

UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
ESCUELA DE POSTGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD



TESIS

Toxicidad testicular en ratas albinas inducida por Stermin 600 SL

Tesis presentada para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias de la Salud

PRESENTADA POR:

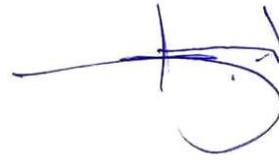
Mag. Marco Antonio Guzmán Tello

Lambayeque, 2024



Mag. Marco Antonio Guzmán Tello

Autor



Dr. César Alberto Guzmán Vigo

Asesor

Presentada a la Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo para optar el Grado Académico de DOCTOR EN CIENCIAS DE LA SALUD

Aprobado por:



Dra. Carmen Patricia Calderón Arias

Presidente del Jurado



Dr. Pedro Antonio Del Carpio Ramos

Secretario del Jurado



Dra. Gianina Llontop Barandiarán

Vocal del Jurado

Siendo las 9:30 horas del día Viernes, 08 de marzo del año Dos Mil Veinticuatro, en la Sala de Sustentación de la Escuela de Posgrado de la

Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo de Lambayeque, se reunieron los miembros del Jurado, designados mediante Resolución N° 215-2022-EPG de fecha 01 marzo 2022, conformado por:

<u>Dra. Carmen Patricia Calderón Arias</u>	PRESIDENTE (A)
<u>Dr. Pedro Antonio Del Cupio Ramos</u>	SECRETARIO (A)
<u>Dra. Gianina Montop Barandiarán</u>	VOCAL
<u>Dr. César Alberto Guzmán Vigo</u>	ASESOR (A)

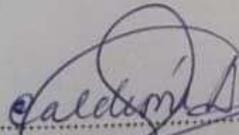
Con la finalidad de evaluar la tesis titulada TOXICIDAD TESTICULAR EN RATOS ALBINOS INDUCIDA POR STERMIN 600 SL

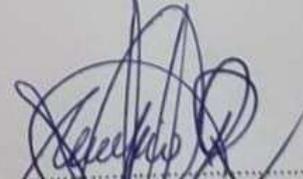
presentado por el (la) Tesista MARCO ANTONIO GUZMAN TELLO sustentación que es autorizada mediante Resolución N° 144-2024-1-EPG de fecha 29 de febrero de 2024

El Presidente del jurado autorizó del acto académico y después de la sustentación, los señores miembros del jurado formularon las observaciones y preguntas correspondientes, las mismas que fueron absueltas por el (la) sustentante, quien obtuvo 20 puntos que equivale al calificativo de EXCELENTE

En consecuencia el (la) sustentante queda apto (a) para obtener el Grado Académico de: DOCTOR EN CIENCIAS DE LA SALUD

Siendo las 10:30 horas del mismo día, se da por concluido el acto académico, firmando la presente acta.


PRESIDENTE


SECRETARIO


VOCAL


ASESOR

DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD

Yo, **MARCO ANTONIO GUZMÁN TELLO** investigador principal y **CÉSAR ALBERTO GUZMÁN VIGO**, asesor del trabajo de tesis “**TOXICIDAD TESTICULAR EN RATAS ALBINAS INDUCIDA POR STERMIN 600 SL**”, declaramos bajo juramento que este trabajo no ha sido plagiado, ni contiene datos falsos, teniendo un índice de similitud de **10%** verificable en el reporte de similitud del programa Turnitin.

En caso se demostrará lo contrario, asumimos responsablemente la anulación de este informe y por ende el proceso administrativo a que hubiere lugar, que puede conducir a la anulación del título o grado emitido como consecuencia de este informe.

Lambayeque, 13 de marzo de 2024



MSC. Marco Antonio Guzmán Tello

Autor



Dr. César Alberto Guzmán Vigo

Asesor

CONSTANCIA DE VERIFICACIÓN DE ORIGINALIDAD DE TESIS

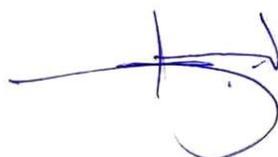
Yo, **CÉSAR ALBERTO GUZMÁN VIGO**, asesor de tesis del estudiante **MARCO ANTONIO GUZMÁN TELLO**.

Titulada

TOXICIDAD TESTICULAR EN RATAS ALBINAS INDUCIDA POR STERMIN 600 SL, luego de la revisión exhaustiva del documento constato que la misma tiene un índice de similitud de **10%** verificable en el reporte de similitud del programa Turnitin.

El suscrito analizó dicho reporte y concluyó que cada una de las coincidencias detectadas no constituyen plagio. A mi leal saber y entender la tesis cumple con todas las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Lambayeque, 26 de marzo de 2024



Dr. César Alberto Guzmán Vigo
Departamento Académico de Biología - FCCBB
DNI: 16641434
Asesor

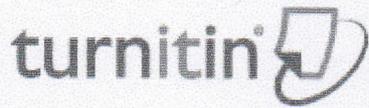
TOXICIDAD TESTICULAR EN RATAS ALBINAS INDUCIDA POR STERMIN 600 SL

INFORME DE ORIGINALIDAD

10%	9%	3%	4%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
2	www.tdx.cat Fuente de Internet	1%
3	Submitted to Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo Trabajo del estudiante	1%
4	www.dspace.cordillera.edu.ec:8080 Fuente de Internet	1%
5	Submitted to Universidad Nacional del Centro del Peru Trabajo del estudiante	1%
6	www.ataonline.org.ar Fuente de Internet	<1%
7	Ihosvani Baños Hernández, Ramón Valdés Carrillo, Idelma Castillo García. "Alteraciones en la fertilidad masculina por exposición a	<1%



Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por Turnitin. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Marco Antonio Guzmán Tello
Título del ejercicio: Quick Submit
Título de la entrega: TOXICIDAD TESTICULAR EN RATAS ALBINAS INDUCIDA POR S...
Nombre del archivo: INFORME.pdf
Tamaño del archivo: 1.96M
Total páginas: 60
Total de palabras: 16,464
Total de caracteres: 91,816
Fecha de entrega: 14-feb.-2024 10:50p. m. (UTC-0500)
Identificador de la entre... 2295218897

 UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
ESCUELA DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD 

TESIS
TOXICIDAD TESTICULAR EN RATAS ALBINAS INDUCIDA POR STERMIN 600 SL

Tesis presentada para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias de la Salud

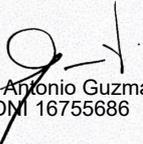
PRESENTADA POR:
MAG. GUZMÁN TELLO MARCO ANTONIO

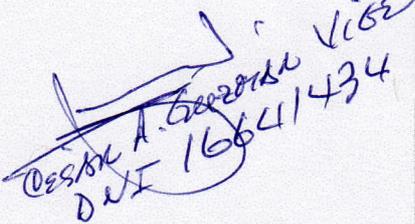
LAMBAYEQUE, 2023

MAG. MARCO ANTONIO GUZMÁN TELLO DR. CÉSAR ALBERTO GUZMÁN VIGO
AUTOR ASESOR

Presentada a la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo para
optar el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS DE LA SALUD


Marco Antonio Guzmán Tello
DNI 16755686


César A. Guzmán Vigo
DNI 16641434

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a **DIOS**, mi padre celestial, por su amor puro que me ayuda y guía mis pasos hacia el éxito personal y profesional.

A mis padres **MARCO** y **SOCORRO**, por constante esfuerzo, dedicación, apoyo y guía en mi formación espiritual y profesional.

A mi esposa **ROCIO** y a mis hijas **MARIAJOSE**, **MARIANGELA** y **MARIAPAZ** quienes han sido mi mayor motivación para nunca rendirme, y por estar siempre presentes con palabras de amor y aliento.

AGRADECIMIENTO

A **CÉSAR ALBERTO**, mi asesor y amigo, por el inmenso apoyo recibido en la elaboración de este trabajo de investigación; por su paciencia, por sus sabias enseñanzas, por sus consejos valiosos, por compartir sus conocimientos, por ser un ejemplo para seguir.

ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria	iii
Agradecimiento	iv
Índice General	v
Índice de Tablas	vi
Índice de Figuras	vii
Índice de Anexos	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN	12
CAPÍTULO I: Diseño Teórico	14
1.1 Antecedentes de la Investigación	14
1.2 Base Teórica	18
1.3 Definiciones Conceptuales	21
1.4 Operacionalización de Variables	26
1.5 Hipótesis	27
CAPÍTULO II: Métodos y Materiales	28
2.1 Tipo de Investigación	28
2.2 Método de Investigación	28
2.3 Diseño de Contrastación	28
2.4 Población, Muestra y Muestreo	28
2.5 Técnicas, Instrumentos, Equipos y Materiales de Recolección de Datos	29
2.6 Procesamiento y Análisis de Datos	30
CAPÍTULO III: Resultados	31
CAPÍTULO IV: Discusión	42
Conclusiones	46
Recomendaciones	47
Referencias Bibliográficas	48
Anexos	58

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1	39
Conteo espermático epididimal (ESC) en ejemplares bajo tratamiento a dosis crecientes de Stermin.	
Tabla 2	39
Viabilidad espermática (ESV) (Necropermia) en ejemplares bajo tratamiento a dosis crecientes de Stermin.	
Tabla 3	40
Características microscópicas del tejido testicular de Rattus sp, tratadas con Stermin según dosis y días post tratamiento.	
Tabla 4	40
Efecto del Stermin sobre los parámetros espermáticos (recuento, motilidad y viabilidad).	

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Sistema reproductor de la rata macho.	31
Figura 2	Microfotografía obtenida de testículos de una rata control que muestra túbulos seminíferos normales (T) que parecen hexagonales o circulares con contorno regular y tejido intersticial (IT). Los túbulos seminíferos muestran una luz clara y una disposición normal de los tipos celulares. (H y E, x 40).	32
Figura 3	Microfotografía obtenida de testículos de una rata control que muestra túbulos seminíferos rodeados de tejido intersticial (IT) que contiene un delicado tejido conjuntivo y células de Leydig (LC). Los túbulos seminíferos muestran una luz clara y una disposición normal de los tipos celulares, espermátidas alargadas (SE), espermátides redondas (SR), espermatoцитos en paquiteno (SP), (H y E, x 100).	32
Figura 4	Microfotografía a gran aumento de testículos de ratas control que muestran túbulos seminíferos revestidos con una serie de células espermatogénicas: espermatogonias (1) espermatoцитos primarios (2) y espermátides redondos (tempranos) (3)	33
Figura 5	Microfotografía a gran aumento de testículos de ratas control que muestran túbulos seminíferos revestidos con una serie de células espermatogénicas: espermatogonias (1) espermatoцитos primarios (2) espermátides redondos (tempranos) (3) y Células de Sertoli (4).	33
Figura 6	Microfotografía (a) de testículos de rata que muestra tubos seminíferos del epidídimo, mostrando los dos compartimentos clásicos: uno basal y otro luminal (o adluminal). Se observa una variación morfológica de los túbulos (H y E, x 40), y en (b) y en (c) microfotografía de gran aumento de testículos de rata que muestra los tubos seminíferos del epidídimo (H y E, x 100).	34
Figura 7	Microfotografía de gran aumento de testículos de rata que muestra células intersticiales. Los túbulos están rodeados por una membrana basal que encierra células mioides (flechas). (H y E, x 100).	34
Figura 8	Microfotografía de testículo de rata bajo tratamiento 5 mg/kg que mostró ausencia de espermatozoides maduros en los túbulos (H y E, x 100).	35
Figura 9	Microfotografía de gran aumento de testículos de rata que muestra ensanchamiento del tejido intersticial (IT), desprendimiento del epitelio germinal y membrana basal irregulares (flechas) y atrofia de células germinales (*). (H y E, x 100).	35
Figura 10	Microfotografía de gran aumento de testículos de rata que muestra ensanchamiento del tejido intersticial (IT), desprendimiento del epitelio germinal (DEG), túbulos seminíferos degenerados; algunos con descamación de todo el epitelio espermatogénico en su luz (*). (H y E, x 100).	36
Figura 11	Microfotografía de testículos de rata que muestra túbulos irregulares (H y E, x 40).	36

- Figura 12 Microfotografía de testículos de rata que muestra túbulos irregulares y con lesiones (H y E, x 40). 37
- Figura 13 Microfotografías de espermatozoides A) Espermatozoides con morfología normal 38
B) Cabeza poco curvada, con inserción del cuello anormal C) Cabeza doblada sobre el cuello, cola angulada D) Cabeza alargada, cola irregular E) Inserción del cuello defectuosa, cola angulada F) Cuello con inserción anormal en la cabeza, cola angulada G) Cuello irregular, cola angulada H) Cuello con inserción irregular, cola enrollada.

ÍNDICE DE ANEXOS

		Pág.
Anexo 1	Extirpación quirúrgica de órganos reproductores de los animales de estudio.	58
Anexo 2	Microfotografías de anomalías de la cabeza del espermatozoide de rata, tinción con Giemsa 400X.	59
Anexo 3	Microfotografías de anomalías de la cola del espermatozoide de rata, tinción con Giemsa 400X.	59
Anexo 4	Preparación de la dosis letal 50 de Stermin 600 SL.	60

RESUMEN

En el presente trabajo se estudia el efecto del pesticida organofosforado Stermin 600 SL en el tejido testicular de ratas albinas. Fueron utilizados 20 ejemplares sexualmente maduros de *Rattus albinus*, estableciéndose un grupo control y 4 tratamientos. Las dosis correspondieron a 1.25, 2.50, 3.75, y 5.0 mg de Stermin 600 SL por kilogramo de peso.

Se evaluó en los ejemplares la morfología del tejido y parámetros seminales: ESC (Conteo espermático epididimal), ESV (Viabilidad espermática - necropermia), morfología espermática e índice de teratozoospermia, a los 8, 16, 35 y 40 días post tratamiento.

De los parámetros seminales evaluados, el ESC disminuyó en relación con la concentración de dosis y días post tratamiento, encontrándose una recuperación ligera a los 40 días. El ESV resultó ser mayor a dosis de tratamiento mayor, produciéndose una disminución de la viabilidad espermática con relación al control. El índice de teratozoospermia mostró ser mayor para el flagelo; y del análisis en el tejido testicular, fueron encontradas lesiones y reducción en los diámetros tubulares.

De la evaluación semicuantitativa de los espermatozoides y de la histología testicular en el control y tratamientos se concluye, que existe un evidente daño en el tejido testicular y sus productos. Se correlaciona directamente los resultados del estudio espermático con la evidencia histológica donde fundamentalmente la espermatocitogénesis se encuentra alterada.

Palabras Clave: O,S – dimetil fosforamidotoato; Stermin, Tamaron; Monitor; organofosforado; pesticidas; morfología espermática anormal, espermatogénesis; teratozoospermia, rata.

ABSTRACT

In this study we examined the toxic effect of organophosphorate pesticide Stermin 600 SL in testicular tissue of albino rats. 20 sexually mature specimens of *Rattus albinus* were used, establishing a control group and 4 treatments. The doses corresponded at 1.25, 2.50, 3.75, and 5.0 mg. of Stermin 600 SL for kilogram of weight.

It was evaluated the seminal parameters: Epididymal sperm count (ESC), epididymal sperm viability (ESV), the sperm morphology, the sperm teratozoospermia index, at the 8, 16, 35 and 40 days post treatment, and the effect on testis histopathology.

Of the evaluated seminal parameters, the ESC diminished in relation to the dose concentration and days post treatment, being a slight recovery to the 40 days. The ESV turns out to be bigger to dose of more treatment, taking place a decrease of the spermatic viability in relation to the control. The teratozoospermia index showed to be bigger for the tail; and of the analysis in testicular tissue, they were opposing lesions and reduction in the tubular diameters.

Of the semiquantitative evaluation of the sperms and effect on histology testicular in the control and treatments we conclude that an evident damage exists in the testicular tissue and its products. It is correlated the results of the spermatic study directly with the histological evidence where fundamentally the espermatocitogenesis is altered.

Keywords: O,S – dimethyl phosphoramidothiolate; methamidophos; tamaron; monitor; organophosphates; pesticides; abnormal sperm morphology; spermatogenesis; teratozoospermia, mouse.

