 355-9.
89. Bonilla E, Amador A, Betancourt M. *In vitro* capacitation of pig spermatozoa in a protein-free medium supplemented with histidine and cysteine. *Medical Science Research*. 1994; 22: 725-6.
90. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 1993; 41(1): 112-3.
91. Chauvet M, Massieu Y. La influencia de la biotecnología en la agricultura mexicana: Estudios de caso. *Economía Teoría yPráctica*. 1996; 6:20.
92. Castillo C, Sánchez M. Genotoxicidad por exposición ocupacional a plaguicidas en el Corredor Hortiflorícola del Estado de México. En: *Memorias Sesión 2 Cátedra Nacional CUMEX "Mario Molina Henríquez 2010"*. Fronteras de la química en el desarrollo biotecnológico. Cd. Juárez, Chihuahua, México: Universidad Autónoma de Ciudad Juárez; Octubre de 2010. [Citado 2013 jun 11]; [61 páginas]: 19. Disponible en: <http://www.uacj.mx/planeacion/PIFI-2011/CADAC-ICB/Evidencias%20ICB/02.Pertinencia/ICB-02-Memorias%20da%20sesion%20CUMex%20Octubre.pdf>
93. Williams PL, James RC, Roberts SM, Britt JK. Properties and effect of pesticides. En: *Principles of toxicology: environmental and industrial applications*. 2a ed. USA: Jonh Wiley and Sons; 2000: 315.
94. Lemaux P. Genetically engineered plants and foods: A scientist's analysis of the issues (Part I). *Annual Review of Plant Biology*. 2008; 59: 771–812.
95. Bond G, Rossbacher R. A review of potential human carcinogenicity of the chlorophenoxy herbicides MCPA, MCPP, and 2, 4-DP. *British Journal of Industrial Medicine*. 1993; 50: 340-8.
96. Oliva M, JC R, Silva G. Estudio exploratorio de los problemas de salud humana derivados del uso de plaguicidas en Bella Vista, Estado de México, México. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología de Costa Rica*. 2005: 71-80.
97. Norma Oficial Mexicana NOM-003-STPS-1999: Actividades agrícolas - uso de insumos fitosanitarios o plaguicidas e insumos de nutrición vegetal o fertilizantes. Condiciones de seguridad e higiene. *Diario Oficial de la Federación* (28 de diciembre de 1999).
98. Norma Oficial Mexicana NOM-017-STPS-2008: Equipo de protección personal, selección, uso y manejo en los centros de trabajo. *Diario Oficial de la Federación*, segunda sección (martes 9 de diciembre de 2008).
99. García J. El mito del manejo seguro de los plaguicidas en los países en desarrollo. *Manejo Integrado de Plagas de Costa Rica*. 1999; 52: 25-41.
100. Hughes W. *Essentials of environmental toxicology: the effects of environmental hazardous substances on human health*. USA: Taylor and Francis; 2005: 350.
101. Kumar S. Occupational exposure associated with reproductive dysfunction. *Journal of Occupational Health*. 2004; 46(1): 1-19.
102. Cortés-Gutiérrez EI, Dávila-Rodríguez MI, López-Fernández C, Fernández JL, Gosálvez J. Evaluación del daño en el DNA espermático. *Actas Urológicas Españolas*. 2007; 31(2): 120-31.





103. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. 1988; 175(1): 184-91.
104. Shen H, Ong C. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000; 28(4): 529-36.
105. Ibarluzea JM, Fernández MF, Santa-María L, Olea-Serrano MF, Rivas AM, Aurrekoetxea JJ, *et al.* Breast cancer risk and the combined effect of environmental estrogens. *Cancer Causes Control*. 2004; 15(6): 591-600.
106. Fernández P, Grimalt JO. On the global distribution of persistent pollutants. *Chimia*. 2003; 57(9): 514-21.
107. Kortenkamp A. Ten years of mixing cocktails: A review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environmental Health Perspectives*. 2007; 115(Supplement 1): 98-105.
108. Shakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main K. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common development disorder with environmental aspects. *Human Reproduction*. 2001; 16(5): 972-78.
109. Panger MA, Echeverría M. Risk of methomyl use to the federally listed California red-legged frog (*Rana aurora draytonni*). Washington, D.C: Environmental Fate and Effects Division Office of Pesticide Programs; 2007.
110. Arnold SF, Klotz DM, Collins BM, Vonier PM, Guillette LJ, McLachlan JA. Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals. *Science*. 1996; 272(5267): 1489-92.
111. Fernández FM, Olea N. Sustancias químicas y repercusión en salud: disruptores endócrinos. En: Congreso Internacional Salud y Hábitat. Organizado por Asociación de Estudios Geobiológicos GEA. Barcelona: Laboratorio de Investigaciones Médicas, Hospital Clínico, Universidad de Granada; 9-13 de Noviembre de 2006.
112. Olsen G, Bodner K, Ramlow J, Ross C, Lipshultz L. Have sperm counts been reduced 50 percent in 50 years? A statistical model revisited. *Fertility and Sterility*. 1995; 63: 887-93.
113. Andersen AG, Jensen TK, Carlsen E. High frequency of sub-optimal semen quality in a nun selected population of young men. *Human Reproduction*. 2000; 15: 366-72.
114. Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *The New England Journal of Medicine (NEJM)*. 1995; 59: 33-8.
115. De Mouzon J, Thonneau P, Spira A, Multigner. Declining sperm count. Semen quality has declined among men born in France since 1950. *British Medical Journal*. 1996; 313: 343.
116. Jorgensen N, Andersen AG, Eustache F, Irvine DS, Suominen J, Petersen JH. Regional differences in semen quality in Europe. *Human Reproduction*. 2001; 16: 1012-19.
117. Richthoff J, Rylander L, Hagmar L, Malm J, Giwercman A. Higher sperm counts in Southern Sweden compared with Denmark. *Human Reproduction*. 2002; 17: 2468-73.
118. Giwercman A, Rylander L, Rignell-Hydbom A, Jönsson BA, Pedersen HS, Ludwicki JK, *et al.* Androgen receptor gene CAG repeat length as a modifier of the association between persistent organohalogen pollutant exposure markers and semen characteristics. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2007; 17: 391-401.



119. Fisch H, Goluboff ET. Geographic variations in sperm counts: A potential cause of bias in studies of semen quality. *Fertility and Sterility*. 1996; 65:1044–6.
120. Saidi JA, Chang DT, Goluboff ET, Bagiella E, Olsen G, Fisch H. Declining sperm counts in the United States? A critical review. *Journal of Urology*. 1999; 161:460–2.
121. Swan SH, Elkin EP, Fenster L. The question of declining sperm density revisited: An analysis of 101 studies published 1934–1996. *Environmental Health Perspectives*. 2000; 108: 961–6.
122. De Jager C, Farías P, Barraza-Villarreal A, Ávila MH, Ayotte P, Dewailly E, *et al*. Reduced seminal parameters associated with environmental DDT exposure and p, p'-DDE concentrations in men in Chiapas, Mexico: Across-sectional study. *Journal of Andrology*. 2006; 27: 16–27.
123. Recio-Vega R, Ocampo-Gómez G, Borja-Aburto VH, Moran-Martínez J, Cebrian-García ME. Organophosphorus pesticide exposure decreases sperm quality: Association between sperm parameters and urinary pesticide levels. *Journal of Applied Toxicology*. 2008; 28: 674–80.
124. Hauser R, Chen Z, Pothier L, Ryan L, Alshul L. The relationship between human semen parameters and environmental exposure to polychlorinated biphenyls and p, p'-DDE. *Environmental Health Perspectives*. 2003; 111: 1505-11.
125. Abell A, Ernst E, Bonde JP. Semen quality and sexual hormones in greenhouse workers. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*. 2000; 26(6): 492-500.
126. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *Journal of Andrology*. 2000; 21:33-44.
127. Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes M. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertility and Sterility*. 2001; 75:674-77.
128. Sakkas D. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Human Reproduction*. 2001; 16: 2160-5.
129. Wolf DE, Voglmayr JK. Diffusion and regionalization in membranes of maturing rat spermatozoa. *The Journal of Cell Biology*. 1984; 98: 1678-84.
130. Paz-y-Miño C, Arévalo M, Sánchez ME, Leone PE. Chromosome and DNA damage analysis in individuals occupationally exposed to pesticides with relation to genetic polymorphism for CYP1A1 gene in Ecuador. *Mutation Research*. 2004; 562:77-89.
131. Piperakis SM, Petrakou E, Tsilimigaki S, Sagnou M, Monogiudis E, Haniotakis G, Karkaseli H, Sarikaki E. Biomonitoring with the comet assay of Greek greenhouse workers exposed to pesticides. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2003; 41: 104-110.
132. Hernández-de la Cruz H, Rodríguez-Mercado JJ, Altamirano-Lozano MA. Estimación del daño al ADN en células testiculares del ratón CD-1 tratado con acetato de talio. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 2013; 29 Suplemento 4: 129.
133. Lema II, Zuk M, Rojas-Bracho L. Introducción al análisis de riesgos ambientales. 2 ed. México: SEMARNAT; 2010.