INTRODUCCIÓN

Cada año cerca de 400 billones de toneladas de productos tóxicos químicos son fabricados, en Estados Unidos por ejemplo cerca de 1.20 billones de toneladas de pesticidas son usados anualmente por la industria, el gobierno y propietarios de viviendas. En el año 2001, en todo el mundo los gastos por pesticidas ascendieron a más de 32 mil millones de dólares y los herbicidas representan el 40% del total, seguido por insecticidas, fungicidas y otros tipos de pesticidas. El uso generalizado de pesticidas y otros productos químicos en nuestro suministro de alimentos y otros cultivos es una amenaza potencial constante para la salud y el sustento económico de millones de personas en el mundo entero, ya que los pesticidas pueden tener un efecto a largo plazo en los trabajadores y sus familias.¹

El acefato es un pesticida organofosforado que se ha utilizado ampliamente para controlar insectos y plagas en los campos agrícolas durante décadas, sin embargo, su uso ha sido particularmente restringido en muchos países debido a su producto intermedio tóxico, el metamidofos, que produce inactivación enzimática por fosforilación de los residuos de serina de acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE); ejerciendo una alta toxicidad no solo a través de la inhibición persistente de la AChE sino también a través de la acción bloqueante compleja de los receptores neuronales de la acetil colina nicotínico.²

El uso excesivo de acefato y metamidofos puede provocar un aumento en los niveles de azúcar en la sangre, alteración del metabolismo, daños en el DNA y cáncer en ratas, también estos dos químicos alteran el metabolismo de la glucosa en ratas preñadas y lactantes y predisponen a su descendencia a desarrollar diabetes tipo 2 en la edad adulta. El metamidofos puede causar lesiones en los testículos y el epidídimo, caracterizadas por obstrucción de la espermatogénesis en los testículos y edema severo en el epidídimo respectivamente; así como también puede causar daño al DNA en diferentes etapas de la espermatogénesis y reducir la calidad del esperma en ratones a través de la respuesta acrosómica y la evaluación de la capacidad de fertilización.²

El hecho de que la exposición laboral a pesticidas podría disminuir o destruir la fertilidad de los trabajadores ha generado preocupación sobre los efectos de sustancias peligrosas en la salud reproductiva de los hombres y en otros animales. El clorpirifos, por ejemplo, es un pesticida organofosforado ampliamente utilizado en todo el mundo y se ha informado que está relacionado con deformaciones genitales masculinas y femeninas, así como también se ha descubierto que produce daños en la estructura productora de semen en los testículos de la rata afectando la morfología de los espermatozoides, así como los niveles de testosterona.³

En este contexto en la presente investigación se formuló la interrogante ¿Existe daño testicular en el tejido y productos de la gónada masculina de ratas albinas bajo la influencia de Stermin 600 SL a dosis decrecientes de LD₅₀? Se planteó como objetivo general “evaluar los grados de toxicidad que produce el pesticida Stermin 600 SL aplicado en el peritoneo de Ratas mantenidas bajo condiciones de Laboratorio” y como objetivos específicos, 1. “Determinar las concentraciones tóxicas del plaguicida Stermin 600 SL”, 2. “Identificar el efecto tóxico generado por Stermin 600 SL en las células espermáticas de la rata”, 3. “Evaluar la morfología del espermatozoide y su relación con las concentraciones del ensayo”, 4. “Determinar la variación de los parámetros seminales referidos a: conteos espermáticos del epidídimo (ESC) y viabilidad de células espermáticas (ESV)” y 5. “Determinar el índice de teratozoospermia por medio de la evaluación morfológica de espermatozoides en microscopía óptica”.

CAPÍTULO I. DISEÑO TEÓRICO

1.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

El metamidofos es un insecticida, acaricida y avicida organofosforado residual altamente activo, sistémico, con acción de contacto y estomacal. Su modo de acción en insectos y mamíferos consiste en disminuir la actividad de una enzima importante para la función del sistema nervioso llamada acetilcolinesterasa, que es esencial en la transmisión normal de los impulsos nerviosos. El metamidofos es un potente inhibidor de la acetilcolinesterasa y es eficaz contra insectos masticadores y chupadores y se utiliza para controlar pulgones, escarabajos pulgas, gusanos, moscas blancas, trips, garfios, escarabajos de la patata de Colorado, gusanos tubícolas de la patata, gusanos soldados, ácaros, saltahojas y muchos otros. Los usos agrícolas incluyen brócoli, Coles de Bruselas, coliflor, uvas, apio, remolacha azucarera, algodón, tabaco y patatas. Se utiliza en el extranjero para muchas hortalizas, lúpulo, maíz, melocotones y otros cultivos.¹

La exposición a largo plazo del metamidofos en organismos no objetivo tiene como resultado efectos venenosos graves, lo que ha despertado la preocupación pública y la demanda de la eliminación de estos contaminantes del medio ambiente. Los compuestos organofosforados (OP) son uno de los pesticidas más utilizados debido a su amplio espectro, especificidad y alta eficiencia frente a insectos y plagas. El metamidofos es el más común y eficiente que se utiliza para el control de plagas en la agricultura. En la actualidad, el metamidofos se ha convertido en un foco de preocupación pública debido a los efectos nocivos de la exposición a pesticidas en invertebrados, mamíferos y humanos.²

La prueba básica para determinar la toxicidad aguda relativa de los productos químicos para los animales es la determinación de LD₅₀. Los valores de LD₅₀ orales para plaguicidas están generalmente disponibles. Sin embargo, se reconoce que el valor de un compuesto dado puede variar no solo para diferentes especies, sino también para diferentes cepas e incluso para diferentes laboratorios. Se necesitan valores estrictamente comparables determinados en condiciones tan similares como sea posible. Además, con frecuencia se carece de información sobre la toxicidad cutánea aguda de los plaguicidas.⁴

El uso de organofosforados ha estimulado la investigación sobre la posible existencia de efectos relacionados con su actividad tóxica para la reproducción. Se realizó un estudio para evaluar los efectos del Clorpirifos en los testículos, el principal órgano de reproducción masculina. Clorpirifos a niveles de dosis de 7,5, 12,5 y 17,5 mg / kg peso / día se administró por vía oral a ratas macho de la cepa Wistar durante 30 días para evaluar las alteraciones tóxicas en la histología testicular, bioquímica, dinámica de los

espermatozoides y niveles de testosterona. El examen histopatológico de los testículos mostró cambios degenerativos de leves a severos en los túbulos seminíferos a varios niveles de dosis. Se concluye que el Clorpirifos induce un daño testicular severo y da como resultado una reducción en el recuento de espermatozoides y, por lo tanto, afecta la fertilidad. Se sabe que los pequeños cambios en el recuento de espermatozoides tienen efectos adversos sobre la fertilidad humana.³

El metamidofos (MET) tiene efectos sobre la reproducción masculina, incluida la disminución de la fertilidad. Se evaluaron los efectos de MET sobre la calidad del esperma, la fertilización y la integridad del ADN, explorando la sensibilidad de las diferentes etapas de la espermatogénesis. Los ratones macho adultos recibieron MET (3,75 o 5 mg / kg de peso corporal / ip / día / 4 días) y se sacrificaron 1, 28 o 45 días después del tratamiento (dpt) para evaluar los efectos de MET sobre la maduración del epidídimo, la meiosis o la mitosis, respectivamente. En 1-dpt, MET inhibió la AChE (43 a 57%) y aumentó las células anormales (6%). Mientras que a los 28 y 45 dpt, la espermotilidad y la viabilidad se redujeron significativamente con un aumento de la dosis de MET, y la morfología anormal aumentó a 5 mg / kg / día / 4 días. Los datos sugieren que la meiosis y la mitosis son las etapas más sensibles de la espermatogénesis para la toxicidad reproductiva MET en comparación con la maduración del epidídimo.⁵

Se examinaron 22 pesticidas *in vitro* para determinar sus efectos sobre los hepatocitos, las mitocondrias y las microsomas aisladas de ratas macho. Doce pesticidas reducen sulfhidrido no proteico (NPSH) contenido en hepatocitos a menos del 80% del control a una concentración de 10^{-3} M. Se consideró que la hepatotoxicidad de la triclamida estaba asociada con sus efectos adversos directos sobre la producción de energía mitocondrial, ya que desacoplaba la respiración mitocondrial aislada a 10^{-6} M y agotaba el contenido de ATP celular antes de la muerte celular. Por el contrario, la hepatotoxicidad inducida por clorotalonil y ziram parecía estar relacionada con sus efectos de depleción sobre los sulfhidrilos celulares, ya que la adición del compuesto tiol ditiotreitól a la mezcla de incubación de hepatocitos protegía las células. Con respecto a la respiración mitocondrial aislada, cuatro pesticidas inhibieron las tasas de respiración del estado 3 y/o el estado 4 en $10^{-3} - 10^{-4}$ M, mientras que siete pesticidas desacoplaron la respiración del estado 4 en $10^{-3} - 10^{-6}$ M.⁶

Cinco insecticidas, a saber; abamectina, carbosulfán, fenpropatrin, metomilo y profenofos se administraron mediante gavages a ratas albinas macho. Estos insecticidas se administraron diariamente durante 28 días con dosis iguales a $1/20$ DL₅₀, ya sea individualmente o en una mezcla de todos los insecticidas juntos. El estudio reveló disminuciones significativas en el peso corporal y renal, mientras que aumentó el peso del

hígado en todos los tratamientos. La mayoría de los tratamientos indujeron elevaciones significativas en la alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) séricas, mientras que causaron disminuciones en las actividades de la acetilcolinesterasa (AChE). En ratas tratadas con la mezcla se observaron encogimiento en la cápsula de Bowman y cambios degenerativos del epitelio que recubre los túbulos renales. Además, se observaron cambios necróticos asociados con la descamación de los túbulos que recubren el epitelio en ratas tratadas con la mezcla de fenpropatrin y metomilo.⁷

La Oficina de Programas de Plaguicidas (OPP) de la Agencia de Protección Ambiental ha desarrollado un protocolo estándar para evaluar la penetración dérmica de plaguicidas en la rata. Este protocolo se formalizó en 1994 como una guía para los estudios de absorción dérmica de plaguicidas. Hasta la fecha, se han presentado a la OPP más de 263 estudios sobre la absorción dérmica de más de 160 plaguicidas químicos como parte de los procesos de registro de plaguicidas y evaluación de riesgos. La mayoría de estos estudios se han realizado de acuerdo con el protocolo estándar OPP en ratas. Estos estudios constituyen la base de datos más grande que existe sobre la absorción dérmica de una amplia variedad de sustancias químicas que utilizan un protocolo estándar. A partir de este protocolo estándar es posible describir, cuantitativamente con dosis y tiempo, la entrada de una sustancia química y la penetración a través de la epidermis de los mamíferos en la circulación sistémica, su concentración en sangre y en el cuerpo, y su excreción en orina y heces.⁸

El plaguicida organofosforado clorpirifos (CPF) inhibe la acetilcolinesterasa y puede modificar la contractilidad muscular y los patrones respiratorios. Se estudiaron los efectos de la exposición crónica a CPF sobre los parámetros respiratorios y la contractilidad del diafragma en ratas de 21 y 60 días de edad. Las ratas preñadas se expusieron a CPF oral (1 o 5 mg / kg / día: grupos CPF-1 o CPF-5 vs vehículo: controles) desde el inicio de la gestación hasta el destete de las crías que fueron alimentadas individualmente por sonda (CPF o vehículo) a partir de entonces. Se estudiaron dos momentos de desarrollo: destete (día 21) y edad adulta (día 60). En ambas edades, la amplitud de contracción y el índice de fatiga del diafragma fueron más altos en el grupo CPF-5, debido a la menor actividad de la acetilcolinesterasa. Se concluye que la exposición crónica a CPF se asocia con un mayor índice de apnea del sueño y contractilidad del diafragma, y modifica los patrones respiratorios en ratas juveniles y adultas que duermen.⁹

Se realizó un estudio *in vivo* para determinar la relación entre la concentración del plaguicida metamidofos y la actividad de la neurotratación acetilcolina esterasa (AChE) en cerebro y eritrocitos de ratas y también la concentración del plaguicida que provoca una inhibición del 50% de las enzimas. El estudio *in vivo* aborda el efecto del metamidofos

sobre las hormonas sexuales femeninas, estradiol y progesterona, tras cinco tratamientos orales sucesivos con 10 mg kg semanales. Los datos mostraron que la actividad de AChE disminuyó claramente. La interacción puede considerarse inhibición irreversible porque finalmente conduce a un bloqueo completo de la actividad enzimática que se aclara por inhibición permanente. Se encontró que la concentración del pesticida que causa un 50% de inhibición de la AChE en el cerebro y los eritrocitos era de $3,2 \times 10^{-5}$ M y 10^{-4} M respectivamente, después de un período de preincubación de 30 minutos.¹⁰

Se examinaron los efectos de la exposición de ratas hembra a dos pesticidas sobre la maduración del desarrollo de la descendencia durante el período de lactancia. Las ratas hembra lactantes se expusieron a 1 a 4 mg / kg de metamidofos intraperitoneal, 200 a 800 mg / kg de clorotalonil o ambos. Las dosis más altas de metamidofos afectaron la viabilidad de las crías hacia el día 21 de vida. Los hitos del desarrollo evaluados en las crías fueron la erupción de los incisivos, el despliegue de la oreja, la apertura de los ojos y el descenso de los testículos. La erupción de los incisivos se aceleró en muchos grupos y la mayoría de las crías de ratas expuestas al metamidofos presentaron un desdoblamiento de las orejas y apertura de los ojos más tardía que la descendencia del grupo de control. La maduración sexual (descenso de los testículos) se retrasó significativamente en algunos grupos. Tomado en conjunto, estos resultados demuestran influencias relacionadas con la exposición en varias medidas de desarrollo.¹¹

Los plaguicidas organofosforados (OP) inducen trastornos neuroconductuales, pero se sabe poco acerca de sus efectos sobre el comportamiento agresivo. Se investigó los efectos de la exposición repetida a metamidofos, sobre el comportamiento agresivo inducido por el aislamiento en ratones. Se alojaron individualmente 47 ratones macho durante un mes. Los animales socialmente aislados fueron luego confrontados con un oponente estándar no aislado durante 15 minutos, y se registró la latencia y frecuencia de los comportamientos exploratorios agresivos y generales. Según la presencia de comportamiento de ataque en el ensayo previo al tratamiento, los ratones se clasificaron como agresivos y no agresivos. Luego, todos los ratones fueron tratados durante 7 días con metamidofos (3,5 mg / kg / día, n = 22, intraperitoneal (ip)) o solución salina (1 ml / kg / día, grupo de control, n = 25, ip), y se realizó una segunda prueba. La exposición repetida al metamidofos indujo un comportamiento de ataque en ratones no agresivos, esto sugiere que el metamidofos tiene un efecto pro-agresivo en ratones socialmente aislados.¹²

1.2. BASE TEÓRICA

El mayor uso de plaguicidas desde la Revolución Verde de la década de 1960 ha introducido nuevos peligros para los seres humanos y los animales. Un amplio espectro de plaguicidas se utiliza extensamente en la agricultura para mejorar la producción, minimizar las pérdidas, proteger los cereales de la contaminación por hongos, repeler ectoparásitos, controlar enfermedades transmitidas por vectores, repeler plagas domésticas y como antihelminintos con pautas y restricciones limitadas. El uso extensivo de plaguicidas en prácticas agrícolas ha resultado en la contaminación de alimentos y recursos alimenticios. Estos productos químicos tóxicos influyen en la fisiología de numerosas especies no objetivo, incluido el hombre. Varias especies animales, incluidos los humanos, han acumulado rastros de plaguicidas a lo largo de la cadena alimentaria o por exposición ocupacional.¹³

Los pesticidas son una categoría de productos químicos que están formulados para matar o repeler una plaga o detener su reproducción. Dentro de esta categoría, hay una variedad de subcategorías, como insecticidas, fungicidas, rodenticidas, pediculocidas y biocidas. Aunque las indicaciones de los efectos sobre la salud de los plaguicidas son aplicables a la población en general, ciertas subpoblaciones merecen una preocupación particular y protecciones especiales. Durante un período crítico de desarrollo, desde la concepción hasta la pubertad, la exposición a pesticidas puede resultar en un mayor riesgo de efectos sobre la salud.¹⁴

Los plaguicidas organofosforados (OP) son un término genérico que incluye todos los insecticidas que contienen fósforo. Todos se derivan del ácido fosfórico y generalmente son los más tóxicos de todos los pesticidas para los vertebrados. El sistema nervioso es el objetivo principal de los OP. Los estudios epidemiológicos han revelado su vínculo con un mayor riesgo de desarrollo de cáncer. Las consecuencias de tales exposiciones en la salud humana son complejas y aún no se comprenden bien, lo que hace que la evaluación del riesgo de cualquier efecto tóxico de las mezclas químicas sobre la salud humana sea incómoda. La exposición aguda a pesticidas ha proporcionado datos que muestran una correlación con varias patologías humanas, incluyendo hepatotoxicidad, inmunotoxicidad, mayor riesgo de enfermedades hematopoyéticas, enfermedades cerebrales y cánceres, enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, y deficiencias en el desarrollo cerebral o defectos inmunitarios y reproductivos.¹⁵

La exposición a plaguicidas está relacionada con resultados adversos para la salud reproductiva y del desarrollo que pueden ocurrir a lo largo del ciclo de vida de hombres y mujeres. La exposición a plaguicidas puede interferir con todas las etapas del desarrollo

de la función reproductiva en las mujeres adultas y se ha asociado con la esterilidad en los hombres, el aborto espontáneo, la disminución del crecimiento y la supervivencia fetal, así como con cánceres en la niñez y la edad adulta. En los 30 años transcurridos desde el primer informe de esterilidad humana debido a la exposición al pesticida nematocida dibromocloropropano (DBCP), la preocupación científica sobre si el uso de pesticidas u otros químicos altera la calidad del semen ha aumentado sustancialmente. Una gran cantidad de datos sugiere que el conteo de espermatozoides ha estado disminuyendo en Europa y USA, pero los datos actualmente no permiten una conclusión definitiva sobre si la exposición de adultos a pesticidas, a niveles ambientales de fondo, altera la calidad del semen.¹⁶