## ANEXOS

### *A: Control de calidad de las espermatobioscopías.*

Después de obtener la muestra de semen se debe proceder a la realización de los siguientes exámenes:

#### **Examen macroscópico:**

Anotar las características físico químicas de la muestra (aspecto, color, pH, volumen, viscosidad y tiempo de licuefacción) de acuerdo a las especificaciones de la OMS/OPS (2010) (5).

1. Color: gris opalescente, blanco purulento, amarillento o marrón. el color es normal es blanquecino opalescente.
2. Volumen: Medir el volumen con una jeringa (debe ser mayor a 2 mL). El volumen normal es de 2 a 5 ml, siendo el volumen medio 3.5 ml.

Un volumen superior a 10 ml se denomina polisemia y es patológico.

Un volumen inferior a 1 ml se denomina oligocemia y también es completamente patológico.

3. Tiempo de licuefacción: La licuefacción debe ser total antes de 1 hora.

Un semen que se emite ya licuado indica posible inflamación prostática o de las vesículas seminales. Un tiempo de licuación superior a 4 horas supone un obstáculo para la fecundación.

4. pH: Colocar una gota de semen sobre una tira de papel pH y anotar la medición. El líquido seminal tiene un pH alcalino oscilando entre 7,2 y 8. Lo más habitual es de 7,5 a 7,6. El pH se determina fácilmente con una tira reactiva y debe hacerse relativamente pronto porque la muestra se va alcalinizando con el tiempo.

Si hay inflamación de la glándula, el pH es superior a 8.

Si hay una obstrucción en el conducto eyaculador el pH puede ser ácido.

#### **Examen microscópico.**

De acuerdo a los lineamientos internacionales emitidos por la OMS en el año 2010, el Control de Calidad de las Espermatobioscopías se debe llevar a cabo de la siguiente manera.



El examen microscópico del semen incluye la evaluación de la motilidad, el recuento y la morfología de los espermatozoides, y el examen citobacteriológico, en el cual se busca la presencia de otros elementos celulares diferentes a los espermatozoides, como leucocitos y bacterias.

Todos los parámetros microscópicos se deben procesar por duplicado.

### Movilidad

Se debe realizar un análisis microscópico inicial de la muestra para estimar la movilidad entre los 30 y 60 minutos posteriores al eyaculado. Se utiliza una gota de semen entre un portaobjetos y un cubreobjetos a una magnificación de 40X para observar la movilidad en 20 campos.

Movilidad "a" y "b": Espermatozoides con movilidad progresiva rápida, a una velocidad de progresión entre 5 - 25  $\mu\text{m}/\text{segundo}$  a 37 °C, lo que equivale a la mitad de la cola en distancia o a 5 cabezas.

Movilidad "c" y "d": Espermatozoides con movilidad progresiva lenta ( $\geq 5 \mu\text{m}/\text{segundo}$  a 37 °C) o inmóviles.

### Lectura de movilidad

1. Realizar lectura duplicada de los parámetros de movilidad progresiva rápida y lenta (para 100 espermatozoides) de cada muestra.
2. Una vez obtenidos los parámetros de movilidad progresiva rápida (“a” y “b”) y movilidad progresiva lenta (“c” y “d”) de ambas lecturas, utilizar la categoría con mayor frecuencia en el paciente.
3. Promediar los resultados obtenidos en ambas lecturas del parámetro con mayor frecuencia (**resultado A**)
4. Realizar la diferencia de los parámetros obtenidos para el resultado A (**resultado B**)
5. En la gráfica, localizar sobre el eje de las X el promedio de ambas lecturas (**resultado A**) y hacer la intersección con el eje de las Y para la curva de lectura de 200 espermatozoides, con lo cual se encuentra un valor (**resultado C**) que se debe comparar con el **resultado B**, si  $C \geq B$  los resultados son válidos, sino es así, se deben descartar y se procede a realizar un nuevo recuento.

6. En caso de que el promedio de ambas lecturas (A) superen el 50 % demostrado en el eje X, se resta 100 % - A y ese valor se busca en la gráfica para hacer la intersección con el eje Y en la curva de 200 espermatozoides.

### Recuento espermático

Leer por duplicado en la cámara de Neubauer el recuento espermático de cada muestra, reportar el promedio de ambos resultados.

Diluir la muestra con una pipeta de Thomas de glóbulos blancos hasta la señal 0,5 y el líquido diluyente [con solución de Macomber y Saunders (formol, bicarbonato de sodio y agua destilada)] hasta la señal 11. Con ello se obtienen una dilución 1/20. Se homogeniza la muestra agitando intensamente la pipeta sujeta por ambos extremos haciendo girar la bolita de su interior. Desechar las 3 o 4 primeras gotas, y se llena la cámara dejando reposar 2 minutos en una cámara húmeda para que sedimente los espermatozoides y se coloca la cámara en la platina del microscopio y con el objetivo 10x se comprueba que la distribución que es homogénea y que no hay aglutinación de espermatozoides (Figura 14).

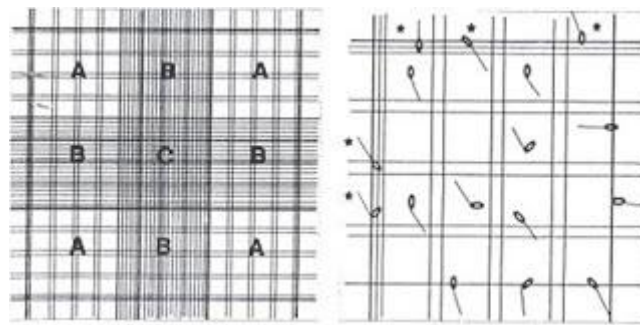


Figura 14. Recuento espermático en la cámara de Neubauer.

Contar el número de espermatozoides de 5 cuadros A o B y efectuar la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ espermatozoides/mL} = \text{n}^\circ \text{ de espermatozoides contados} \times 1,000,000$$

Reportar (61).

Valores normales: en condiciones normales el n° de espermatozoides/ml de semen oscila entre 50 y 100 millones algunos se consideran normales hasta 120 millones.