Los plaguicidas, incluidos sus supuestos ingredientes inertes, se encuentran entre una lista creciente de productos químicos que se ha demostrado que interfieren con el desarrollo sexual, la reproducción y la fertilidad cuando la exposición ocurre durante las etapas vulnerables de la vida.¹⁷ La toxicidad reproductiva inducida por organofosforados en mamíferos se manifiesta generalmente por alteraciones en el comportamiento y desempeño sexual, inicio de la pubertad, producción y transporte de gametos, ciclo reproductivo anormal y senescencia reproductiva prematura, infertilidad, pérdida del feto durante el embarazo o modificaciones en otras funciones, que dependen de la integridad de los sistemas reproductivos tanto en hombres como en mujeres. Los estudios en animales y en humanos revelaron que los plaguicidas OP tienen el potencial de actuar como disruptores endocrinos.¹⁸

Los pesticidas tienen efectos tóxicos en una variedad de especies animales y están asociados con diferentes enfermedades como alteración endocrina, defectos en el crecimiento del feto y la posibilidad de anomalías en los espermatozoides. Es probable que los organismos que son vulnerables a los plaguicidas tengan más posibilidades de cambiar el comportamiento de un organismo, lo que influye en su capacidad de supervivencia. Muchos disruptores endocrinos pueden causar cambios hormonales en el cuerpo de un organismo que influyen en su tasa de fertilidad y otros problemas reproductivos.¹⁹ Los pesticidas pueden afectar el sistema endocrino de diferentes especies animales, desde invertebrados hasta reptiles, peces, aves y mamíferos.²⁰

Los problemas que resultan de la exposición a pesticidas por parte del hombre pueden ser causados por alteraciones en la estructura o función del material genético del esperma o por otros daños tóxicos a los espermatozoides o la función testicular. Un hombre que tiene niveles circulantes de pesticidas en sangre puede, teóricamente, exponer el entorno uterino de una mujer durante el coito al depositar semen cargado de pesticidas en la vagina. Está bien documentado que los miembros de la familia de

hombres expuestos a plaguicidas pueden estar expuestos cuando el hogar está contaminado con estos agroquímicos en su ropa, piel o calzado.²¹

Los efectos reproductivos que se han asociado con la exposición a plaguicidas en las mujeres son la disminución de la fertilidad, los abortos espontáneos, la muerte fetal, el parto prematuro, el bajo peso al nacer, las anomalías del desarrollo, los trastornos ováricos y la alteración de la función hormonal.²² En la literatura mundial se ha descrito un aumento significativo en la incidencia de infertilidad masculina, lo que plantea interrogantes sobre sus causas. Parte de este efecto puede deberse a la acción de sustancias tóxicas sintéticas sobre el sistema endocrino (disruptores endocrinos), muchas de las cuales se utilizan en procesos laborales.²³

La exposición ocupacional ocurre mientras se mezclan, se cargan, se pulverizan y se evalúan los pesticidas. Existen diferentes tipos de riesgos laborales que afectan a los órganos reproductivos tanto en hombres como en mujeres. Sin embargo, la actividad reproductiva masculina es muy sensible a muchos agentes químicos y físicos artificiales producidos por las actividades agrícolas e industriales.²⁴ Los pesticidas pueden dañar el sistema reproductor masculino de varias maneras: toxicidad para la reproducción con daño directo a la estructura de las células; alterar la estructura del ADN, causando mutaciones genéticas que pueden resultar en defectos de nacimiento o incapacidad para concebir; cambiar la forma en que se expresan los genes a través de un efecto llamado epigenético; pueden actuar como disruptores endocrinos (EDC); asociarse a metabolitos de insecticidas piretroides afectando la concentración, motilidad y reducción de espermatozoides, morfología y aumento del daño del ADN.²⁵

Varios estudios han demostrado una disminución en la calidad del semen humano y un mayor riesgo de subfertilidad masculina, que es entendida como la incapacidad para concebir después de 12 meses de relaciones sexuales regulares sin protección, condición que afecta aproximadamente al 15% de todas las parejas en el mundo occidental. Se ha proporcionado una descripción general de los mecanismos de toxicidad reproductiva inducida por plaguicidas y los efectos sobre la fertilidad masculina, ya que la exposición a plaguicidas puede ser una de las causas de estos trastornos. Los plaguicidas pueden dañar directamente los espermatozoides, alterar la función de las células de Sertoli o de las células de Leydig, o alterar la función endocrina en cualquier etapa de la regulación hormonal (síntesis, liberación, almacenamiento, transporte y eliminación de hormonas; reconocimiento y unión de receptores; función tiroidea; y el sistema nervioso central).²⁶

La exposición a pesticidas podría ser una de las causas que contribuyan a la disminución del recuento de espermatozoides y al aumento de los niveles de infertilidad masculina. Los efectos adversos de los plaguicidas en el medio ambiente recibieron una atención generalizada por primera vez en la década de 1960. Sin embargo, solo recientemente se ha postulado que la baja exposición a largo plazo de estos productos químicos está cada vez más relacionada con efectos sobre la salud humana, como la inmunosupresión, la alteración endocrina, las anomalías reproductivas y el cáncer.²⁷

1.3. DEFINICIONES CONCEPTUALES

ACEFATO

El acefato es un insecticida organofosforado de uso general. Está registrado para su uso en cultivos alimentarios, semillas agrícolas y plantas no reproductoras, instituciones y edificios comerciales, incluidas instalaciones de salud pública, césped, césped para campos de golf, hormigueros y plantas de vivero hortícola. El acefato es un insecticida sistémico que se usa para controlar insectos chupadores y picadores por contacto directo o ingestión. Ejerce toxicidad al inhibir la enzima acetilcolinesterasa en la sinapsis y las uniones neuromusculares. Es moderadamente tóxico para los mamíferos, se convierte en metamidofos en el cuerpo y se disipa rápidamente en el suelo.²⁸

ACETILCOLINA

La acetilcolina (ACh) es un neurotransmisor, un éster de colina y ácido acético aislada por primera vez en 1914 y su papel como neurotransmisor fue identificado por el trabajo de Otto Loewi. Se sabe que la acetilcolina juega un papel importante en la memoria y el aprendizaje y no está disponible adecuadamente en la enfermedad de Alzheimer. La acetilcolina es un neurotransmisor en diversas sinapsis, nervios y en la placa motora terminal de los músculos de los vertebrados. Cuando un impulso nervioso llega a la terminación nerviosa, la acetilcolina almacenada en vesículas se libera y se une a un receptor postsináptico, lo que provoca la despolarización, y dado que la acetilcolina es degradada por la enzima acetilcolinesterasa, tiene un breve periodo de acción. Los inhibidores de la enzima, sin embargo, prolongan la vida útil de la acetilcolina. Los gases nerviosos y los organofosforados provocan la acumulación de acetilcolina y la toxicidad asociada.²⁹

ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS

Las anomalías cromosómicas, también llamadas cromosomopatías, son el resultado de mutaciones que cambian el número de cromosomas (anomalías numéricas) o cambian la estructura del cromosoma (anomalías estructurales). Pueden alterar la capacidad de la

célula para sobrevivir y funcionar.³⁰ Las anomalías numéricas comprometen cromosomas completos faltantes o extras del par normal, mientras que, las anomalías estructurales ocurren cuando parte de un cromosoma individual falta, se adiciona, se cambia a otro cromosoma o se invierte.³¹

ACETILCOLINESTERASA

La enzima acetilcolinesterasa (AChE) es una serina hidrolasa cuya función principal es degradar la acetilcolina (ACh) y terminar la neurotransmisión. Aparte de su papel en la transmisión sináptica, la AChE tiene varias funciones "no clásicas" en células no neuronales. La AChE participa en el crecimiento celular, la apoptosis, las vías de resistencia a los fármacos, la respuesta a las señales de estrés y la inflamación.³²

La acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima clave en el sistema nervioso. Termina los impulsos nerviosos catalizando la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina. Como objetivo molecular específico de los plaguicidas organofosforados y carbamatos, la actividad de la acetilcolinesterasa y su inhibición se han reconocido desde el principio como un marcador biológico humano de intoxicación por plaguicidas. La medición de la inhibición de la AChE se ha utilizado cada vez más en las últimas dos décadas como un biomarcador del efecto sobre el sistema nervioso tras la exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos en la medicina ocupacional y ambiental. El éxito de este biomarcador surge del hecho de que reúne una serie de características necesarias para la aplicación exitosa de una respuesta biológica como biomarcador en el biomonitoreo humano: la respuesta es fácil de medir, muestra un comportamiento dependiente de la dosis a la exposición a contaminantes, es sensible y exhibe un vínculo con efectos adversos para la salud.³³

BIOCIDAS

Los biocidas son sustancias o productos que se utilizan para proteger contra plantas, animales o microorganismos no deseados. Se producen en forma líquida y en polvo, en formulaciones listas para usar o como concentrados, y se aplican utilizando una variedad de técnicas. Generalmente, los biocidas se dividen en cuatro grupos principales: desinfectantes y biocidas generales, conservantes, control de plagas y otros biocidas. Los biocidas son tóxicos no solo para los microorganismos, sino también muy a menudo para las especies no objetivo. Por tanto, la legislación europea exige el registro de biocidas sobre la base de una evaluación de riesgos.³⁴

CÉLULAS DE LEYDIG

Las células de Leydig son las células testiculares responsables de la biosíntesis y secreción de andrógenos, que son fundamentales para el desarrollo del tracto

reproductivo y para la función reproductiva en el hombre. Hay dos poblaciones distintas de células de Leydig: las células de Leydig fetales (FLC), que se originan y funcionan en el feto, pero en gran medida regresan poco después del nacimiento, y las células de Leydig adultas (ALC). Las FLC producen altos niveles de testosterona (T) necesarios para la estimulación de la diferenciación sexual masculina y el descenso de los testículos. Las ALC se forman a partir de células precursoras durante la vida posnatal. Las células adultas producen altos niveles de T necesarios para mantener la espermatogénesis y las características sexuales secundarias masculinas en la vida adulta. Se ha demostrado que varios tóxicos ambientales alteran la función de FLC, el desarrollo de ALC y / o la función de ALC. Con base en el momento en que las células están expuestas en el ciclo de vida, se ha demostrado que la exposición a sustancias tóxicas tiene una variedad de consecuencias patológicas, que incluyen hipospadia y criptorquidia, como resultado de la exposición de FLC; pubertad retrasada, como resultado de exposiciones posnatales de células precursoras de Leydig; o hipogonadismo e infertilidad, como resultado de exposiciones de ALC.³⁵

CÉLULAS GERMINALES

Las células germinales son los precursores embrionarios de los gametos. Se separan de los linajes de células somáticas en las primeras etapas del desarrollo de la mayoría de las especies. En el ratón, las células germinales, una vez que se han formado, migran a través de los tejidos del embrión hasta los primordios de las gónadas (crestas genitales), donde se ensamblan con las células gonadales somáticas para formar los cordones sexuales. Los cordones sexuales son los precursores de los túbulos seminíferos de la gónada masculina o los folículos ováricos de la gónada femenina. Además de su compleja diferenciación en óvulos y espermatozoides, las células germinales conservan la propiedad de pluripotencia, necesaria para que los gametos se diferencien en nuevos individuos. Las células germinales que no entran en los primordios de las gónadas pueden convertirse en tumores de la línea germinal más adelante en la vida. Los errores en la diferenciación de las células germinales pueden provocar infertilidad.³⁶

COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS

Los compuestos organofosforados (OP) incluyen fósforo trivalente y pentavalente; a menudo se piensa que estos productos químicos son insecticidas o agentes nerviosos cuya toxicidad aguda surge de la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE), pero los compuestos OP también se utilizan ampliamente como retardadores de llama, aditivos para combustibles, lubricantes, plastificantes y productos farmacéuticos. Además de sus efectos agudos, algunos compuestos anti-AChE OP se han asociado con el síndrome

intermedio. Finalmente, compuestos OP que inhiben y envejecen la esterasa diana de la neuropatía, producen neurotoxicidad retardada inducida por compuestos OP, una degeneración distal de los axones sensoriales y motores en los nervios periféricos y la médula espinal.³⁷

DAÑO TESTICULAR

Alteraciones en la histología testicular (cambios degenerativos de leves a severos en los túbulos seminíferos), bioquímica, dinámica de los espermatozoides (reducción en el recuento de espermatozoides) y niveles de testosterona.³

DOSIS LETAL (L/D)

LD₅₀ y LC₅₀, dosis letal 50 / concentración letal 50, es la dosis o concentración inhalada de una sustancia que conducirá a la muerte del 50% de la población dosificada. Aunque se están desarrollando otras pruebas que pueden suplantar en cierto grado la forma actual de pruebas, estas medidas siguen estando entre las más importantes para medir la toxicidad. Muchos eventos llevaron a la implementación y el uso continuo de estas pruebas, aunque las poblaciones de prueba se redujeron significativamente de su tamaño original, pero el siglo pasado ha visto un refinamiento y una mejora significativa de los métodos.³⁸

METAMIDOFOS

Metamidofos (O, S-fosforamidotoato de dimetilo; con Número de Registro 10265-92-6 en el Registro de Resúmenes Químicos, es el ingrediente activo de varios insecticidas organofosforados comerciales, incluidos Monitor7, Tamaron7 y Swipe7. Fue patentado por Bayer Corporation en 1965 y Chevron Chemical Corporation en 1967. La acción del metamidofos actúa inhibiendo la acetilcolinesterasa y tiene una toxicidad muy alta para los mamíferos. Está clasificado por la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. como un compuesto de clase I (los requisitos de etiquetado incluyen "Peligro-Veneno"). No hay evidencia de carcinogenicidad.³⁹

MODELOS ANIMALES

Ciertos animales han sido utilizados como modelos durante siglos para predecir lo que los productos químicos y los factores ambientales afectarían a los humanos. Su uso en la medicina experimental, el estudio farmacológico y la evaluación toxicológica es una práctica bien establecida y esencial. Ya sea que sirva como fuente de células o tejidos aislados, un modelo de enfermedad o como una predicción de la acción de un fármaco u otra acción xenobiótica en humanos, los experimentos con animales también han servido

con éxito como identificadores de peligros potenciales y toxicidad en humanos para productos químicos sintéticos con muchos usos previstos.⁴⁰

MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

La morfología de los espermatozoides se examina actualmente en frotis de semen con los principales criterios de normalidad que se basan en los parámetros morfométricos de la cabeza, la pieza intermedia y el flagelo del espermatozoide.⁴¹ La clasificación de la morfología de los espermatozoides y su valor diagnóstico y pronóstico son todavía un tema de debate. De acuerdo con las recomendaciones actuales de la OMS, los criterios estrictos que definen los espermatozoides morfológicamente normales se utilizan ampliamente en los laboratorios de andrología. Mientras que los valores de referencia oficiales están pendientes, estudios recientes sugieren valores umbral de 8 a 10% de formas normales para distinguir entre hombres fértiles e infértiles.⁴²

PLAGUICIDA

Plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies de plantas o animales indeseables que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. Este término incluye las sustancias que se utilizan como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra la deterioración durante el almacenamiento y transporte.⁴³

STERMIN 600 SL

Es un insecticida organofosforado, translúcido, incoloro, pungente, concentrado soluble, con una composición química de O, S – dimethyl phosphoramidothioate (Methamidophos) 600 g/L, Dietilenglicol y humectantes 570 g/L, altamente tóxico, con dosis de toxicidad de DL₅₀ oral aguda: 20 mg/kg y DL₅₀ dermal aguda: 410 mg/kg. Inhibe la acción de acetilcolinesterasa (Ach) la enzima responsable de la destrucción y terminación de la actividad biológica del neurotransmisor acetilcolina (AC). Con la acumulación de la AC, se altera el funcionamiento normal del impulso nervioso. Se utiliza en el control de *Myzus persicae* "Pulgón", *Liriomyza huidobrensis* "Mosca minadora", *Premnotrypes suturicallus* "Gorgojo de los andes", *Prodiplosis longifila* "Mosquilla del

ovario”, *Spodoptera frugiperda* “Cogollero”. Se expende en el comercio con otros nombres como: LASSER 600, MATADOR 600 SL, MISIL 600 SL, MONOFOS, THODORON 600, METAMIDOFOS.⁴⁴

TERATOZOOSPERMIA

La teratozoospermia es una alteración espermática caracterizada por problemas en la morfología de los espermatozoides. La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece unos valores de referencia y una muestra de semen debe tener al menos un 4% de espermatozoides con formas normales para considerarse una muestra seminal buena. En cambio, si una muestra de esperma tiene más de un 96% de espermatozoides amorfos, el diagnóstico será teratozoospermia. Por otro lado, otra clasificación de las muestras de semen es mediante el criterio de Kruger. En este caso, la muestra seminal será teratozoospermica si presenta más de un 85% de espermatozoides amorfos.⁴⁵

TOXICIDAD AGUDA

Los estudios de toxicidad aguda se llevan a cabo para determinar los efectos adversos causados por una sola dosis, a menudo grande, de una sustancia química. Los objetivos son descubrir posibles efectos adversos para la salud que pudieran atribuirse al agente investigado. Este artículo aborda cuestiones relacionadas con la planificación y realización de dichos estudios, y la interpretación de los resultados de estos. Además, se analizan varias de las pruebas alternativas validadas que respaldan las '3 R'.⁴⁶

1.4. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLES	DEFINICIÓN DE LA VARIABLE	DIMENSIÓN	INDICADORES	INSTRUMENTOS
Variable Dependiente	Toxicidad	Cambios Histológicos: Morfología del tejido gonádico	Morfología y distribución del tejido en la gónada	Ficha de Recolección de Datos
		Cambios Morfológicos: Morfología espermática	Morfología del espermatozoide	
			Motilidad de los espermatozoides	
		Muerte celular		
Variable Independiente	Tipo de Plaguicida	Intensidad de aplicación	Concentración	Ficha de Recolección de Datos
		Tiempo de aplicación	Tiempo	

1.5. HIPÓTESIS

H_1 : Existe daño testicular en el tejido y en los productos de la gónada de ratas albinas bajo la influencia de Stermin 600 SL a dosis decrecientes de LD_{50} .

H_0 : No existe daño testicular en el tejido y en los productos de la gónada de ratas albinas bajo la influencia de Stermin 600 SL a dosis decrecientes de LD_{50} .

CAPÍTULO II. MÉTODOS Y MATERIALES

2.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

De acuerdo con el tipo de investigación que se persigue: Aplicada

De acuerdo con la respuesta del problema: Experimental

2.2. MÉTODO DE INVESTIGACIÓN

En esta investigación se desarrollará el método deductivo – inductivo.

2.3. DISEÑO DE CONTRASTACIÓN

Por ser la naturaleza del trabajo de tipo experimental, se aplicará un modelo de diseño de muestra múltiple y estímulo creciente.

2.4. POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO

El presente trabajo se realizó en una población de 20 ratas macho albinas, sexualmente maduras, estableciéndose cinco grupos de cuatro ejemplares cada uno denominándose grupos A, B, C, D y E.

El grupo A fue designado como grupo control, y los ejemplares de este grupo, fueron inyectados con solución salina fisiológica (SSF) (placebo).

A los grupos siguientes B, C, D y E se les aplicó una dosis de 5 mg/kg, 3.75 mg/kg, 2.5 mg/kg y 1.25 mg/kg respectivamente. Estas dosis fueron tomadas en cuenta a partir de la intoxicación letal intraperitoneal testada en el piloto del experimento.^{47, 48, 12, 5}

Las ratas fueron expuestas a un ciclo de luz/oscuridad de 12 h en una habitación bien ventilada durante todo el periodo. Se les proporcionó alimento y agua *ad libitum*.⁴⁹

El Stermin 600 SL, fue disuelto en solución salina (NaCl 0,9%) y se administraron por vía intraperitoneal las dosis antes señaladas durante 4 días. Se eligió la ruta intraperitoneal (i.p.) para permitir una administración precisa y eficiente de la dosis elegida y reducir la variabilidad de la exposición. Las dosis se seleccionaron en base a la LD₅₀ reportada por Burruel et al, (2000), que es de 10 a 15 mg/kg; por lo tanto, las dosis representan porcentajes si se toman 15 mg/kg como LD₅₀. El tiempo de exposición (4 días) se eligió para garantizar la exposición a las células maduras. Los controles recibieron solamente (0,1 ml de solución salina).^{5, 50} Los animales se sacrificaron a los 8, 16, 35 y 40 días post tratamiento, para determinar los parámetros seminales de conteo de espermatozoides (ESC – Epididymal sperm count) y el de necropermia (ESV – porcentaje of dead cells), y realizar la evaluación semicuantitativa de la histología testicular.⁵¹

El sacrificio de los especímenes se realizó por utilización de Pentobarbital sódico, según lo propuesto por AVMA, 2020.⁵²

Los testículos se fijaron en una solución acuosa de p-formaldehído al 4 % y se lavaron en tampón fosfato 10 mmol/l, pH 7,4 a 4 °C durante 12 horas. Después de la deshidratación, los tejidos se incluyeron en parafina, se cortaron en secciones, se tiñeron con hematoxilina-eosina (H y E) y, finalmente, fueron observados los cortes con un microscopio Nikon a 400x.⁴⁹

2.5. TÉCNICAS, INSTRUMENTOS, EQUIPOS Y MATERIAL DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Al final del tratamiento, los animales fueron sacrificados éticamente y se realizó la extirpación quirúrgica (ver anexo 01) y el pesaje de los testículos y el epidídimo. Los espermatozoides fueron obtenidos por laceración del tejido testicular de manera adecuada en 5 mL de PBS, pH 7,4, filtrándolos en un recipiente con doble gasa. El filtrado fue centrifugado a 1000 rpm durante 30 segundos y luego resuspendido, procediéndose a realizar conteos de espermatozoides de testículo y epidídimo en un hemocitómetro Neubauer, expresando el número de espermatozoides por miligramo de tejido.⁴⁸ Se extrajo la cola del epidídimo de un testículo y se colocó en 2 ml de solución de cloruro de sodio al 0,9 % en una placa de Petri esterilizada a 37 °C. Luego, se usó una tijera esterilizada para sacar el contenido del epidídimo a la solución y formar una suspensión. La motilidad de los espermatozoides se examinó bajo un microscopio óptico de alta potencia de 400x. El recuento de espermatozoides se realizó bajo un microscopio óptico de 100x.⁵³

Los niveles de teratospermia se evaluaron solo en los espermatozoides del epidídimo. Se tomó una suspensión de semen de 200 microlitros y se incubó durante 10 minutos en 1 ml de tioglicolato de sodio 0,8 M, pH 9,0 (agente reductor) para una mejor evidencia del fenómeno de descondensación de la cromatina. Los frotis de semen fueron teñidos con Giemsa 5% en buffer fosfato 6,8, montada con bálsamo y observada al microscopio óptico con un aumento de 400 X – 1000X. La coloración con eosina fisiológica 0.5% fue practicada para la determinación de la necrospermia – viabilidad (ESV) y para el conteo de espermias se utilizó una cámara de Neubauer. La coloración Giemsa se realizó sobre los extendidos de semen con la finalidad de estudiar la morfología espermática a 400X – 1000X.⁵⁴ La coloración HE fue practicada para los cortes histológicos del tejido gonádico. Se analizaron cuatro campos y se contaron 250 espermatozoides por campo. Los resultados fueron expresados como porcentaje de espermatozoides anormales por miligramo de tejido epididimario. Los espermatozoides considerados como anormales o teratospérmicos fueron evaluados según el manual de la OMS, 2021.^{55, 48}

Se cortaron secciones seriadas de parafina (5 μm) del testículo derecho y se prepararon para tinción con hematoxilina y eosina (H y E) para su examen bajo un microscopio óptico.⁵⁶

Para el estudio histológico semicuantitativo del grado histológico de degeneración de sección tubular fue clasificado en tres categorías: 1) Secciones tubulares normales, 2) Secciones tubulares hipoespermatogénicas caracterizadas por una disminución en el espesor del epitelio seminífero que contiene todos los tipos celulares de la línea germinal y ocasionalmente con descamación de células germinales y 3) Secciones de túbulos en parada o detención donde el epitelio seminífero presenta parada en la maduración de la línea germinal en cualquiera de sus etapas. De cada testículo fueron seleccionadas 2 secciones de 5 μm de espesor al azar y 10 secciones tubulares de cada sección fueron analizadas.

Instrumento de recolección de datos: Microscopio Olympus, Micrótopo, Batería para coloración H-E, Eosina, Hemocitómetro, Laptop, Ficha de recolección de datos.

2.6. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS

Los datos están presentados como Media \pm SD y se realizó la prueba t de Student para el análisis estadístico de los resultados. Se consideraron significativos los valores con $p < 0,05$.

CAPÍTULO III. RESULTADOS

Los especímenes se mantuvieron con signos vitales durante los días postratamiento, observándose diferencias en el peso corporal, debilidad y frecuencia aumentada de micción y defecación.

Estudios de Cortes Histológicos

Al realizar la disección de los especímenes, fue observada una morfología normal del aparato reproductor, tal como se ilustra en la figura 1. Los cortes histológicos de los testículos de rata, en los especímenes control mostraron una citología normal que muestra túbulos seminíferos revestidos con una serie de células espermatogénicas: espermatogonias, espermatoцитos primarios y espermátidas redondas (tempranas). Se observaron también células de Sertoli. Los túbulos están redondeados por una membrana basal que encierra células mioides. Los espacios intersticiales entre los túbulos contienen células intersticiales de Leydig (L) que tienen un núcleo vesicular con nucléolo prominente.

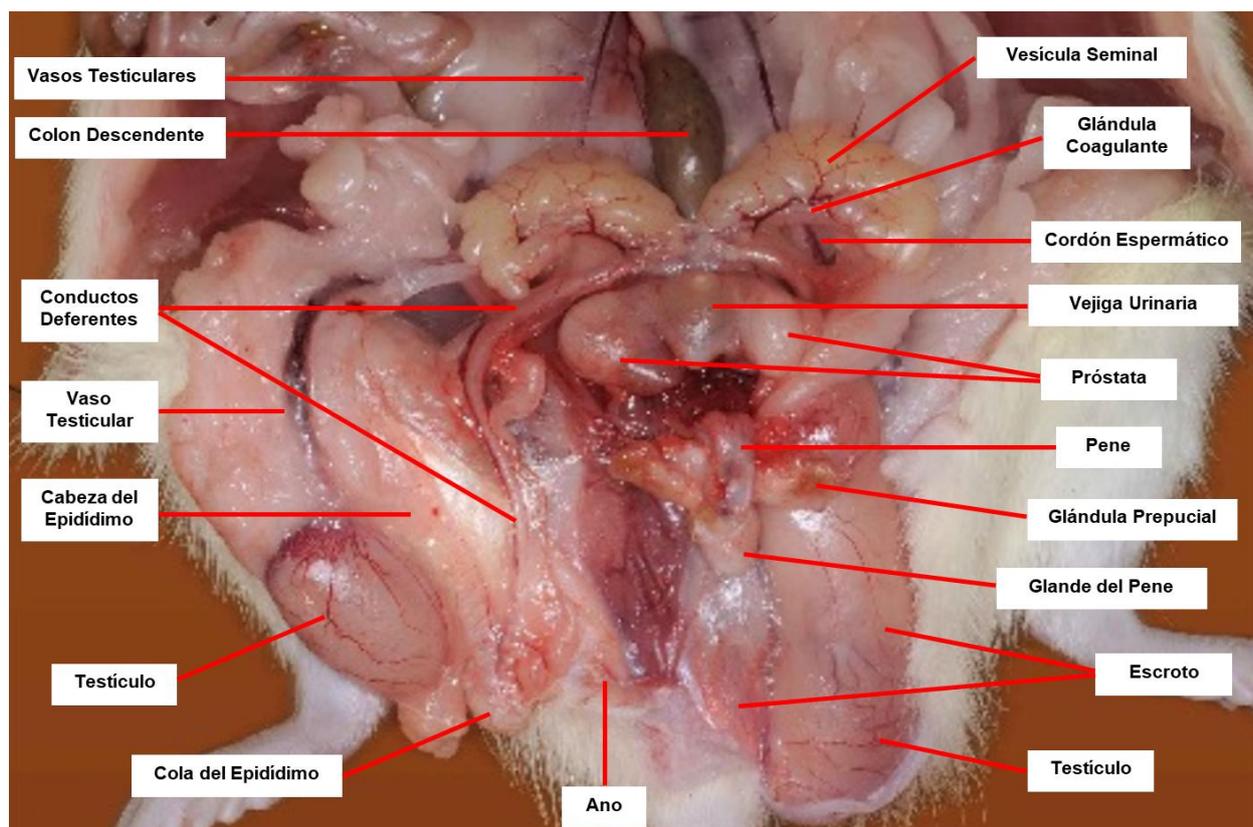


Figura 1. El sistema reproductor de la rata macho*

* Tomado de Löw et al., 2016⁵⁷

Las figuras 2 y 3, muestran la histología normal del testículo de rata, formas de los túbulos seminíferos y disposición de los elementos celulares.

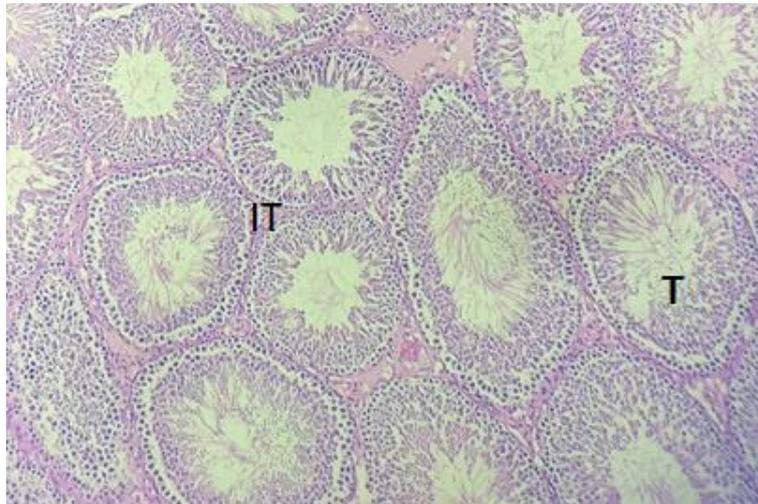


Figura 2. Microfotografía obtenida de testículos de una rata control que muestra túbulos seminíferos normales (T) que parecen hexagonales o circulares con contorno regular y tejido intersticial (IT). Los túbulos seminíferos muestran una luz clara y una disposición normal de los tipos celulares. (H y E, x 40).

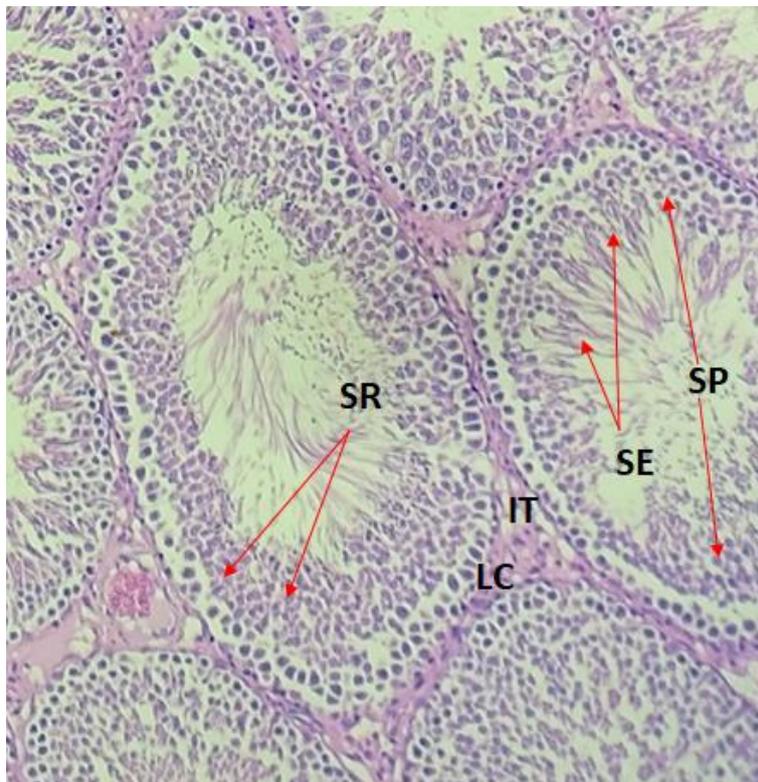


Figura 3. Microfotografía obtenida de testículos de una rata control que muestra túbulos seminíferos rodeados de tejido intersticial (IT) que contiene un delicado tejido conjuntivo y células de Leydig (LC). Los túbulos seminíferos muestran una luz clara y una disposición normal de los tipos celulares, espermátidas alargadas (SE), espermátidas redondas (SR), espermátocitos en paquiteno (SP), (H y E, x 100).

Las figuras 4 y 5 muestran una disposición de los elementos celulares meióticos y las células de Sertoli, en cortes histológicos de tubos seminíferos de ratas control. La mayoría de las secciones transversales tubulares mostraban un epitelio seminífero normal. Sin embargo, también se observaron algunas secciones tubulares hipoespermatogénicas. Las células mioides localizadas en la pared tubular y las células de Leydig ubicadas cerca de los vasos sanguíneos intersticiales mostraron una morfología normal.