El semen en función del n° de espermatozoides se clasifica de la siguiente forma:



1. *Hiperespermia*: cuando la cifra va de 120 millones a 400 millones/ml.
2. *Normospermia*: de 50 a 120 millones/ml.
3. *Hipospermia*: de 30 a 50 millones/ml.
4. *Oligospermia*: de a 1 a 30 millones/ml.
5. *Azoospermia*: es la ausencia de espermatozoides maduros y presencia de células de inmaduras de la espermatogénesis.
6. *Aspermia*: ausencia de espermatozoides y ausencia de células precursoras.

### Para morfología espermática

1. Realizar lectura duplicada de los parámetros de morfología anormal (para 100 espermatozoides) de cada muestra.
2. Una vez obtenidos los parámetros, utilizar la categoría con mayor frecuencia en el paciente.
3. Promediar los resultados obtenidos en ambas lecturas del parámetro con mayor frecuencia (**resultado A**).
4. Realizar la diferencia de los parámetros empleados para en el resultado A (**resultado B**).
5. En la gráfica, localizar sobre el eje de las X el promedio de ambas lecturas (**resultado A**) y se hace la intersección con el eje de las Y para la curva de lectura de 200 espermatozoides, con lo cual se encuentra un valor (**resultado C**) que se debe comparar con el **resultado B**, si  $C \geq B$  los resultados son válidos, si no es así, se deben descartar y se procede a realizar un nuevo recuento.
6. En caso de que el promedio de ambas lecturas (A) superen el 50 % demostrado en el eje X, se resta  $100\% - A$  y ese valor se busca en la gráfica para hacer la intersección con el eje Y en la curva de 200 espermatozoides.

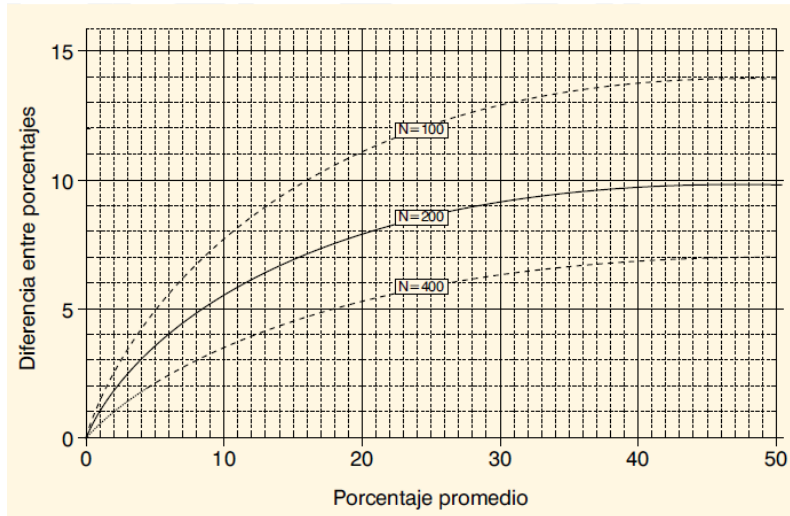


Figura 15. Rango de diferencias que se espera que ocurran en el 95 % de las muestras, causadas por errores en el recuento, por duplicado, de 100, 200 y 400 espermatozoides.

WHO, 2010.

Diferencias mayores sugieren un error de dilución en el recuento o una distribución no uniforme de los espermatozoides en el semen diluido. Nótese el mayor error estadístico asociado en el recuento de sólo 100 espermatozoides, por lo cual se recomienda hacer lectura duplicada de 100 espermatozoides.



**B: Ensayo cometa: Procedimiento de Hauser et al, 2007 modificado en la presente investigación.**

### Reactivos

Reactivos	Marca
Na <sub>2</sub> EDTA sal disódica	Sigma
TRITON X100	Sigma
Tris – Borato EDTA buffer para electroforesis en gel	Sigma
NaOH	J. T. Baker
DMSO 99.5% GC	Sigma
Bromuro de Etidio	Sigma
Lauril Sarcosinato de Sodio	Sigma
PBS Dulbecco “A”	Oxoid
NaCl	BDH
Dithiothreitol	GIBCO BRL
Proteinasa K	Thermo Lab
Glucosa	J. T. Baker
CO <sub>3</sub> HNa	Sigma
Citrato Na <sub>3</sub> .2H <sub>2</sub> O	Sigma
KCl	J. T. Baker
Agarose Type I: Low EEO	Sigma
Agarose Low Melting Point DNase, RNase and Protease	Sigma

### Soluciones de trabajo

1. Solución de lisis (para 1 L).

Reactivos	Gramos	Molaridad
NaCl	146.4	2.5 M
Na <sub>2</sub> EDTA sal disódica	37.2	100 Mm
Tris – Borato EDTA buffer para electroforesis en gel	1.20	10 Mm
Lauril Sarcosinato de Sodio	10.0	1 %
NaOH	12.0	

Colocar uno a uno los reactivos en un vaso de precipitado sobre una placa de agitación permitiendo su disolución. Aforar el volumen a 1000 mL con agua bidestilada y ajustar el pH a 10.





2. Solución de trabajo de lisis (para 100 mL) preparar el mismo día de trabajo.

Reactivos	mL
Solución de lisis	90
DMSO	10
TRITON X 100	1
Dithiothreitol	0.5

Preparar el mismo día en que se va a utilizar en un recipiente limpio y colocar en el refrigerador a 4°C hasta el momento de su uso.

3. Solución de neutralización (TRIS) para 1L.

Reactivos	Gramos	Molaridad
Tris-Borato EDTA buffer para electroforesis en gel	48.5	0.4 M

Disolver con agua bidestilada y aforar a 1L, llevar a pH 7.5, filtrar y esterilizar.

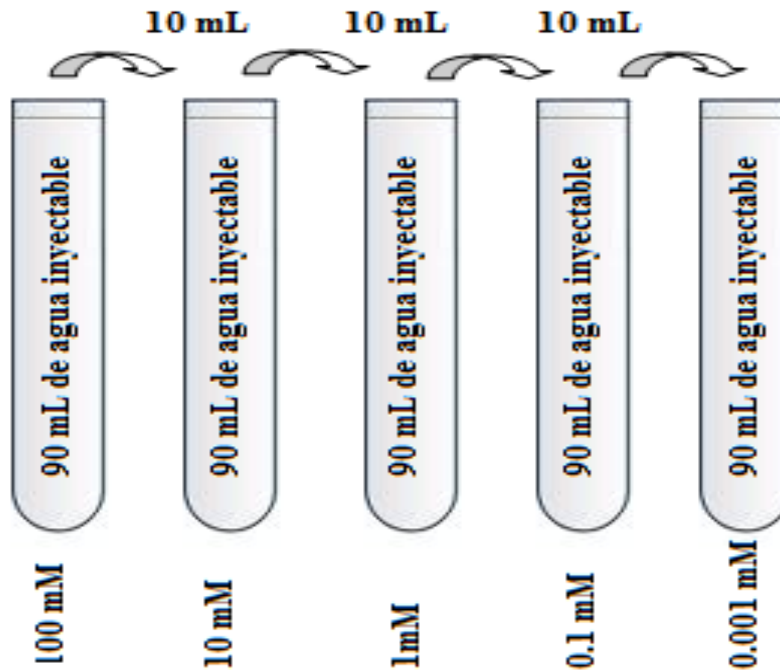
4. Solución de corrimiento (Buffer de electroforesis): preparar fresco antes de su utilización.

Reactivos	Cantidad	Molaridad
NaOH	24 gr	300 mM
EDTA	10 mL	1mM

Disolver en 2 litros de agua bidestilada y colocar 10 mL de EDTA 1mM. Reservar en refrigeración a 4°C hasta el momento de su uso.