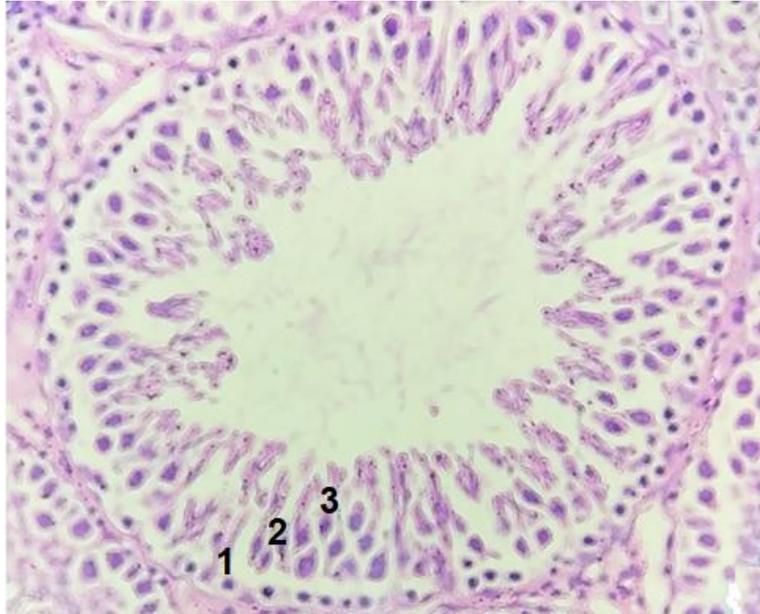


Figura 4. Microfotografía a gran aumento de testículos de ratas control que muestran túbulos seminíferos revestidos con una serie de células espermatozoarias: espermatozoarias (1) espermatozoarias primarias (2) y espermatozoarias redondas (tempranas) (3)

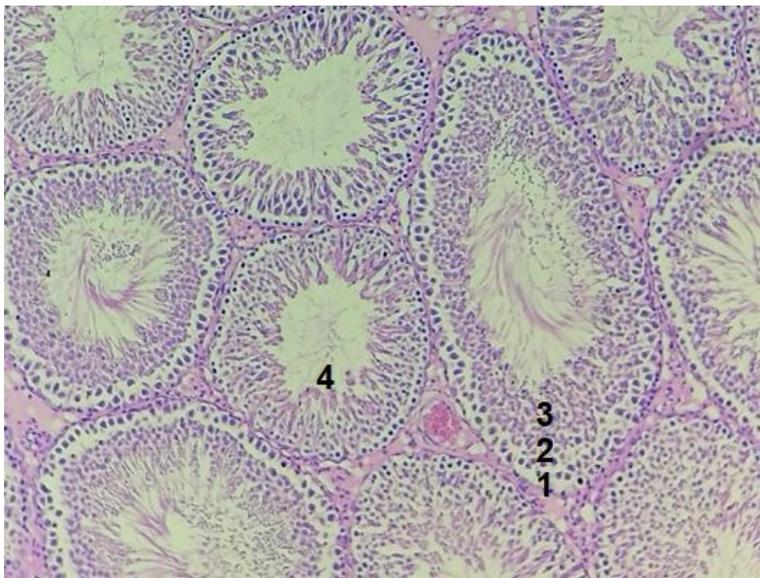


Figura 5. Microfotografía a gran aumento de testículos de ratas control que muestran túbulos seminíferos revestidos con una serie de células espermatozoarias: espermatozoarias (1) espermatozoarias primarias (2) espermatozoarias redondas (tempranas) (3) y células de Sertoli (4)

La figura 6 muestra la variación morfológica de los túbulos seminíferos del epidídimo, y una distribución normal de los elementos celulares a gran aumento.

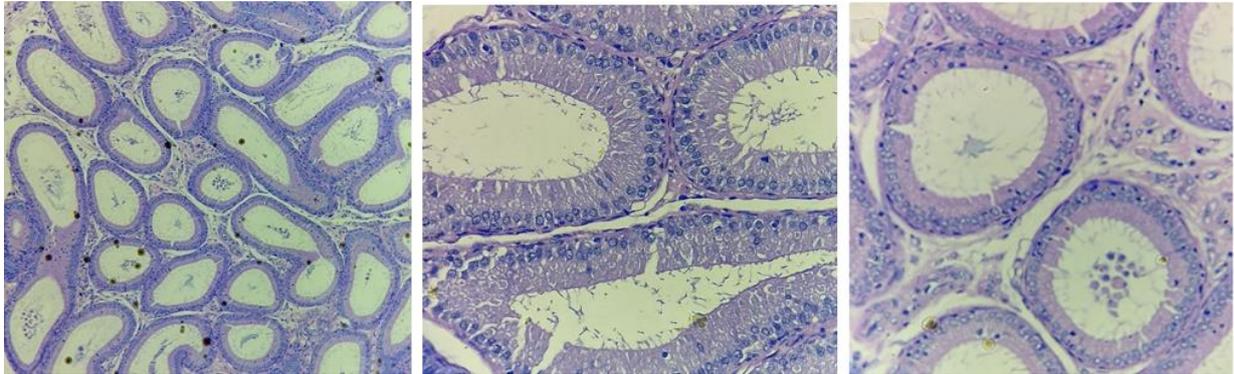


Figura 6. Microfotografía (a) de testículos de rata que muestra tubos seminíferos del epidídimo, mostrando los dos compartimentos clásicos: uno basal y otro luminal (o adluminal). Se observa una variación morfológica de los túbulos (H y E, $\times 40$), y en (b) y en (c) microfotografía de gran aumento de testículos de rata que muestra los tubos seminíferos del epidídimo (H y E, $\times 100$).

La figura 7 muestra las células intersticiales (de Leydig), capaces de producir testosterona y el factor similar de insulina (INSL3), los cuales se encuentra encargados de la diferenciación sexual masculina; la membrana basal y las células mioides contráctiles peritubulares.

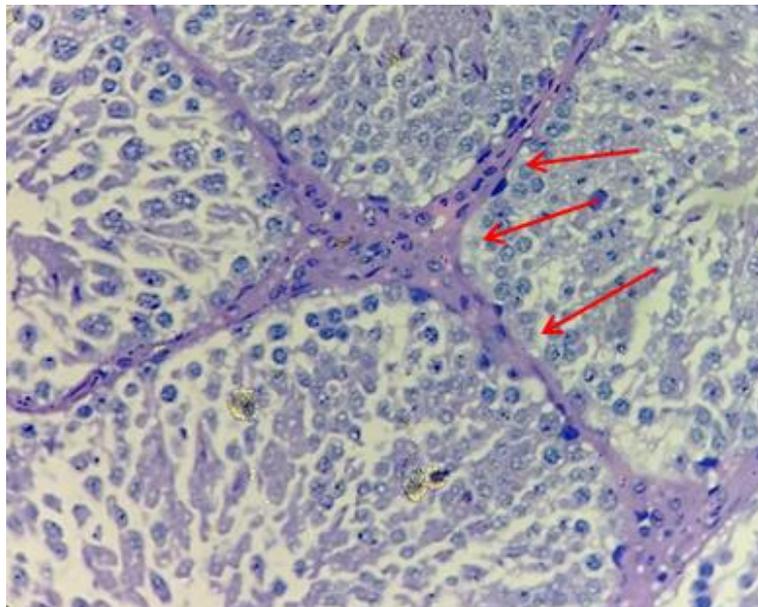


Figura 7. Microfotografía de gran aumento de testículos de rata que muestra células intersticiales. Los túbulos están rodeados por una membrana basal que encierra células mioides (flechas). (H y E, $\times 100$).

La figura 8 muestra testículos de rata con ausencia de espermatozoides maduros en los túbulos por la inoculación de la dosis más alta en el experimento.

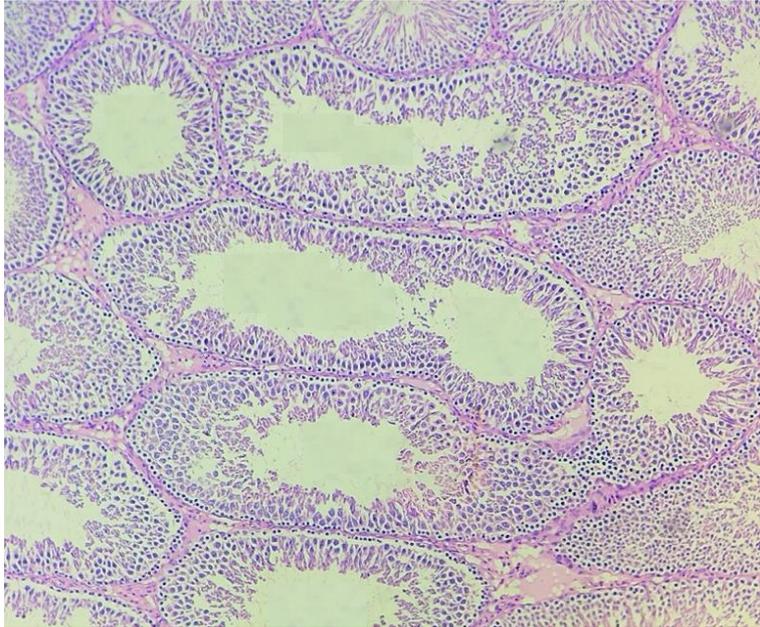


Figura 8. Microfotografía de testículo de rata bajo tratamiento 5 mg/kg que mostró ausencia de espermatozoides maduros en los túbulos (H y E, x 100).

Las figuras 9 y 10 muestran un gran aumento de los testículos de ratas lo que ocasiona un ensanchamiento del tejido intersticial, desprendimiento de epitelio germinal, membranas basales irregulares, atrofia de las células germinales y túbulos seminíferos degenerados.

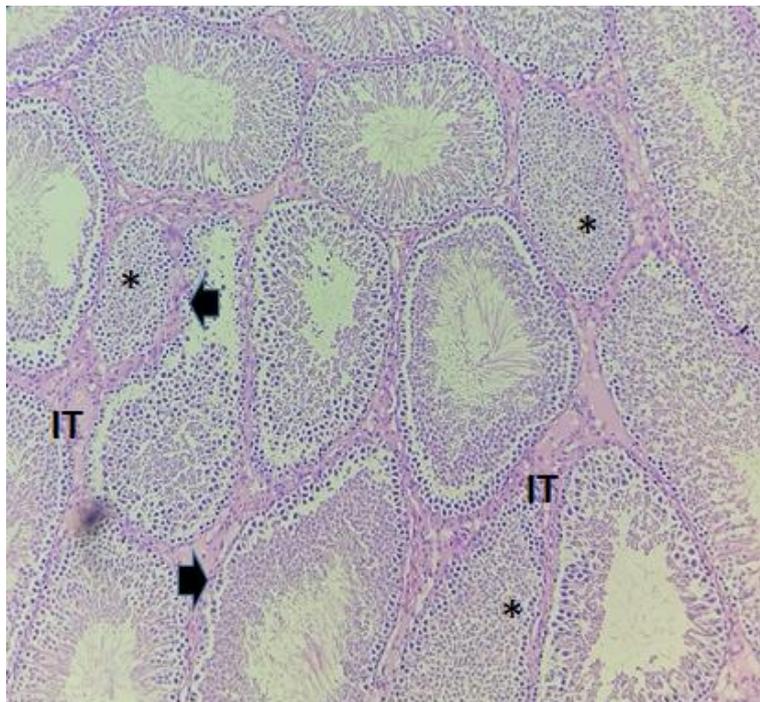


Figura 9. Microfotografía de gran aumento de testículos de rata que muestra ensanchamiento del tejido intersticial (IT), desprendimiento del epitelio germinal y membrana basal irregulares (flechas) y atrofia de células germinales (*) (H y E, x 100).



Figura 10. Microfotografía de gran aumento de testículos de rata que muestra ensanchamiento del tejido intersticial (IT), desprendimiento del epitelio germinal (DEG), túbulos seminíferos degenerados; algunos con descamación de todo el epitelio espermatogénico en su luz (*). (H y E, x 100).

El análisis cualitativo de la histología testicular con microscopía de campo claro mostró el efecto del Stermin con daño significativo a dosis mayores, en la espermiocitogenesis, espermatogénesis, y túbulos seminíferos (figura 11). La necrosis más evidente se registró en la dosis de 5 mg/kg.

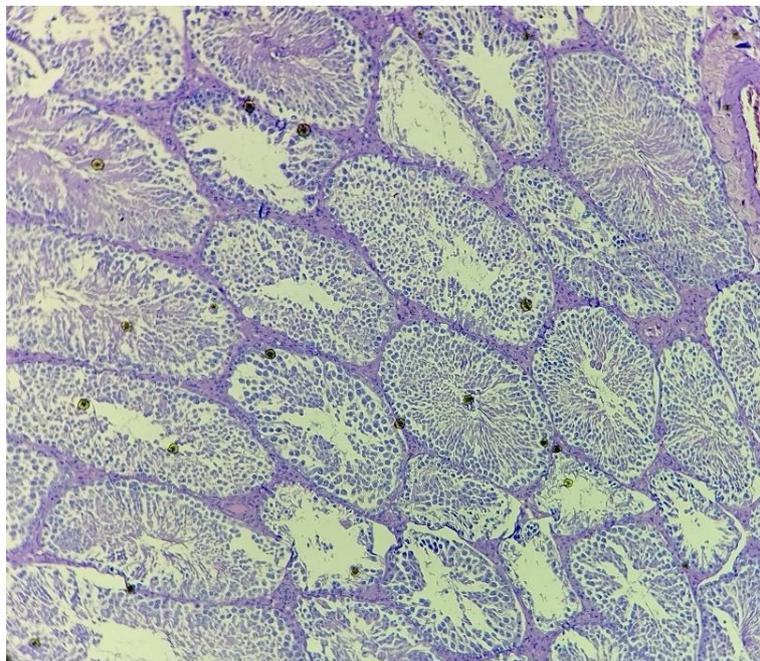


Figura 11. Microfotografía de testículos de rata que muestra túbulos irregulares (H y E, x 40).

El parénquima testicular formado por los túbulos seminíferos que en las imágenes aparecen en diversos planos de corte, ocupan la mayor parte del testículo, las vías seminales intra testiculares y el tejido intersticial. Estuvo conformado por secciones de túbulos con epitelio seminífero normal alternando con otros con diversos grados de alteración o degeneración histológica incluyendo la hipoespermatogénesis, detención de la maduración celular a nivel de espermatocitos y espermatidas. Los túbulos hipoespermatogénicos presentaron un aumento de la luz tubular, por disminución del espesor del epitelio seminífero. En los túbulos aparecieron tipos celulares normales así también como aquellos que presentaron un grado de degeneración al que se le consideró como epitelio hipoespermatogénico con descamación celular en la luz tubular. La detención de la espermatogénesis se observó con un epitelio formado sólo por espermatogonias, células de Sertoli y espermatocitos. Por último, se encontró túbulos en los que el epitelio se reducía sólo a escasas espermatogonias y células de Sertoli o sólo células de Sertoli.

El daño significativo fue registrado a dosis mayores, en la espermiocitogenesis, espermatogénesis, y túbulos seminíferos (figura 12). La necrosis más evidente se registró en la dosis de 5 mg/kg.

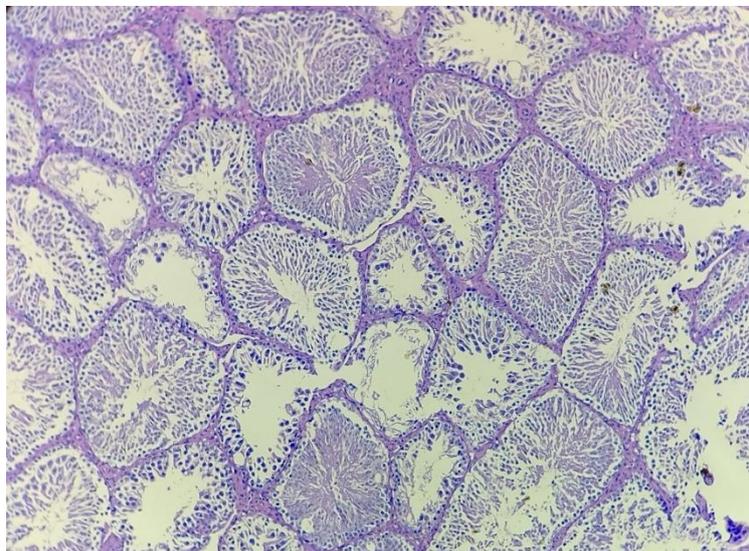


Figura 12. Microfotografía de testículos de rata que muestra túbulos irregulares y con lesiones (H y E, x 40).

La figura 13 muestra la morfología normal del espermatozoide de la rata y las alteraciones en la morfología post tratamiento con Stermin.