5. Dithiothreitol (DTT) 100 mM.

Pesar 77.125 mg de Dithiothreitol y disolver en 5 mL de agua inyectable. Proceder a realizar las diluciones como se muestra:



6. Solución de trabajo de Dithiothreitol (DTT)= 0.005 mM.

Reactivos	Cantidad
DTT 0.01 mM	5 $\mu$ L
Proteinasa K (10 mg/mL)	10 $\mu$ L
Solución de lisis	85 $\mu$ L

Preparar el día de trabajo en un tubo nuevo y conservar a 4°C hasta su utilización.

7. Solución BTS: Betsville Thawing Solution, para la conservación de los espermatozoides.

Reactivos	Cantidad	Molaridad
Glucosa	37	0.002 mM
Na <sub>2</sub> EDTA	6	3.36
CO <sub>3</sub> HNa	1.25	15
Citrato Na <sub>3</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.25	20
KCl	0.75	5



Disolver todo excepto la glucosa, aforar a 1L con agua bidestilada. Esterilizar 120 °C por 20 minutos. Preparar por separado una solución al 37% de glucosa en agua destilada y esterilizar a 120°C por 20 minutos.

7. Solución de trabajo diario de BTS.

Colocar en un frasco estéril 10 mL de la solución de glucosa al 37% con 90 mL de la primera solución y conservar en refrigeración.

8. Solución de Bromuro de Etidio.

Pesar 10 mg de bromuro de etidio (20 µg/mL) y disolver en 550 mL de agua bidestilada, conservar en el refrigerador a 4°C.

9. Dilución 1: 20 Semen- BTS.

Colocar 1.9 mL de BTS con 0.1 mL de semen en un tubo cónico nuevo con tapa. Rotular y conservar en congelación.

10. Agarosa Tipo I: Low EEO al 0.6 %.

Pesar 0.03 g de Agarosa Tipo I: Low EEO y disolver en 5 mL de agua inyectable. Colocar en baño María a 60°C antes de utilizar.

11. Agarosa Tipo I: Low EEO al 1 %.

Pesar 0.05 g de Agarosa Tipo I: Low EEO y disolver en 5 mL de agua inyectable. Colocar en baño María a 60°C antes de utilizar.

12. Agarosa Tipo I: Low EEO al 1 %.

Pesar 0.05 g de Agarosa Low Melting Point y disolver en 5 mL de agua inyectable. Colocar en baño María a 37°C antes de utilizar.



## Materiales

1. Microscopio de Fluorescencia
2. Portaobjetos lisos: 76 x 26 mm
3. Cubreobjetos: # 1 Corning 24 x 50 mm
4. Agarosa Tipo I: Low EEO (Sigma) al 0.6 % y al 1 %
5. Agarosa Low Melting Point (Sigma) al 0.3 %
6. Tubos Eppendorf
7. Micropipetas de 10  $\mu$ L y 100  $\mu$ L
8. Puntas amarillas y blancas

## Procedimiento

### 1. Preparación de laminillas.

Colocar sobre portaobjetos lisos limpios Agarosa Tipo I: Low EEO al 0.6% fundida hasta crear una capa uniforme y gruesa sobre cada uno.

Dejar secar por 24 a 48 horas o hasta que la agarosa cristalice antes de su utilización.

Posteriormente colocar sobre esta primera capa Agarosa Tipo I: Low EEO al 1% fundida hasta crear una capa uniforme y gruesa. Dejar secar por 24 a 48 horas o hasta que la agarosa cristalice antes de su utilización.

### 2. Preparación de la muestra.

Colocar en un tubo eppendorf 100  $\mu$ L de la dilución 1:20 Semen-BTS + 100  $\mu$ L de agarosa Low Melting Point al 1%, mezclar en el vórtex para homogeneizar y dejar en Baño María a 37° C para evitar que la agarosa gelifique.

### 3. Preparación de la segunda capa de las laminillas.

Tomar 2 laminillas previamente preparadas por cada muestra y rotularlas.

Colocar 90  $\mu$ L de la muestra preparada sobre cada uno de los dos portaobjetos previamente embebidos con la agarosa tipo I inclinando un cubreobjetos a 45° y dejándolo caer sobre el portaobjetos para crear una capa uniforme, dejar secar hasta que gelifique.



#### **4. Lisis de las células para la liberación del ADN.**

Sumergir las laminillas en una caja coplin con solución de lisis (2.5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 10 mM TRIS, 1% Na Sarcosinato, DMSO 10% y 1% TRITON x100) durante 1 hora en refrigeración a 4°C.

#### **5. Tratamiento con Proteinasa K y DTT.**

Sacar las laminillas y acomodarlas en una cámara húmeda, colocándoles 60 µL de la solución de trabajo de Dithiothreitol (DTT)= 0.005 mM y un cubreobjetos encima. Incubar a 37°C por 18 horas (102).

#### **6. Tratamiento alcalino para el relajamiento del ADN y la expresión de rupturas.**

Las laminillas se colocaron en una cámara de electroforesis, sumergidas en la solución de corrimiento (300 mM NaOH, 1mM Na<sub>2</sub> EDTA) con un pH mayor a 13 y se dejaron 20 minutos para permitir el desenrollamiento del ADN.

#### **7. Electroforesis en condiciones alcalinas.**

La electroforesis se llevó a cabo a 25 V (0.73 V/cm) y 300 mA a pH mayor a 13 por 15 minutos.

#### **8. Neutralización del medio básico.**

Colocar las laminillas en una charola y enjuagar cada una dos veces con solución TRIS (0.4 M TRIS pH 7.5), si las laminillas no se van a leer enseguida, colocar etanol para conservarlas.

#### **9. Tinción y análisis de las laminillas.**

Cada laminilla se tiñó con 60 µL de bromuro de etidio y se analizó en un microscopio de fluorescencia. Se midió el tail moment por célula, analizando 50 células por muestra.



## ***C: Genotipificación***

### **1. Extracción de ADN**

Se utilizó el Kit de extracción de ADN Zymo Research Zr Genomic DNA II, cuyo protocolo de extracción de ADN utiliza el método por columna y consta de los siguientes pasos:

1. Poner incubadora solución Elution a 60°C.
2. Adicionar 400 µL de Genomic Lysis Buffer a 100 µL de sangre total.
3. Romper membranas: Mezclar en el vórtex de 4 a 6 segundos y dejar reposar a temperatura ambiente 5 minutos.
4. Separar componentes celulares expuestos x centrifugación: Transferir la mezcla a una columna Zymo-Spin colocada sobre un tubo colector.
5. Centrifugar la mezcla a 10 000 rpm durante 1 minuto.
6. Decantar el centrifugado y llevar la columna Zymo-spin a un nuevo tubo colector
7. Limpiar el ADN: Adicionar 200 µL de DNA Pre-Wash Buffer al interior de la columna.
8. Centrifugar a 10 000 rpm durante 1 minuto.
9. Lavado del ADN: Adicionar 250 µL de g-DNA Wash Buffer al interior de la columna.
10. Centrifugar a 10 000 rpm por 1 minuto.
11. Transferir la columna a un tubo Eppendorf.
12. Adicionar 50 µL de DNA Elution Buffer a 60°C al interior de la columna.
13. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
14. Elución del ADN: Centrifugar a 14 500 rpm por 30 segundos para eluir (filtrar) el DNA de la columna.

Cualificar el ADN extraído por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%, mezclando 8 µL de DNA con 1 µL de buffer de carga Orange 6x en cada pozo del gel.

Correr por 30 minutos a 100 Volts /35 Amperes



## 2. PCR

Para el desarrollo de la PCR se siguió el procedimiento de Abdel-Rahman (1996) con modificaciones de Soto Quintana (7). Preparar una master mix por muestra con los siguientes reactivos:

Tabla 26. Reactivos empleados por master mix de amplificación.

Reactivos	Cantidad ( $\mu\text{L}$ )
Agua libre de nucleasas	7.1
Buffer 10 X	5
MgCl <sub>2</sub>	3.5
dNTPs	1
CYP1A1 <sub>foward</sub>	1
CYP1A1 <sub>reverse</sub>	1
GSTM1 <sub>foward</sub>	1
GSTM1 <sub>reverse</sub>	1
GSTT1 <sub>foward</sub>	1
GSTT1 <sub>reverse</sub>	1
Taq polimerasa	0.4
DNA	2
<hr/> Volumen final de la muestra = 25 $\mu\text{L}$ <hr/>	

Cada tubo se colocó dentro del Termociclador para llevar a cabo la PCR bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, desnaturalización a 94°C por 45 segundos, alineación a 59°C por 45 segundos, extensión a 72°C por 45 segundos y extensión final a 72°C por 7 minutos, por 35 ciclos de amplificación.

**Corrimiento electroforético:** Los productos de amplificación de la PCR se corrieron electroforéticamente en un gel de agarosa al 2 %.

Colocar el gel de agarosa previamente realizado en la cámara de electroforesis. Vaciar TAE hasta que cubra el gel de agarosa entre 4 y 5 mm por encima del mismo.

Para marcador de peso molecular: 2  $\mu\text{L}$  de marcador de PM de 25pb + 2 $\mu\text{L}$  de buffer de carga Blue Orange (color negro).

Muestra coloreada (verde): 5 $\mu\text{L}$  de muestra a partir del segundo pozo de corrimiento.



Para muestras de ADN sin colorante: 3uL de muestra de ADN + 2uL de buffer de carga Blue- Orange, mezclarlo y colocarlo dentro del pozo de corrimiento correspondiente.

Después de colocar las muestras en los pozos de corrimiento correr a 100 volts, 35 Amperes por 60 minutos.

**Tinción:** Se tiñeron con una solución de bromuro de etidio al 2 % por 15 minutos y se revela en el trasluminador.

**Lectura:** La presencia o ausencia del fragmento específico de GSTT1 y GSTM1 se detectó por la presencia o ausencia de las siguientes bandas.

Control de la PCR: El gen CYP1A1 con una banda de 312 pb

1. GSTT1: Con una banda de 480 pb
2. GSTM: Con una banda de 215 pb (7).

#### ***Solución de Bromuro de Etidio, para tinción de geles.***

100 µL de Bromuro de Etidio + 100 mL de Agua destilada, colocar en un recipiente limpio y cubierto de la luz solar.

#### ***Gel de Agarosa 2%***

Colocar 1 gr de agarosa + 50 mL de TAE al IX por 1min en el microondas y posteriormente vaciar en la placa que está dentro de la celda de electroforesis. Colocar el peine para los pozos dentro del gel.

#### **Solución de TAE 50X.**

Pesar 242 g de Tris base y disolver en 57.1 ml de ácido acético glacial + 100 mL de EDTA 500mM (0.5M), aforar a 1L a pH 8.

#### **Solución de trabajo TAE 1X.**

Medir 100 mL de TAE al 10X + 900 mL de H<sub>2</sub>O destilada. Conservar en refrigeración.





*D: Hoja de consentimiento informado*



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPANTES DE LA  
INVESTIGACIÓN

**Título de la investigación:** Efecto de la exposición laboral a plaguicidas sobre la calidad espermática, daño al ADN y su asociación con los polimorfismos de GST

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme este formato de consentimiento.

**Información del proyecto de investigación:**

En Villa Guerrero, Estado de México la floricultura es la actividad principal, empleando al 80% de la población, aplicando mezclas de plaguicidas durante todo el año. Estudios realizados anteriormente han reportado que la manipulación y uso de estas sustancias influye en la presencia de anomalías en el espermatozoides generando daños reproductivos.

Debido a que cada individuo posee una carga genética diferente, la respuesta del organismo a compuestos tóxicos como los plaguicidas, también difiere de persona a persona.

Por lo cual, a través de este estudio se pretende determinar los efectos de toxicidad de los plaguicidas sobre la capacidad reproductora masculina, específicamente sobre los espermatozoides por medio de la realización de espermatozoidoscopías utilizando los criterios establecidos por la OMS/OPS, así como el daño al ADN medido por medio del ensayo cometa y la correlación de estos efectos con marcadores de susceptibilidad, mediante la identificación de los genes GSTT1 y GSTM1

**Procedimientos del estudio:**

Si usted accede a participar en este estudio, se le pedirá responder a un cuestionario sobre el estilo de vida, tipo y tiempo de exposición a los plaguicidas.

Se tomará una muestra de 3 mL de sangre periférica con heparina y se recogerá la muestra de semen en un recipiente estéril.

La muestra de semen se empleará para:

1. Realizar espermatozoidoscopías: Estudio por medio del cual se conocerán aspectos como el volumen, el pH, la viscosidad, el color; así como el número de espermatozoides, su movilidad, morfología y vitalidad.
2. Determinar el daño al ADN empleando el ensayo cometa.

La muestra de sangre se utilizará para dos propósitos:

1. Detectar la presencia de plaguicidas en la sangre.
2. Identificar tres genes que participan en la desintoxicación de los plaguicidas.

Es importante que usted esté enterado que el material que se utilizará para la obtención de ambas muestras es nuevo y estéril.



**Posibles riesgos:**

Al hacer la toma de muestra, debido a la inserción de la aguja para extraer sangre, algunas personas sienten ligero dolor.

El paciente puede presentar un pequeño moretón después de la toma de sangre.

La participación en este estudio es estrictamente voluntaria. La información que se recoja será confidencial y no se usará para ningún otro propósito fuera de los de esta investigación. Sus respuestas al cuestionario serán codificadas usando un número de identificación y por lo tanto, serán anónimas. No implica ningún costo este estudio para usted.

Cualquier duda que tenga, siéntase en libertad de expresarla de manera que quede satisfecho.

De antemano le agradecemos su participación.

---

*Acepto participar voluntariamente en esta investigación. He sido informado (a) del objetivo de este estudio.*

*Me han indicado también que tendré que responder un cuestionario, y me tomarán una muestra de sangre.*

*Reconozco que la información que yo provea en el curso de esta investigación es estrictamente confidencial y no será usada para ningún otro propósito fuera de los de este estudio sin mi consentimiento. He sido informado de que puedo hacer preguntas sobre el proyecto en cualquier momento y que puedo retirarme del mismo cuando así lo decida, sin que esto acarree perjuicio alguno para mi persona.*

*Entiendo que puedo pedir información sobre los resultados de este estudio cuando esté concluido.*

**Responsables de la investigación:**

Q.F.B. Griset Martínez Luna  
Dra. Julieta Castillo Cadena  
Dr. Jorge Serment Guerrero  
Dr. Pedro Rafael Valencia Quintana

cel. (722) 2 69 98 66

---

Firma del participante

---

Firma del investigador

---

Firma testigo



*E: Cuestionario*



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

FOLIO: \_\_\_\_\_ FECHA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
NOMBRE: \_\_\_\_\_  
OCUPACION: \_\_\_\_\_ EDAD \_\_\_\_\_  
SEXO: F \_\_\_\_ M \_\_\_\_ LUGAR DE RESIDENCIA: \_\_\_\_\_  
NACIONALIDAD: \_\_\_\_\_ NACIONALIDAD DEL PADRE: \_\_\_\_\_  
NACIONALIDAD DE MADRE: \_\_\_\_\_