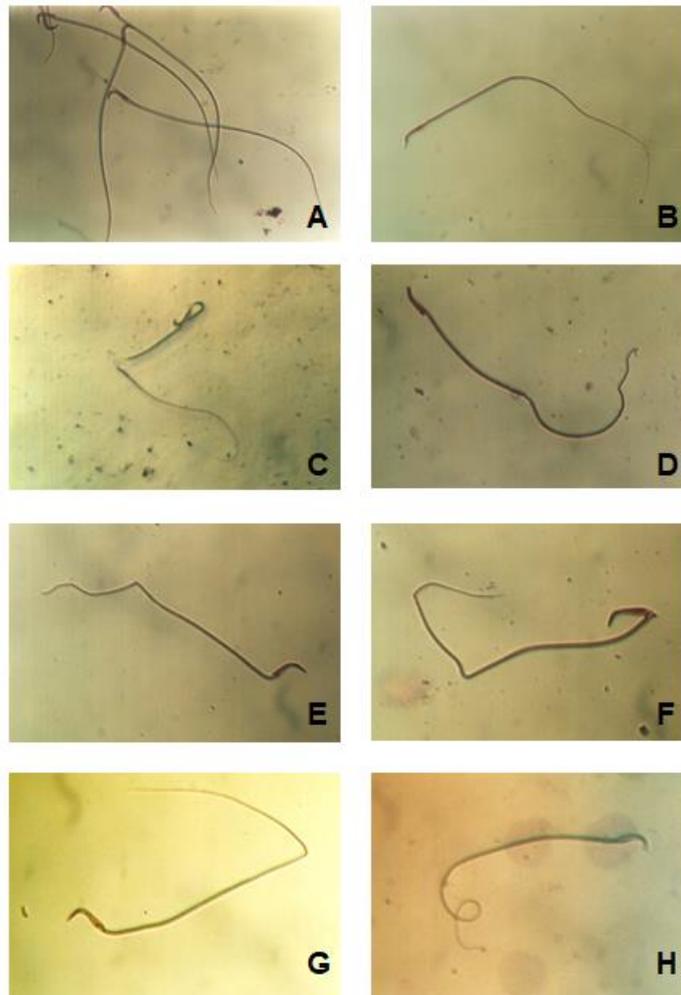


Figura 13. Microfotografías de espermatozoides A) Espermatozoides con morfología normal B) Cabeza poco curvada, con inserción del cuello anormal C) Cabeza doblada sobre el cuello, cola angulada D) Cabeza alargada, cola irregular E) Inserción del cuello defectuosa, cola angulada F) Cuello con inserción anormal en la cabeza, cola angulada G) Cuello irregular, cola angulada H) Cuello con inserción irregular, cola enrollada.

Tabla 1. Conteo espermático epididimal (ESC) en ejemplares bajo tratamiento a dosis crecientes de Stermin.

dosis mg/kg	días post tratamiento			
	8	16	35	40
Control	88.8	88.7	88.5	89.0
1.25	86.6	85.2	82.9	80.1
2.50	85.3	84.6	80.8	82.0
3.75	33.4	66.0	80.5	93.0
5.00	20.6	20.7	50.3	70.3

Los ejemplares expuestos a altas dosis mostraron una disminución del peso con relación a aquellos expuestos a dosis mínimas. El conteo de espermatozoides (ESC) (Tabla 1) en los ejemplares sometidos a tratamientos en dosis altas mostraron ESC inferior con relación al grupo control.

Tabla 2. Viabilidad espermática (ESV) (Necrospermia) en ejemplares bajo tratamiento a dosis crecientes de Stermin.

dosis mg/kg	días post tratamiento			
	8	16	35	40
Control	1.8	1.6	1.8	1.3
1.25	2	5	8	10
2.50	30	35	48	48
3.75	32	37	48	46
5.00	30	36	46	42

El porcentaje de espermatozoides muertos (ESV) o necrospermia fue mayor a dosis mayores. El ESV y el ESC decrecieron en animales tratados para todos los intervalos post tratamientos examinados (Tablas 1, 2). El índice de teratozoospermia mostró ser mayor para el flagelo en los animales tratados con Stermin a dosis creciente, evidenciándose alteraciones morfológicas, tales como se muestran en la figura 13.

Tabla 3. Características microscópicas del tejido testicular de *Rattus albinus*, tratadas con Stermin según dosis y días post tratamiento.

Dosis mg/kg	Células Germinales	Espermiogénesis	Espermátides	Fibrosis Estromal	Células de Leydig
1.25	Con alteraciones significativas	Sin alteraciones significativas	Sin alteraciones significativas	No se evidencia	Ocasionalmente
2.50	Leve disminución	Leve disminución	Leve disminución	No se evidencia	Levemente aumentada
3.75	Con necrosis en 20% de los túbulos	Disminución notoria	ESC disminuido	No se evidencia	No se evidencia
5.00	Con necrosis en 40% de los túbulos	Notoria en más del 50%	ESC disminuido o abolido	No se evidencia	No se evidencia
BASAL	Presentes y organizados	Presente	Presente	Ausente	Ausente

Tabla 4. Efecto del Stermin sobre los parámetros espermáticos (recuento, motilidad y viabilidad)

Parámetros	Control	G1	G2	G3	G4	
Concentración (x 10 ⁶ /ml)	84.64 ± 6.84	83.71 ± 6.70	72.73 ± 4.19	57.59 ± 3.15	51.05 ± 2.36	
Viabilidad (%)	80.00 ± 0.96	79.10 ± 1.25	75.30 ± 1.28	72.27 ± 2.11	78.73 ± 1.10	
Motilidad (%)	N	59.91 ± 3.19	56.12 ± 3.14	51.03 ± 2.36	48.79 ± 2.83	44.91 ± 3.10
	A	24.78 ± 1.41	22.42 ± 1.47	21.68 ± 1.33	20.02 ± 1.41	19.87 ± 1.32
	B	19.05 ± 1.23	18.87 ± 1.21	16.94 ± 1.20	16.44 ± 1.22	15.11 ± 1.17
	C	16.08 ± 1.16	14.83 ± 1.12	12.41 ± 1.11	12.33 ± 1.17	9.93 ± 1.13
	D	17.67 ± 2.98	16.20 ± 2.77	14.62 ± 4.59	4.41 ± 1.46	2.11 ± 0.88

En la Tabla 4 se observa una reducción no significativa en el recuento y la motilidad de los espermatozoides en el grupo tratado G1 en comparación con el grupo de control. Sin embargo, hemos encontrado una reducción significativa mayor y muy mayor ($P < 0,01$, $P < 0,001$) en los grupos G3 y G4, respectivamente, en comparación con el control.

La influencia es no significativa del Stermin en los espermatozoides del grupo G1 en comparación con el control, mientras que en los grupos G3 y G4, observamos un aumento significativo ($P < 0,05$, $P < 0,01$) en comparación con el grupo de control. La motilidad de los espermatozoides tipo (A, B y C) disminuyó en los grupos G3 y G4, pero el grupo G2 no se vio afectado significativamente ($P > 0,05$) en comparación con los animales control.

CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN

Muchas investigaciones sobre toxicidad y genotoxicidad de plaguicidas en diferentes escenarios ocupacionales o medio ambientales se han realizado utilizando diversas metodologías.^{58, 59, 60, 61, 62, 63} Ha sido reportado que la exposición a contaminantes medioambientales, incluidos los plaguicidas, produce efectos patológicos en el sistema reproductor humano^{64, 65}, así como en animales de experimentación⁶⁶. Los métodos propuestos aplicados en los especímenes utilizados en el presente trabajo, y el uso del pesticida Stermin, causaron alteraciones en el sistema reproductor.

La exposición crónica o retardada a insecticidas ejerce su toxicidad en varios sistemas, como el nervioso, el inmunológico, el respiratorio y el reproductivo; considerando la estructura química, los insecticidas podrían dividirse en cinco grupos: (i) organoclorados, (ii) organofosforados, (iii) carbamatos, (iv) piretrinas/piretroides y (v) nicotina/neonicotinoides. De ellos los organofosforados tienen efectos perjudiciales dependientes de la dosis sobre la morfología de los testículos y los túbulos seminíferos al causar atrofia e inducir la muerte de las células germinales⁶⁹. Las aplicaciones de los pesticidas pueden ser en dosis orales⁷⁰, intraperitoneales⁷¹ o por procesos inhalatorios⁷².

El presente trabajo examinó los efectos potenciales del STERMIN (Metamidophos) en la función reproductiva ratas macho, después de la administración oral letal media en dosis de tratamiento subletal de 5 mg/kg, 3,75 mg/kg, 2,5 mg/kg y 1,25mg/kg. Sin embargo, se ha señalado que la LD₅₀ oral aguda de metamidofos para ratas fue de 30 mg kg⁻¹ día⁻¹.⁷⁴

Urióstegui-Acosta⁵, administró a ratones macho adultos 10 a 12 semanas de edad, 3,75 o 5 mg/kg/día de metamidofos durante 4 días en base a la DL₅₀ y tiempo conocido para completar la maduración epididimal de los ratones que luego fueron sacrificados 1, 28 o 45 días después del tratamiento (dpt) para evaluar los efectos de metamidophos sobre la maduración epididimaria, la meiosis o la mitosis, respectivamente. De otro lado la dosis de toxicidad aguda en ratas ha sido indicada entre 15 y 30 mg/kg de peso corporal según la LD₅₀ en aplicaciones orales.⁷⁵

Ha sido señalado que el metamidofos y su formulación Monitor 74 son muy tóxicos por vía oral, con valores de LD₅₀ similares en ratas y ratones, de 13 a 16 mg/kg, para ambos sexos⁷⁶. Peiris⁷⁷ estudió los efectos reproductivos del metamidofos, en ratas macho después de una administración oral subcrónica (en 3 días alternos). Las dosis probadas fueron 1,8750 y 0,9375 mg/kg/día y los efectos reproductivos se investigaron hasta 28 a 35 días después del tratamiento.

Según la NAC/AEGL utilizando protocolos estándar, se aplicó metamidofos para detectar toxicidad oral y dérmica aguda e irritación y sensibilización de la piel, correspondiendo La DL₅₀ oral aguda a 15,6 mg/kg en ratas macho y de 13,0 mg/kg en ratas hembra⁷⁸. Los efectos de los OP han sido investigados exhaustivamente en ratas, por ejemplo, el dimetilmetilfosfonato (DMMP) y el trimetilfosfato (TMP) provocan esterilidad en roedores, provocan células gigantes multinucleadas y vacuolación citoplasmática de células de Sertoli, otros como el metilparatión provoca una disminución del peso de la vesícula seminal, el epidídimo y próstata⁷⁹, efectos que no han sido observados en presente estudio.

El tejido testicular y el proceso de espermatogénesis son altamente sensibles a los agentes físicos y químicos⁸⁰, tal como se ha registrado para organofosforados^{81, 82, 83, 84, 85, 48, 86, 87, 88}; y el metamidofos (MET; O,S,dimetilfosforamidotiolo), un pesticida anticolinesterásico altamente tóxico, es uno de los más utilizados en la agricultura y el control de plagas urbanas en países en desarrollo como México⁵, y el Stermin forma parte de una de sus formulaciones comerciales con resultados coincidentes sobre todo por el daño en la espermatogénesis y en cualquier etapa de la proliferación de espermatogonia a espermatozoides maduros.

Los datos epidemiológicos y estudios experimentales han indicado que hay una correlación entre la exposición a OP y alteraciones de cromatina el ADN, el acrosoma, la motilidad de los espermatozoides, morfología de los testículos y los túbulos seminíferos al causar atrofia e inducir la muerte de las células germinales; y en general en los parámetros funcionales del esperma (SFP) así como una disminución de la fertilidad, el presente trabajo apoya lo señalado por Kara⁶⁹.

La presente investigación sobre toxicidad reproductiva inducida por el organofosforado Stermin apoya lo señalado por Mitra y Maitra⁷⁹, que en mamíferos la toxicidad se manifiesta generalmente por alteraciones en el comportamiento y rendimiento sexual, inicio de la pubertad, producción y transporte de gametos, ciclo reproductivo anormal y senescencia reproductiva prematura, infertilidad, pérdida del feto durante el embarazo o modificaciones en otras funciones, que dependen de la integridad de los sistemas reproductivos tanto en hembras como en machos.

Pelegrino⁸⁹ y Farag⁹⁰; al realizar un examen histológico de testículos y epidídimo en ratones bajo tratamiento con metamidophos, observaron testículos que mostraban cambios leves en las células espermatogénicas con áreas focales de túbulos seminíferos irregulares ensanchados y separados; degeneración de las células espermatogénicas, y disminución en el número de espermatozoides a dosis altas. Estos resultados son coincidentes con el nuestro.

El acefato es un pesticida organofosforado que se ha utilizado ampliamente para controlar plagas de insectos en campos agrícolas durante décadas. Sin embargo, su uso ha sido parcialmente restringido en muchos países debido a su producto intermedio tóxico metamidofos⁹¹. En un estudio Nakuleshwar⁹² encontró que el acefato produjo marcadas alteraciones en histología de la cola epididimaria y reducción de la densidad de los espermatozoides. Igualmente, ha sido señalado que el Acefato produce alteraciones histopatológicas⁹³. Esto pone de manifiesto el efecto que produce el ingrediente activo del metamidofos independiente de su formulación comercial (Stermin).

El ensayo de morfología espermática es uno de los parámetros ampliamente utilizados en toxicología de contaminantes y fármacos y sus efectos genotóxicos. Además, el desarrollo de la anomalía de la cabeza del espermatozoide ha sido utilizado como indicador biológico confiable a corto plazo en la evaluación de la genotoxicidad química. La prueba de morfología del espermatozoide del ratón también identifica los efectos de los productos químicos que inducen disfunción espermatogénica y quizás mutaciones hereditarias. Dentro de los testículos, las células de Leydig, Sertoli y germinales son tres células objetivo-principales de los tóxicos para alterar la espermatogénesis^{95, 5, 94}. Nuestro ensayo de morfología espermática determinó cambios en la cabeza, pieza intermedia y cola del espermatozoide.

Normalmente, la morfología del espermatozoide de rata se evalúa examinando preparaciones húmedas de espermatozoides epididimarios fijados usando microscopía de contraste de fases⁵, nosotros hemos evaluado con microscopía de campo claro las formas atípicas de la cabeza, pieza intermedia y cola; y la morfología espermática de la cabeza incluyó las formas de gancho romo, cabeza de plátano, cabeza amorfa, cabeza de alfiler y cabeza doble, con frotis teñidos, secados al aire y fotografiados con un celular. Los especímenes no tratados (control), generalmente presentaron muy pocas anomalías morfológicas (< 2%) tal como lo postulado por Perreault⁹⁶.

Los recuentos de espermatozoides del epidídimo es un método ampliamente utilizado, sencillo y sensible para evaluar los efectos tóxicos reproductivos masculinos en el sitio de acción del epidídimo y/o testicular⁹⁷. Kempinas y Lamano-Carvalho⁹⁸, postularon un método para la estimación de la concentración de espermatozoides en la cola del epidídimo en rata, encontrando un rango de 152.5 a 230 x 10⁷ con un promedio de 187.7 x 10⁷ espermatozoides/ml. En la literatura analizada, el número de recuentos celulares en ratas mostró una enorme variación por ejemplo Maines⁹⁷ señaló que el número de espermatozoides en la cola del epidídimo fue de 299.3 ± 19.7, y el número de espermatozoides en cabeza y cuerpo, 153.9 ± 8.2 x 10⁶; Lucio⁹⁹ en relación a la concentración espermática, cuantificó de 152 a 230 millones de espermatozoides; Choirul¹⁰⁰ 74.72 ± 10.75 x 10⁶ ml; Iranloye¹⁰¹ 51.45 ± 2,2 x 10⁶, Saba¹⁰² 83,25 ± 2.32.

La exposición a Stermin, provocó cambios significativos en la histología testicular y cinética espermatogénica, tal como ha sido mencionado para varios autores^{65, 103, 5, 79, 82, 3}, para organofosforados, demostrando que los roedores son sensibles a la acción de estas sustancias. Con base en estos datos los autores concluyen que el metamidofos podría ser perjudicial para la sexualidad y fertilidad de los organismos que están constantemente expuestos a plaguicidas.

Respecto a motilidad y vitalidad espermática, estas han sido reportadas con gran variación en diferentes estudios por ejemplo Lucio⁹⁹ reportó 23% de motilidad; Nour¹⁰⁴ reportó una disminución significativa de la motilidad de los espermatozoides a concentraciones más alta de los pesticidas probados; Iranloye¹⁰¹ reportó una motilidad (%) de $84 \pm 7,7$; Saba¹⁰² reportó una motilidad (%) 80 ± 4.8 ; Adamkovicova¹⁰⁵ reportó una motilidad (%) de 50.31 ± 9.15 y dentro de ésta los progresivos (%) representaron el 27.69 ± 7.34 . La reducción de la motilidad y del número de espermatozoides de la cola del epidídimo, de especímenes expuestos a metamidofos, dependiente de la dosis ha sido reportada por Peiris⁷⁷, Urióstegui⁵, datos que son coincidente con los hallazgos hechos por nosotros.

La morfología anormal de los espermatozoides ha sido reportada variable, y dependiente del tipo de plaguicida, dosis y tiempo de administración, Adamkovicova¹⁰⁵ reportó una morfología normal de 97.44 ± 0.94 y dentro de esta, las anomalías de la cabeza 1.74 ± 0.69 y de la cola 0.82 ± 0.39 . Espinoza-Navarro⁴⁸ encontró un aumento significativo del nivel de teratospermia en las ratas tratadas con Malatión de (42,1%), con niveles elevados de cabezas de esperma anormales (26,4%) ($p < 0,05$). Nuestros hallazgos difieren con lo señalado por los autores mencionados.