1. ¿Ha usado servicios de salud bucodental? Sí \_\_\_\_ No \_\_\_\_  
Cuantas veces en el último año: \_\_\_\_\_
2. ¿Cuántas veces al día se cepilla los dientes?  
Ninguna vez \_\_\_\_  
1 vez \_\_\_\_  
2 veces \_\_\_\_  
3 o mas \_\_\_\_
3. ¿Utiliza hilo dental?  
Si \_\_\_\_ No \_\_\_\_ Frecuencia: Diario \_\_\_\_ Semanal \_\_\_\_
4. ¿Utiliza enjuague bucal?  
Si \_\_\_\_  
No \_\_\_\_
5. Dieta cariogénica (frecuencia de consumo)
  - Dulces  
Diariamente \_\_\_\_  
3 o más veces a la semana \_\_\_\_  
1-2 veces a la semana \_\_\_\_  
Menos de 1 vez a la semana \_\_\_\_  
Nunca o casi nunca \_\_\_\_
  - Refrescos azucarados  
Diariamente \_\_\_\_  
3 o más veces a la semana \_\_\_\_  
1-2 veces a la semana \_\_\_\_  
Menos de 1 vez a la semana \_\_\_\_  
Nunca o casi nunca \_\_\_\_
  - Refrigerios (comida entre comidas)  
Diariamente \_\_\_\_  
3 o más veces a la semana \_\_\_\_  
1-2 veces a la semana \_\_\_\_



Menos de 1 vez a la semana \_\_\_\_\_

Nunca o casi nunca \_\_\_\_\_

6. Grado de escolaridad:

Primaria \_\_\_\_\_ años

Terminada \_\_\_\_\_

Secundaria \_\_\_\_\_ años

Terminada \_\_\_\_\_

Bachillerato \_\_\_\_\_ años

Terminada \_\_\_\_\_

Licenciatura \_\_\_\_\_ años

Terminada \_\_\_\_\_

Técnico \_\_\_\_\_ años

Terminada \_\_\_\_\_

Posgrado \_\_\_\_\_ años

Terminada \_\_\_\_\_

7. Emplea algún tipo de plaguicida en su trabajo o casa: Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

¿Cuál o cuáles? \_\_\_\_\_

¿Cuánto tiempo al día? \_\_\_\_\_

¿Desde hace cuánto tiempo se encuentra expuesto? \_\_\_\_\_

**SIGUIENTE RUBRO LLENAR SOLO EN CASO DE QUE SU OCUPACION SEA FLORICULTOR:**

A. ¿Cuántos años tiene dedicándose a la floricultura? \_\_\_\_\_

B. ¿Qué actividades realiza?

\_\_\_ Siembra    \_\_\_ Corte    \_\_\_ Bonche    \_\_\_ Fumigar    \_\_\_ Desbotonar

Otros \_\_\_\_\_ Actualmente \_\_\_\_\_

C. ¿Cuáles compuestos ha aplicado?

___ Lannate	___ Tamaron	___ Tecto	___ Agrimec
___ Nuvacron	___ Furadan	___ Ridomil gold	___ Manzate 200
___ Benlate	___ Tal star	___ Fungicel	___ Pentaclor 600F
___ Curacron 500 FC	___ Omite	___ Cascade	

Otros \_\_\_\_\_

D. ¿Usted prepara los plaguicidas para aplicarlos?

\_\_\_\_\_

E. ¿Cada cuando los aplica?

\_\_\_\_\_

F. ¿Utiliza equipo de protección al aplicarlos? ¿Cuál de los siguientes?

	No _____	Si _____
___ Guantes	___ Mandil o plástico	___ Mascarilla o cubrebocas
___ Overol	___ Botas	___ Lentes o googles

G. ¿Cuándo fue la última vez que los aplicó? \_\_\_\_\_

Gracias por su participación





*F: Presentaciones en congresos*





Sociedad Mexicana de Genética  
Universidad de Occidente



UdeO  
Universidad de Occidente  
La Oaxaca

Otorga la presente

# CONSTANCIA

A

Martínez Luna Griset

Por su asistencia y participación

en el Congreso Nacional de Genética 2012  
Mazatlán, Sinaloa del 3 al 5 de octubre de 2012

Dr. Pedro Rafael Valencia Quintana  
Sociedad Mexicana de Genética

Dra. María del Carmen Martínez Valenzuela  
Universidad de Occidente



Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias



Sociedad Mexicana de Genética AC  
Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias  
Universidad de Colima



Otorgan la presente

**CONSTANCIA**

A

**MARTÍNEZ-LUNA G, CASTILLO-CADENA J, SERMENT-GUERRERO JH  
Y VALENCIA-QUINTANA R**

POR LA PRESENTACIÓN DE SU TRABAJO

**CALIDAD ESPERMÁTICA, DAÑO AL ADN Y SU ASOCIACIÓN CON LOS  
POLIMORFISMOS DE GST EN FLORICULTORES DE VILLA GUERRERO, MÉXICO**

DURANTE EL  
**CONGRESO NACIONAL DE GENÉTICA 2013**  
Manzanillo, Colima del 2 al 4 de octubre de 2013

M. EN C. ISAAC VICCAINO VARGAS  
DIRECTOR DE COORDINACIÓN Y VINCULACIÓN  
INIFAP-COLIMA

M.A. JOSÉ EDUARDO HERNÁNDEZ NAVA  
RECTOR  
UNIVERSIDAD DE COLIMA

Sociedad Mexicana de Genética AC  
CONGRESO NACIONAL DE GENÉTICA 2013  
DR. PEDRO RAFAEL VALENCIA QUINTANA  
PRESIDENTE  
SOCIEDAD MEXICANA DE GENÉTICA



## G: Artículo de divulgación

Se envió un Artículo de Divulgación a la Revista Enlace Químico, el cual fue aceptado.

### ARTÍCULO ESPERMATOBIOSCOPÍAS



ognavi (ivan.garcia.orozco@gmail.com) [Agregar a contactos](#) 12/12/2013

Para: Grace M Luna

[Acciones](#)

Hola Griset:

Tu artículo está en edición en Difusión Cultural. Esperamos que el próximo mes de enero esté lista la edición.

En cuanto tenga lista la revista les hago llegar un ejemplar.

Saludos



Grace M Luna 09/12/2013

Para: ivan.garcia.orozco@gmail.com

[Acciones](#)

Estimado Dr. Ivan,

Buenas tardes, no he tenido el gusto de conocerlo en persona, pero me presento ante usted por este medio:

Mi nombre es Griset Martínez Luna, alumna de la Dra. Julieta Castillo y autora del artículo titulado:

ESPERMATOBIOSCOPÍA. ¿QUÉ, CUANDO Y PARA QUÉ?





## ESPERMATOBIOSCOPIA. ¿QUÉ, CUANDO Y PARA QUÉ?

GRISSET MARTÍNEZ LUNA, JULIETA CASTILLO CADENA\*.

Facultad de Química, UAEM.

Correo electrónico: [jcastillo\\_cadena@hotmail.com](mailto:jcastillo_cadena@hotmail.com)

Recepción: 01 de mayo de 2013. Aceptación:

### RESUMEN.

Para la evaluación de la fertilidad masculina, el estudio más importante es la espermatobioscopia, en la cual se analizan aspectos físicos, químicos, macroscópicos y microscópicos del semen. Nos da información sobre la calidad del semen con la determinación de varios parámetros; los físicos son: viscosidad o consistencia, los químicos son la medición del pH del semen, los parámetros macroscópicos son la apariencia, el volumen del eyaculado y el color. Dentro de las características microscópicas analizadas tenemos el conteo de espermatozoides/mL (concentración o densidad), movilidad, viabilidad y morfología normal y anormal de los espermatozoides; así como la evaluación de otras características como el conteo de células, macrófagos, bacterias, hongos y en especial leucocitos.

**PALABRAS CLAVES:** espermatobioscopia; infertilidad, calidad del semen.

### ABSTRACT.

For the assessment of male fertility, the most important study is the spermatobioscopy, which discusses physical, chemical, macroscopic and microscopic semen. It gives us information about the quality of semen with the determination of several parameters, the physicists are: viscosity or consistency, chemists are measuring the pH of semen, the macroscopic parameters are appearance, ejaculate volume and color. Among the characteristics we analyzed microscopic sperm count /mL (concentration or density), motility, viability and normal and abnormal morphology of sperm, as well as the evaluation of other characteristics such as cell count, macrophages, bacteria, fungi and particularly leukocytes.

**KEY WORDS:** spermatobioscopy, infertility, semen quality.

### En la antigüedad.

La antigua medicina griega fue la primera en intentar comprender la reproducción humana afirmando la existencia de un “semen femenino” ya que al realizar la autopsia



de una mujer encontraron dos “testículos” (los ovarios) y por simple comparación y semejanza pensaron que al igual que en el hombre, éstos creaban y posteriormente vaciaban un espermatozoide por las trompas de Falopio y de ahí llegaba hasta la matriz. Éste poseía una menor capacidad fecundante que el del hombre debido al menor tamaño de los “testículos” femeninos.

Aristóteles refutó la idea del semen femenino y al observar sistemáticamente a los animales, intentó comprender la reproducción humana, llegando a la conclusión de que el embrión era producido por la unión de la “semilla” del varón con los nutrientes aportados de la “tierra” o sangre menstrual de la mujer, señalando que ésta última no aportaba ningún rasgo o característica material al mismo.

El macho entonces contribuía con el agente generador esencial o “principio vital o alma”, por lo que se llegó a considerar al semen como una sustancia no material o “*aura seminalis*” capaz de fecundar sin contacto sexual, atribuyendo esto a los vapores espermáticos paternos desprendidos durante una eyaculación si compartían el mismo techo, o al abrazar a una mujer que recientemente hubiera tenido que ver con su marido. Además, se le atribuía la facultad de generar vida en la amorfa sangre menstrual retenida en una mujer durante su mes, por lo cual las autoridades eclesiásticas consideraron un pecado el desperdiciar el semen fuera del cuerpo y prohibieron el uso de medidas anticonceptivas desde entonces. En la **fecundación**, propuso que el semen masculino se mezclaba con el “semen femenino”(el fluido menstrual), dándole forma y potencia (dynamis) a la sustancia amorfa. A partir de este material se formaba la carne y la sangre cuando se desarrollaba la prole.

En la Edad Media la ciencia creció a la sombra de la iglesia, por lo que la medicina evolucionó poco generando diversas polémicas que situaban en el plano imaginario al embrión y todo lo relacionado con él, hasta que en 1651 William Harvey, un joven estudiante determinó que el semen masculino al entrar en el útero creaba un “**huevo**” al cual denominó como “el origen común de todo ser vivo”.

En 1672, Reignier de Graff observó pequeñas “cámaras” en el útero de una coneja, actualmente conocidos como Folículos de Graff, estructura en la cual se forma el óvulo humano. Así, Graff atrajo a una escuela de adeptos, “**los ovistas**”, quienes estaban tan convencidos de sus opiniones como los **animalculistas** o **espermistas** lo estaban de las suyas. Los ovistas decían que era el óvulo femenino el que contenía al futuro ser

humano en miniatura, **los animálculos** de líquido seminal del macho simplemente estimulaban el crecimiento del huevo.

Con estas ideas en mente, un día de 1677 un estudiante de medicina llamado Johan Hamm llegó con el maestro Leeuwenhoek mostrándole un frasco que contenía líquido espermático de un enfermo que sufría de emisiones nocturnas. Animó al famoso a observarlos bajo sus juegos de lentes, al hacerlo observaron **animalillos o animaculae** “**animálculos**” seminales (Figura 1). En 1678, Leeuwenhoek, emitió un informe a la Real Society relatando ¡Había tantos “animálculos” o “vermes” en esa muestra como hombres en la superficie de la Tierra! El holandés se disculpó por lo “repugnantes o escandalosos” que pudieran resultar sus estudios. En 1694, Nicolas Hartsoeker descubrió «animalúnculos» en el esperma de humanos y otros animales, situándolos como un componente natural en el semen de cualquier animal.



*Figura 1. Antoni van Leeuwenhoek, su microscopio y dibujo del imaginario homúnculo (encogido en un espermatozoide), mencionado por Nicholas Hartsoeker en 1694.*

### **Los espermatozoides.**

En los últimos años el avance tecnológico a la par del científico ha logrado grandes logros en diferentes campos, y el de la reproducción no es la excepción, investigando y desarrollando nuevos métodos en diagnóstico y tratamiento de los trastornos de la fertilidad. El análisis del semen (Figura 2) sigue siendo un examen imprescindible en el

estudio del hombre que acude a consulta por **infertilidad**, luego se realizan otros exámenes según los resultados del mismo.

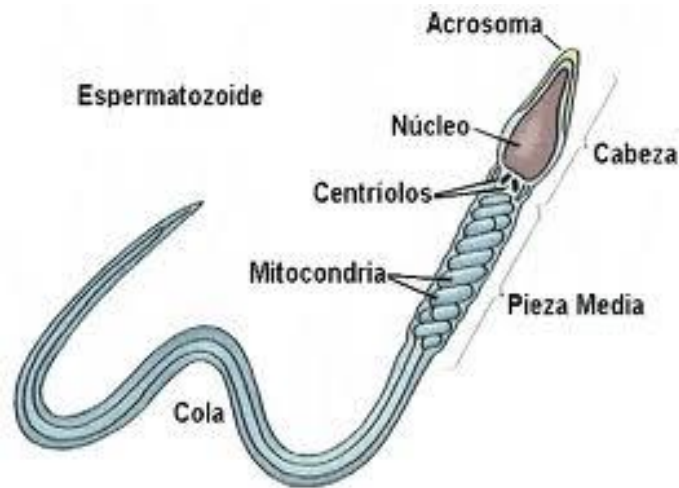


Figura 2. Esquema de un espermatozoide.

### El semen.

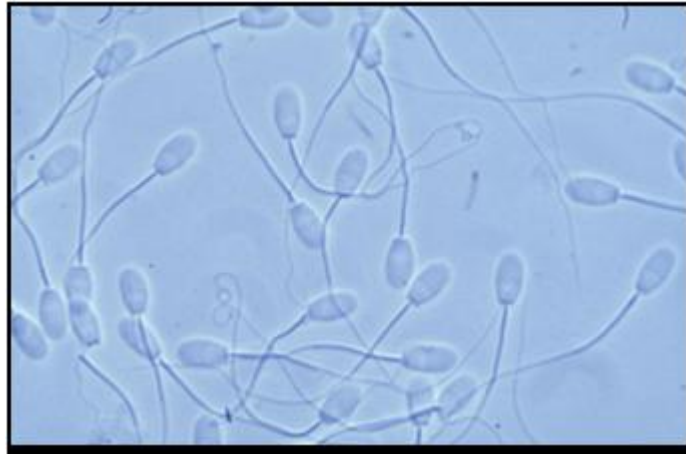
El semen está formado por una mezcla de espermatozoides suspendidos en un líquido llamado plasma seminal. El volumen promedio de semen de una eyaculación es de 1.5 a 5 mL, con máximo de 15 mL. Depende mucho de la abstinencia sexual previa y del nivel de excitación durante la actividad sexual. Menos del 10% del volumen del semen de una eyaculación corresponde a los espermatozoides. Más del 90% del volumen del semen de una eyaculación corresponde al líquido seminal.