CONCLUSIONES

1. Las concentraciones tóxicas del organofosforado Stermin 600 SL han sido observadas a partir de la dosis de 1.25 mg/kg, sin embargo, se aprecia una toxicidad mayor a dosis más elevadas, específicamente a partir de 2.5 mg/kg.
2. El uso indiscriminado y excesivo de organofosforados, puede tener graves efectos en el sistema reproductivo al actuar sobre la naturaleza anatómica de los testículos y las células reproductivas, por lo tanto, en el presente estudio se ha logrado identificar el efecto tóxico que genera Stermin 600 SL en las células espermáticas de la rata.
3. En el presente estudio se ha logrado identificar la morfología normal y anormal de los espermatozoides de la rata relacionadas con las concentraciones del Stermin 600 SL, observándose que a mayor concentración del producto (5 mg/kg) existe más cambios en la morfología de las células espermáticas.
4. En cuanto a los parámetros seminales, el conteo de espermatozoides (ESC) en los ejemplares sometidos a tratamientos en dosis altas mostraron ESC inferior con relación al grupo control; mientras que para el porcentaje de necrospermia, este fue mayor a dosis altas.
5. En el presente estudio se determinó el índice de teratozoospermia, que es una alteración espermática caracterizada por problemas en la morfología de los espermatozoides. Se determinó que las muestras con dosis más altas contenían un porcentaje elevado de espermatozoides amorfos, lo que demuestra la toxicidad del organofosforado Stermin 600 SL.

RECOMENDACIONES

1. Existe necesidad atribuida a los organismos regulatorios del uso de pesticidas, para que establezcan medidas o controles regulatorios severos que reduzcan el impacto de estas sustancias sobre especies no objetivo, a fin de mitigar los efectos en la biodiversidad y la protección de la salud reproductiva.
2. Frente a los resultados obtenidos en este trabajo, podemos recomendar la realización de ensayos complementarios con el plaguicida en estudio, en células animales cultivadas in vitro, que detecten diferentes tipos de daños en el ADN contribuyendo de modo eficaz a una mejor evaluación de los efectos genotóxicos y mutagénicos de herbicidas utilizados en la Agricultura Regional.
3. Continuar los estudios sobre toxicidad y genotoxicidad de plaguicidas, ampliando parámetros cualitativos y semicualitativos de la histología testicular, tanto como de las células espermatozógenas, y así poder comprender la cinética reproductiva y los posibles efectos sobre la fertilidad.
4. Sugerir a las autoridades de la Facultad la adquisición de un equipo automatizado CASA (Computer Assisted Semen Analysis), para la evaluación de parámetros seminales en animales de experimentación y en el hombre, que sirva para fines de investigación en andrología animal y humana y ofrezca servicios de asistencia diagnóstica reproductiva en el hombre.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pohanish R, in Sittig's Handbook of Pesticides and Agricultural Chemicals. (Second Edition), 2015. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/methamidophos>
2. Ziqiu L, Shimei P, Wenping Z, Sandhya M, Pankaj B and Shaohua C. Degradation of Acephate and Its Intermediate Methamidophos: Mechanisms and Biochemical Pathways. *Frontiers in Microbiology*, Vol 11, August 2020. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.02045/full>
3. Joshi S, Mathur R and Gulati N. Testicular toxicity of chlorpyrifos (an organophosphate pesticide) in albino rat. *Toxicology and Industrial Health*. 23:439-444, 2007. <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0748233707080908>
4. Gaines T. The Acute Toxicity of Pesticides to Rats. *TOXICOLOGY AND APPLIED PHARMACOLOGY* 2. 88-99 (1960).
5. Urióstegui-Acosta M, Hernández-Ochoa I, Sánchez-Gutiérrez M, Piña-Guzmán B, Rafael-Vázquez L, Solís-Heredia MJ., *et al.* Methamidophos alters sperm function and DNA at different stages of spermatogenesis in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 279(3):391-400, 2014. Disponible en: https://www.uaeh.edu.mx/investigacion/productos/6884/mayruth_2014.pdf
6. Yamano T. and Morita S. Effects of Pesticides on Isolated Rat Hepatocytes, Mitochondria, and Microsomes II. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 28, 1–7 (1995). <https://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00213961>
7. Mansour S, Heikal T, Mossa A and Refaie A. TOXIC EFFECTS OF FIVE INSECTICIDES AND THEIR MIXTURE ON MALE ALBINO RATS. *Journal Egypt Society Toxicology*. (Vol. 39: 85-94 July. 2008). Disponible en: https://applications.emro.who.int/imemrf/J_Egypt_Soc_Toxicol_2008_38_85_94.pdf
8. Zendzian R. Dermal Absorption of Pesticides in the Rat. *AIHAJ - American Industrial Hygiene Association Journal*, Volume 61: 473-483, 2000. Disponible en: www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15298660008984558?journalCode=uaah20
9. Darwiche W, Gay-Quéheillard J, Delanaud S, El Khayat El Sabbouri H, Khachfe H, Jourmaa W, *et al.* Impact of chronic exposure to the pesticide chlorpyrifos on respiratory parameters and sleep apnea in juvenile and adult rats. *PLOS ONE* 13(1): e0191237. 2018. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0191237>
10. Hazzaa N. Toxicity of Methamidophos in Rats. *Isotope and Radiation Research*, 34(1): 143-149. 2002. https://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:34052228
11. Scherholz V and Chiorato S. Effects of separate and combined exposure to the pesticides methamidophos and chlorothalonil on the development of suckling rats. *International*

- Journal of Hygiene and Environmental Health. 210: 169–176. 2007.
<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/15998/1/2007AP029.pdf>
12. do Nascimento C, Maretto G, Moreira G, Passamani L, Abdala A, Schenberg L., et al. Methamidophos, an Organophosphorus Insecticide, Induces Pro-aggressive Behaviour in Mice. *Neurotoxicity Research*, 32(3), 398–408. 2017.
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12640-017-9750-9>
 13. Sharma R. and Goyal A. AGRO-PESTICIDES AND ANDROLOGY. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol 6, Issue 10. 2014.
<https://innovareacademics.in/journals/index.php/ijpps/article/view/2315/9379>
 14. Gilden R, Huffling K, and Sattler B. Pesticides and Health Risks. IN *FOCUS* Vol 39: 103-110, 2010. [https://www.jognn.org/article/S0884-2175\(15\)30255-0/fulltext](https://www.jognn.org/article/S0884-2175(15)30255-0/fulltext)
 15. Kumar S. Effect of Pesticides Exposure on Human Health and Reproductive Life. *Journal of Complementary Medicine and Alternative Healthcare*. 10(2): 1-4. 2019.
<https://juniperpublishers.com/jcmah/pdf/JCMAH.MS.ID.555782.pdf>
 16. Sutton P, Perron J, Giudice L and Woodruff T. PESTICIDES MATTER. A PRIMER FOR REPRODUCTIVE HEALTH PHYSICIANS. University of California, San Francisco. Program on Reproductive Health and the Environment. 2011.
https://www.ucsf.edu/sites/default/files/legacy_files/pesticidesmatter_whitepaper.pdf
 17. Colborn T & Carroll L. Pesticides, Sexual Development, Reproduction, and Fertility: Current Perspective and Future Direction. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*. 13(5): 1078-1110. 2007.
<https://www.tandfonline.com/action/showCitFormats?doi=10.1080%2F10807030701506405>
 18. Mitra A. and Kumar S. Reproductive Toxicity of Organophosphate Pesticides. *Annals of Clinical Toxicology*. Vol 1(1): 1004. 2018. <http://www.remedypublications.com/open-access/reproductive-toxicity-of-organophosphate-pesticides-1072.pdf>
 19. Mushtaq F, Khan A and Ramzan R. IMPACT OF PESTICIDES ON REPRODUCTIVE BEHAVIOUR OF VERTEBRATES: A REVIEW. *International Journal of Creative Research Thoughts (IJCRT)*. IJCRT Volume 9, Issue 3 March 2021.
<https://www.ijcrt.org/papers/IJCRT2103693.pdf>
 20. Svingen T, Christiansen S, Taxvig C and Vinggaard A. Pesticides. *Encyclopedia of Reproduction*. Second Edition. Vol 1: 624–628. 2018.
 21. Frazier L. Reproductive Disorders Associated with Pesticide Exposure. *Journal of Agromedicine*. 12(1):27-37. 2007.
 22. Bretveld R, Thomas C, Scheepers P, Zielhuis G and Roeleveld N. Pesticide exposure: the hormonal function of the female reproductive system disrupted?. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 4:30, 2006. <https://rbej.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1477-7827-4-30.pdf>

23. Kaltenecker E. and Waissmann W. Occupational exposure and effects on the male reproductive system. Escola Nacional de Saúde Pública. Rio de Janeiro. 22(3):485-493. 2006. <https://www.scielo.br/j/csp/a/4Sc8tJ5RvT4W4pxP7FTfcpP/?format=pdf&lang=en>
24. Mehrpour O, Karrari P, Zamani N, Tsatsakis A and Abdollahi M. Occupational exposure to pesticides and consequences on male semen and fertility: A review. Toxicology Letters. Volume 230(2):146-156. 2014. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S037842741400040X>
25. Roy P, Kumar P, Changmai D and Boruah S. Pesticides, insecticides and male infertility. International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology. 6(8):3387-3391. 2017. <file:///C:/Users/HP/Desktop/2490-12105-1-PB.pdf>
26. Bretveld R, Brouwers M, Ebisch I and Roeleveld N. Influence of pesticides on male fertility. Scandinavian Journal of Work, Environment & Health. Vol. 33(1):13-28. 2007. <https://www.jstor.org/stable/40967617>
27. Srinivasa J, Maxim P, Urban J and D'Souza A. Effects of Pesticides on Male Reproductive Functions. IJMS. Vol 30, N° 4, December 2005. https://ijms.sums.ac.ir/article_40088_37c8e8afcf8a45e02114166a1fef2a10.pdf
28. Karanth S. Encyclopedia of Toxicology. Third Edition. England. Elsevier, 2014. Acephate; 20-21.
29. Suryanarayanan A. Encyclopedia of Toxicology. Third Edition. England. Elsevier, 2014. Acetylcholine; 49-50.
30. Green Facts. Facts on Health and the Environment. Chromosome abnormalities. <https://www.greenfacts.org/glossary/abc/chromosome-abnormalities.htm>
31. Understanding Genetics: A New York, Mid-Atlantic Guide for Patients and Health Professionals. APPENDIX F CHROMOSOMAL ABNORMALITIES. Genetic Alliance. 2008. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK115545/>
32. Richbart S, Merritt J, Nolan N. and Dasgupta P. Acetylcholinesterase and human cancers. Chapter One. In Advances in Cancer Research. Elsevier. Volume 152, 2021, Pages 1-66. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0065230X21000440>
33. Lionetto M, Caricato R, Calisi A, Giordano M. and Schettino T. Acetylcholinesterase as a Biomarker in Environmental and Occupational Medicine: New Insights and Future Perspectives. BioMed Research International. 2013. Article ID 321213. <https://downloads.hindawi.com/journals/bmri/2013/321213.pdf>
34. Michalak I and Chojnacka K. Encyclopedia of Toxicology. Third Edition. England. Elsevier, 2014. Biocides; 461-463.
35. Chen B, Zirkin B and Ge R. The Leydig Cells as a Target for Toxicants. Comprehensive Toxicology (Second Edition). Elsevier. Vol 11, Pages 131-148. 2010. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846011088>

36. Wylie C and Anderson R. Germ Cells. Mouse Development. Patterning, Morphogenesis, and Organogenesis. Elsevier. Pages 181-190. 2007. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780125979511500123>
37. Richardson R and Makhaeva. Encyclopedia of Toxicology. Third Edition. England. Elsevier, 2014. Organophosphorus Compounds; 714-719.
38. Gad S. Encyclopedia of Toxicology. Third Edition. England. Elsevier, 2014. LD₅₀/LC₅₀ (Lethal Dosage 50/Lethal Concentration 50); 58-60.
39. Baer K and Marcel B. Encyclopedia of Toxicology. Third Edition. England. Elsevier, 2014. Methamidophos; 232-234.
40. Gad S. Encyclopedia of Toxicology. Third Edition. England. Elsevier, 2014. Animal Models; 243-245.
41. Chemes H and Rawe V. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. Human Reproduction Update, Volume 9, N° 5 pp. 405-428, 2003. https://redlara.com/images/arg/loe26_patologia.pdf
42. Haidl G and Schuppe H. Cytomorphological Semen Analysis. 2006. <http://eknygos.lsmuni.lt/springer/28/Part%20II/11%20Item.pdf>
43. FAO. Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas (Versión Revisada). Roma. 2003. <https://www.fao.org/3/y4544s/y4544s00.htm>
44. TECNOLOGÍA QUÍMICA Y COMERCIO S.A. TQC. FICHA TÉCNICA DE STERMIN 600 SL. 2020. <https://www.tqc.com.pe/wp-content/uploads/2020/08/FICHA-TECNICA-DE-STERMIN-TQC-1.pdf>
45. Bilbao A, Goosman C, Carti G, Barranquero M, Dolz M, Reus R, et al. Microinyección espermática: ¿En qué consiste la ICSI y cuál es su precio? Reproducción Asistida ORG. 2020. <https://www.reproduccionasistida.org/microinyeccion-intracitoplasmica-de-espermatozoides-icsi/teratozoospermia-kruger-oms/>
46. Chan P, Kruger C and Hayes W. Encyclopedia of Toxicology. Third Edition. England. Elsevier, 2014. Toxicity, Acute; 617-625.
47. NATIONAL REGISTRATION SCHEME FOR AGRICULTURAL AND VETERINARY CHEMICALS AUSTRALIA. The APVMA Review of Methamidophos. Office of Chemical Safety. Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority. <https://apvma.gov.au/sites/default/files/publication/14426-methamidophos-human-health-risk-assessment.pdf>
48. Espinoza-Navarro O, Ponce-LaRosa C. y Bustos-Obregón E. Organophosphorous Pesticides: Their Effects on Biosentinel Species and Humans. Control and Application in Chile. Int. J. of Morphol. Vol. 35(3):1069-1074, 2017. doi.org/10.4067/S0717-

95022017000300041. https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022017000300041&lng=es&nrm=iso.
49. John O. Ige, Michael A. Gbadegesin, Jeremiah O. Olugbami, Ayodeji M. Adegoke, Oyeronke A. Odunola, Gloria O. Anetor y John I. Anetor. Un estrés oxidativo inducido por insecticida común en ratas Wistar: importancia para Humanos e implicaciones para la modulación nutricional de la toxicidad de los insecticidas, 2021. Revista del Colegio Americano de Nutrición, 40:7, 608-616, DOI:10.1080/07315724.2020.1812452.
50. Burruel V, Raabe O, Overstreet J, Wilson B and Wiley L. Paternal Effects from Methamidophos Administration in Mice. Toxicology and Applied Pharmacology 165(2):148-157. 2000.
51. Bustos E, Valenzuela M and Rojas M. Agropesticidas and testicular damage. In Male Reproduction. A multidisciplinary Overview. Edited by Martínez-García F y Regadera J. School of Medicine. Autonomus University of Madrid, Spain. 1998.
52. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: Edition. Copyright © 2020 by the American Veterinary Medical Association. 2020. <https://www.avma.org/sites/default/files/2020-02/Guidelines-on-Euthanasia-2020.pdf>
53. Divya S, Madhuri D, Lakshman M, Reddy AG. Epididymal semen analysis in testicular toxicity of doxorubicin in male albino Wistar rats and its amelioration with quercetin; 2018.
54. Mousa A., Elweza A., Elbaz H., El-aziz Tahoun E., Shoghy K., E., Elsayed Hassan E. Eucalyptus Globulus protects against diclofenac sodium induced hepatorenal and testicular toxicity in male rats, Journal of Traditional and Complementary Medicine, <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2019.11.002>
55. WHO, laboratory manual for the examination and processing of human semen. Sixth Edition. World Health Organization. 276 pages, 2021. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240030787>
56. Hussien NA, Hamdi H. Genotoxic and hypogonadism effect of triclosan treatment and the mitigating effect of vitamin e in male albino mice. J Basic Clin Pha. 2017;8(4):200–204.
57. Lów P. Molnár K., Kriskaet G. Atlas of Animal Anatomy and Histology, Chapter 12. Dissection of the Rat (*Rattus norvegicus*). Springer International Publishing Switzerland 2016. DOI 10.1007/978-3-319-25172-1_1
58. Tobón F., López I. Genotoxicity of water contaminated by plaguicidas in an area of Antioquia. Rev. MVZ Córdoba 16(2):2605-2615, 2011. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3764945.pdf>
59. Vindas R., Ortiz F., Ramírez V., Cuenca P. Genotoxicity of three pesticides used in Costa Rican banana plantations. Rev. biol. trop vol.52 n.3 San José Sep. 2004. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442004000300022