El cuerpo humano elimina periódicamente el semen almacenado. Si no se eyacula durante un tiempo, se suelen producir poluciones nocturnas. El color del semen es normalmente blancuzco o blanco lechoso o levemente amarillento. Si el líquido eyaculado presenta un color anaranjado o rojizo, es posible que contenga sangre, signo que se conoce como *hematospermia*, que puede indicar un trastorno urológico.

Suele tener una consistencia de coágulo. Es frecuente la aparición de grumos más sólidos, pero ello no es indicativo de ninguna clase de problemas. El olor es peculiar y variable en cada individuo, en función de múltiples factores, ya que son características que incluyen un fuerte componente subjetivo y emocional. Para unas personas es desagradable y para otras es excitante. Algunas personas reconocen un leve sabor dulce y afrutado, debido a las proteínas alcalinas. El aroma puede ser muy intenso. El pH del

semen es alrededor de 7.5. Esta ligera alcalinidad favorece a la supervivencia y movilidad de espermatozoides dentro de la vagina, donde el pH es ácido.

La densidad normal de los espermatozoides por eyaculación en el semen varía de 50 a 150 millones/mL (Figura 3). Para que se produzca la fecundación del óvulo, el semen debe contener más de 20 millones de espermatozoides/mL.



*Figura 3. Imagen al microscopio de una muestra de semen.*

### **Espermatobioscopía ¿Qué es?**

Para la evaluación de la fertilidad masculina, el estudio más importante es la espermatobioscopía, la cual incluye el análisis físico, químico, macroscópico y microscópico del semen.

Una **espermatobioscopía** nos informa sobre las propiedades del semen basados en indicadores o marcadores utilizados para **evaluar la calidad del semen** como: conteo de espermatozoides/mL (concentración o densidad), conteo total de espermatozoides, movilidad, viabilidad y morfología de los espermatozoides. También evalúa las características físicas del semen como: apariencia, volumen de semen eyaculado, viscosidad o consistencia y pH del semen, así como conteo de células, en especial leucocitos. En la Tabla 1 se presentan los parámetros que se evalúan y sus valores de referencia.



Parámetros	Valores de Referencia
Cantidad	Mayor a 2.0 mL
pH	7.2 a 7.8
Aglutinación	Menor a 10%
Viscosidad	Normal
Licuefacción	Normal
Espermatozoides por mL	Mayor a 20 mill/mL
<b>Movilidad</b>	
Móviles	Mayor 50%
Grado	0-4 (4=muy buena, 3=buena, 2=moderada, 1 a 0=mala)
<b>Morfología</b>	
Normales	Mayor de 50%
Macrocéfalos	Menor a 0.5%
Microcéfalos	Menor a 1.5%
Cabezas dobles	Menor a 1.5%
Sin cabeza	Menor a 5%
Amorfos	Menor a 40%

Tabla 1. Parámetros evaluados en la espermatobioscopia y sus valores de referencia.

El análisis macroscópico incluye la evaluación del volumen de semen, el aspecto, la viscosidad, y el pH. El análisis microscópico está enfocado a las características de los espermatozoides. Se analizan la concentración, la movilidad y la morfología de los mismos.

La movilidad espermática se clasifica en cuatro tipos:

Tipo a: Espermatozoides con movilidad progresiva rápida.

Tipo b: Espermatozoides con movilidad progresiva lenta.

Tipo c: Espermatozoides con movilidad in situ, o no progresiva.

Tipo d: Espermatozoides inmóviles.

Dentro de la morfología de los espermatozoides podemos encontrar algunas anomalías, como son: cabeza pequeña, dos cabezas, con dos colas y cabeza alargada entre otras, como se muestran a continuación (Figura 4).



Figura 4. Alteraciones en la morfología del espermatozoide.

Para llegar a conclusiones verídicas sobre la calidad espermática se sugiere realizar al menos 2 análisis seminales, en un periodo entre los 15 a 90 días, con una abstinencia sexual de 3 a 5 días. Si se encuentran anomalías de uno o varios parámetros en los dos exámenes, se consideran como resultados anormales. Si los resultados de estos 2 análisis seminales son marcadamente diferentes debe hacerse un tercer examen antes de llegar a conclusiones, pues la producción de espermatozoides puede variar considerablemente, tanto en algunos hombres normales como en ciertas circunstancias anormales, para lo cual se deben apoyar en la historia clínica del paciente. Es importante recordar que sin excepción, la interpretación de estos análisis debe ser realizada por un especialista del área de la salud.

#### **Obtención de una muestra de semen de calidad analítica.**

Dentro de las medidas necesarias para garantizar los resultados de la espermatobioscopia, se deben observar las siguientes recomendaciones:

##### 1.-Abstinencia sexual

- Ideal: 3 días.
- Mínimo: 2 días.
- Máximo: 6 días.

2.-Remisión de la muestra: La muestra debe ser remitida dentro de la hora de su obtención, protegida de temperaturas extremas (<20 °C > 40°C).

3.-Obtención: Mediante masturbación, recolector seminal o coito interrumpido.

4.-Higiene



Es necesario que el paciente se lave los genitales y las manos con agua y jabón y se seque bien con una toalla limpia, antes de proceder a la obtención de la muestra. El paciente debe orinar completamente, antes de la obtención de la muestra. Se debe obtener la muestra completa, sin descartar ninguna porción con la técnica adecuada, y evitando que entre agua en el recipiente.

### **Importancia de la espermatobioscopía.**

La historia ha mostrado siempre a la mujer como la responsable única de la procreación humana, ya que en ella se desarrolla el embarazo, además de transferirle todo el peso de “la culpa” cuando la gestación no se logra. Por su parte, el varón permaneció ajeno a la problemática de la infertilidad durante milenios hasta el siglo XVII con el descubrimiento de los espermatozoides humanos (1677) y su posterior relación con la procreación.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la infertilidad humana como “la falta de embarazo luego de 12 meses de relaciones sexuales sin protección” y estima que el 8% de las parejas experimentan algún problema de infertilidad durante su vida fértil. La investigación dirigida por la OMS en 1988 (en más de 10,000 parejas infértiles) registró los siguientes índices de responsabilidad en parejas infértiles:

- Causa masculina 33%
- Causa femenina 25%
- Causa compartida 20%
- Causa no determinada 15%
- 

Resultados que muestran hoy en día, la participación masculina en la infertilidad. En la pareja humana durante la edad reproductiva, la práctica de coitos regulares sin el uso de métodos anticonceptivos, generalmente posibilitará la gestación durante el primer año de iniciadas las relaciones sexuales. La mayoría, del 50% - 60%, fecundará en el curso de los tres primeros meses y el 80% lo habrá conseguido antes del año. Se estima que un 10% adicional de casos se embarazarán en el curso del segundo año. Sin embargo, entre el 10% y el 15% de las parejas que desean el embarazo, son involuntariamente infértiles.





En la actualidad, se considera que el hombre y la mujer comparten la responsabilidad de la “procreación” y también la “infertilidad conyugal” por partes iguales. Sin embargo, aún existen prejuicios culturales que postergan y condicionan las evaluaciones del varón sólo en ausencia de factores etiológicos de infertilidad en la mujer. Debido a que la reproducción es una de las funciones más importantes de los seres vivos para asegurar la **descendencia y la supervivencia** de la especie, se han hecho los mayores esfuerzos conjuntos para llevarla a buen término, razón por la cual se deben realizar estudios como la espermatobioscopía, en pro de asegurarla.

## REFERENCIAS

- [1] J, Hillman. *El Mito del análisis: Tres ensayos de psicología Arqueotípica*, Editorial Siruela, 2000, 27-37.
- [2] H, Wendt. *La vida sexual de los animales*, Noguer y Caralt Editores, S.A., 1976, 230-236
- [3] World Health Organization (WHO). *Laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 5th Ed. Switzerland. 2010: 21-26, 32-44.