60. Martínez-Valenzuela C., Gómez-Arroyo S. RIESGO GENOTÓXICO POR EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS EN TRABAJADORES AGRÍCOLAS. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 23 (4) 185-200, 2007. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v23n4/v23n4a4.pdf>
61. Valencia-Quintana R., Sánchez-Alarcón J., Gómez-Arroyo S., Cortés-Eslava J., Waliszewski E., Fernández S., y Villalobos-Pietrini R. GENOTOXICIDAD DE PLAGUICIDAS EN SISTEMAS VEGETALES. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 29 (Número especial sobre plaguicidas) 133-157. Septiembre 2013. <https://www.revistascca.unam.mx/rica/index.php/rica/article/viewFile/41611/38395>
62. Sánchez-Alarcón J, Milić M, Kašuba V, Tenorio-Arvide MG, Montiel-González JMR, Bonassi S, Valencia-Quintana R. A Systematic Review of Studies on Genotoxicity and Related Biomarkers in Populations Exposed to Pesticides in Mexico. *Toxics.* 2021 oct 21;9(11):272. doi: 10.3390/toxics9110272. PMID: 34822663; PMCID: PMC8624200.
63. Ruiz-Suarez L.E., Castro-Chan R.A., Rivero-Perez N.E., Trejo-Acevedo A., Guillen-Navarro G.K., Geissen V., Bello-Mendoza R. Levels of organochlorine pesticides in blood plasma from residents of malaria-endemic communities in Chiapas, Mexico. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2014; 11:10444–10460. doi: 10.3390/ijerph111010444
64. Rao P. Reproductive Health Effects of Pesticide Exposure. *Issues for Farmworker Health Service Providers. Farmworker Justice* 2008. https://www.migrantclinician.org/files/reproductive_eng_span_final.pdf
65. Moreira S, Pereira SC, Seco-Rovira V, Oliveira PF, Alves MG, Pereira ML. Pesticides and Male Fertility: A Dangerous Crosstalk. *Metabolites.* 2021 nov 25;11(12):799. doi: 10.3390/metabo11120799.
66. Dai P, Hu P, Tang J, Li Y, Li C. Effect of glyphosate on reproductive organs in male rat. *Acta Histochem.* 2016 jun;118(5):519-26. doi: 10.1016/j.acthis.2016.05.009. Epub 2016 Jun 7.
67. Sharma P, Huq AU, Singh R. Cypermethrin-induced reproductive toxicity in the rat is prevented by resveratrol. *J Hum Reprod Sci.* 2014 Apr;7(2):99-106. doi: 10.4103/0974-1208.138867. PMID: 25191022; PMCID: PMC4150150.
68. Chitolina R, Nicola P, Sacht A, Bevilaqua F, Cunico L, Reginatto A, Bertoncetto K, Marins K, Zanatta AP, Medeiros M, Lima AS, Parisotto C, Menegatt JCO, Goetten AF, Zimmermann FC, Ramos AT, Portela VM, Barreta MH, Conterato GMM, Zanatta L. Subacute exposure to Roundup® changes steroidogenesis and gene expression of the glutathione-glutaredoxin system in rat ovaries: Implications for ovarian toxicity of this glyphosate-based herbicide. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2023 Aug 15; 473:116599. doi: 10.1016/j.taap.2023.116599. Epub 2023 Jun 14.
69. Kara, M., & Öztaş, E. (2021). Reproductive Toxicity of Insecticides. *IntechOpen.* doi: 10.5772/intechopen.92890. <https://www.intechopen.com/chapters/72504>

70. Ravula AR, Yenugu S. Effect of oral administration of a mixture of pyrethroids at doses relevant to human exposure on the general and male reproductive physiology in the rat. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2021 Jan 15; 208:111714. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.111714. Epub 2020 Dec 1. PMID: 33396045.
71. Xuelian Zhang, Wenbo Cui, Ke Wang, Rui Chen, Mingyue Chen, Kangshu Lan, Yanpei Wei, Chuanying Pan, Xianyong Lan, Chlorpyrifos inhibits sperm maturation and induces a decrease in mouse male fertility, *Environmental Research*, Volume 188, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109785>. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013935120306800>
72. Rim KT. Reproductive Toxic Chemicals at Work and Efforts to Protect Workers' Health: A Literature Review. *Saf Health Work.* 2017 Jun;8(2):143-150. doi: 10.1016/j.shaw.2017.04.003. Epub 2017 Apr 12. PMID: 28593069; PMCID: PMC5447413.
73. Hock W. Pesticide Safety Fact Sheet. Toxicity of Pesticides. College of Agricultural Sciences. Agricultural Research and Cooperative Extension. Pesticide Education. The Pennsylvania State University, 2006. <https://extension.psu.edu/toxicity-of-pesticides>.
74. Worthing C. The pesticide manual. British Crop Protection. Council Publications. 1983, London.
75. NATIONAL REGISTRATION SCHEME FOR AGRICULTURAL AND VETERINARY CHEMICALS AUSTRALIA. The APVMA Review of Methamidophos. Office of Chemical Safety of the Department of Health and Ageing Canberra. <https://www.apvma.gov.au/sites/default/files/publication/14426-methamidophos-human-health-risk-assessment.pdf>. recuperado el 6/02/2024
76. Gammon D., METHAMIDOPHOS (MONITOR7). VOLUME I. RISK CHARACTERIZATION DOCUMENT, California Environmental Protection Agency, 2005. <https://www.cdpr.ca.gov/docs/risk/rcd/methamidophos.pdf>
77. Peiris L., Jayatunga Y., Ratnasooriya W. ANTIREPRODUCTIVE EFFECTS IN MALE RATS EXPOSED TO METHAMIDOPHOS. *Cey. J. Sci. (Bio. Sci.)* Vol.24, No.2, 1995. <http://dr.lib.sjp.ac.lk/bitstream/handle/123456789/3497/ANTIREPRODUCTIVE%20EFFECT%20IN%20MALE%20RATS%20EXPOSED%20TO%20METHAMIDOPHOS.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
78. National Advisory Committee for Acute Exposure Guideline Levels for Hazardous Substances (NAC/AEGL) ACUTE EXPOSURE GUIDELINE LEVELS (AEGLs) FOR METHAMIDOPHOS PROPOSED. NAC Proposed 1: September 2009. https://www.epa.gov/sites/default/files/2014.11/documents/methamidophos_proposed_sep_2009.v1.pdf
79. Mitra A., Maitra S. Reproductive Toxicity of Organophosphate Pesticides. *Annals of Clinical Toxicology*, Remedy Publications LLC. 2018 | Volume 1 | Issue 1 | Article 1004.

80. Karimi A. Histological and histochemical effects of Gly-phosate on testicular tissue and function. *Iran J Reprod Med* Vol. 10. No. 3. pp: 181-192, May 2012. https://www.academia.edu/109792950/Histological_and_histochemical_effects_of_Gly_phosate_on_testicular_tissue_and_function
81. Yamanaka S, Ohta K, Tomita Y, Takayanagi A, Nomura T, Takaesu Y. Effects on acute organophosphorus poisoning in rats in aging and solubility of organophosphates. *Environ Health Prev Med*. 1996 oct;1(3):119-27. doi: 10.1007/BF02931202. PMID: 21432434.
82. Prashanthi N, Narayana K, Nayanatara A, Chandra Kumar HH, Bairy KL, D'Souza UJ. The reproductive toxicity of the organophosphate pesticide 0, 0-dimethyl 0-4-nitrophenyl phosphorothioate (methyl parathion) in the male rat. *Folia Morphol (Warsz)*. 2006 nov;65(4):309-21. PMID: 17171610.
83. Brinkworth M.H. and Handelsman D.J. Environmental Influences on Male Reproductive Health, in *Andrology Male Reproductive Health and Dysfunction* 3rd edition. Nieschlag E., M. Behre H., Nieschlag S. (Editors). Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010. 648 pp.
84. Abdel-Tawab H. Mossa, Amel A. Refaie and Amal Ramadan, 2011. Effect of Exposure to Mixture of Four Organophosphate Insecticides at No Observed Adverse Effect Level Dose on Rat Liver: The Protective Role of Vitamin C. *Research Journal of Environmental Toxicology*, 5: 323-335.
85. Elham R, Ebrahim T. K, Leila K, Farzad P, Nazanin S. J, Mohammad P, Hossein K. J. The Effect of Herbicide Paraquat and Organophosphate Pesticide Malathion on Changes of Sex Hormones in Female Rats. *Biomed Pharmacol J* 2015;8(2)
86. Voorhees, J.R., Remy, M.T., Erickson, C.M. et al. Occupational-like organophosphate exposure disrupts microglia and accelerates deficits in a rat model of Alzheimer's disease. *npj Aging Mech Dis* 5, 3 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41514-018-0033-3>
87. Orhan Baş, Soner Çankaya, Özgür Enginyurt, Ali Aslan, Hüseyin Avni Uydu, Ersan Odacı, Ali Yılmaz, Adem Demir, Tuba Gul, The effect of acute organophosphate intoxication on female rat hippocampus cornu ammonis region pyramidal neuron numbers, biochemistry and morphology, *Journal of Chemical Neuroanatomy*, Volume 100, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2019.101652>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089106181830156X>)
88. Tigges J, Worek F, Thiermann H, Wille T. Organophosphorus pesticides exhibit compound specific effects in rat precision-cut lung slices (PCLS): mechanisms involved in airway response, cytotoxicity, inflammatory activation and antioxidative defense. *Arch Toxicol*. 2022 Jan;96(1):321-334. doi: 10.1007/s00204-021-03186-x. Epub 2021 Nov 15. PMID: 34778934; PMCID: PMC8748323.

89. Pelegrino JR, Calore EE, Saldiva PN, Almeida VF, Peres NM, Vilela-de-Almeida L (2006) Morphometric studies of specific brain regions of rats chronically intoxicated with the organophosphate methamidophos. *Ecotoxicol Environ Saf* 64:251–255.
90. Farag, A. T; Radwan A. H; Eweidah M. H; ElMazoudy R. H; Abd El-Khaliek El-Sebae (2012). Evaluation of male-mediated reproductive toxic effects of methamidophos in the mouse., 44(2), 116–124. doi:10.1111/j.1439-0272.2010.01113.x.
91. Lin Z, Pang S, Zhang W, Mishra S, Bhatt P, Chen S. Degradation of Acephate and Its Intermediate Methamidophos: Mechanisms and Biochemical Pathways. *Front Microbiol.* 2020 Aug 18; 11:2045. doi: 10.3389/fmicb.2020.02045. PMID: 33013750; PMCID: PMC7461891.
92. Nakuleshwar Dut Jasuja, Preeti Sharma and Suresh C. Joshi. A comprehensive effect of acephate on cauda epididymis and accessory sex organs of male rats. In *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. June 2013. DOI: 10.5897/AJPP2013.0039.
93. Mufti A, Jalouli M, Nahdi S, Tlili N, Alqahtani W, Mansour L, Alwasel S, Harrath AH. Maternal Exposure to Acephate Caused Nephrotoxicity in Adult Offspring Rats Mediated by Excessive Autophagy Activation, Oxidative Stress Induction, and Altered Epithelial Sodium Channel and Na⁺/K⁺-ATPase Gene Expression. *Biology (Basel)*. 2023 Jan 20;12(2):162. doi: 10.3390/biology12020162. PMID: 36829441; PMCID: PMC9952565.
94. Cardoso E, Mathias MDL, Monarca RI, Gabriel SI. Assessing Optimal Cell Counts in Sperm Shape Abnormality Assays in Rodents. *Animals (Basel)*. 2023 oct 26;13(21):3324. doi: 10.3390/ani13213324. PMID: 37958079; PMCID: PMC10649842.
95. Rasgele P. Abnormal sperm morphology in mouse germ cells after short-term exposures to acetamiprid, propineb, and their mixture. *SPERM MORPHOLOGY FOLLOWING Acm AND Pro EXPOSURE*. *Arh Hig Rada Toksikol* 2014; 65:47-56.
96. Perreault SD, Cancel AM. Significance of incorporating measures of sperm production and function into rat toxicology studies. *Reproduction*. 2001 feb;121(2):207-16. doi: 10.1530/rep.0.1210207. PMID: 11226045.
97. Maines, Mahin D.; Costa, Lucio G.; Hodgson, Ernest; Reed, Donald J.; Sipes, I. Glenn (2001). *Current Protocols in Toxicology*. Epididymal Sperm Count., 10.1002/0471140856. doi:10.1002/0471140856.tx1606s14
98. Kempinas W and Lamano-Carvalho T. A method for estimating the concentration of spermatozoa in the rat cauda epididymidis. *Laboratory Animals* (1988) 22, 154-156.
99. Lucio R., Tlachi J., López A., Zempoalteca R., Velázquez-Moctezuma J. Analysis of the parameters of the ejaculate in the laboratory Wistar rat: technical description. *Vet. Méx.* 2009, vol.40, n.4, pp.405-415. <https://www.mediagraphic.com/cgi-bin/new/resumenl.cgi?IDARTICULO=24004>

100. Choirul Anam, Agung Pramana Warih Marhendra², Sri Rahayu². Alcohol Intake Investigation of Adult Rats Based on Sperm Parameters. *J.Exp. Life Sci.* Vol. 9 No. 2, 2019. <https://jels.ub.ac.id/index.php/jels/article/view/344/310>
101. Iranloye BO, Oludare GO, Morakinyo AO, Esume NA, Ekeh LC. Reproductive parameters and oxidative stress status of male rats fed with low and high salt diet. *J Hum Reprod Sci.* 2013 oct;6(4):267-72. doi: 10.4103/0974-1208.126308. PMID: 24672168; PMCID: PMC3963312.
102. Saba A., Oridupa O., Oyeyemi M., Osanyigbe O. Spermatozoa morphology and characteristics of male wistar rats administered with ethanolic extract of *Lagenaria Breviflora* Roberts. *African Journal of Biotechnology* Vol. 8 (7), pp. 1170-1175, 6 April, 2009 Available online at <http://www.academicjournals.org/AJB>
103. Pung T, Klein B, Blodgett D, Jortner B, Ehrich M. Examination of Concurrent Exposure to Repeated Stress and Chlorpyrifos on Cholinergic, Glutamatergic, and Monoamine Neurotransmitter Systems in Rat Forebrain Regions. *International Journal of Toxicology.* 2006;25(1):65-80. doi:10.1080/10915810500527119
104. Nour El-Hoda A. Zidan, 2009. Evaluation of the Reproductive Toxicity of Chlorpyrifos Methyl, Diazinon and Profenofos Pesticides in Male Rats. *International Journal of Pharmacology*, 5: 51-57. DOI: 10.3923/ijp.2009.51.57. URL: <https://scialert.net/abstract/?doi=ijp.2009.51.57>
105. Adamkovicova M., Toman R, Martiniakova M., Omelka R., Babosova R., Krajcovicova V., Grosskopf B., and Massanyi P. Sperm motility and morphology changes in rats exposed to cadmium and diazinon. Adamkovicova et al. *Reproductive Biology and Endocrinology* (2016) 14:42. DOI 10.1186/s12958-016-0177-6. <https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12958-016-0177-6>

ANEXOS

Anexo 01: Extirpación quirúrgica de los órganos reproductores de los animales de estudio.



Anexo 02: Microfotografías de anomalías de la cabeza del espermatozoide de rata.

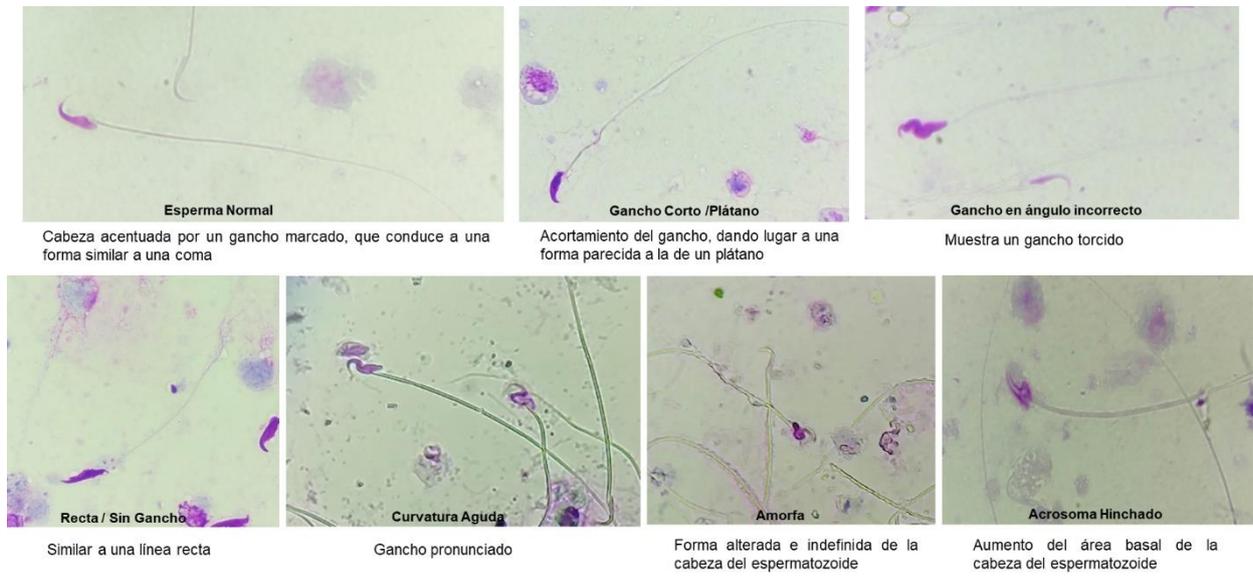


Fig. Microfotografías de anomalías de la cabeza del espermatozoide de rata, tinción con Giemsa, 400X.

Anexo 03: Microfotografías de anomalías de la cola del espermatozoide.

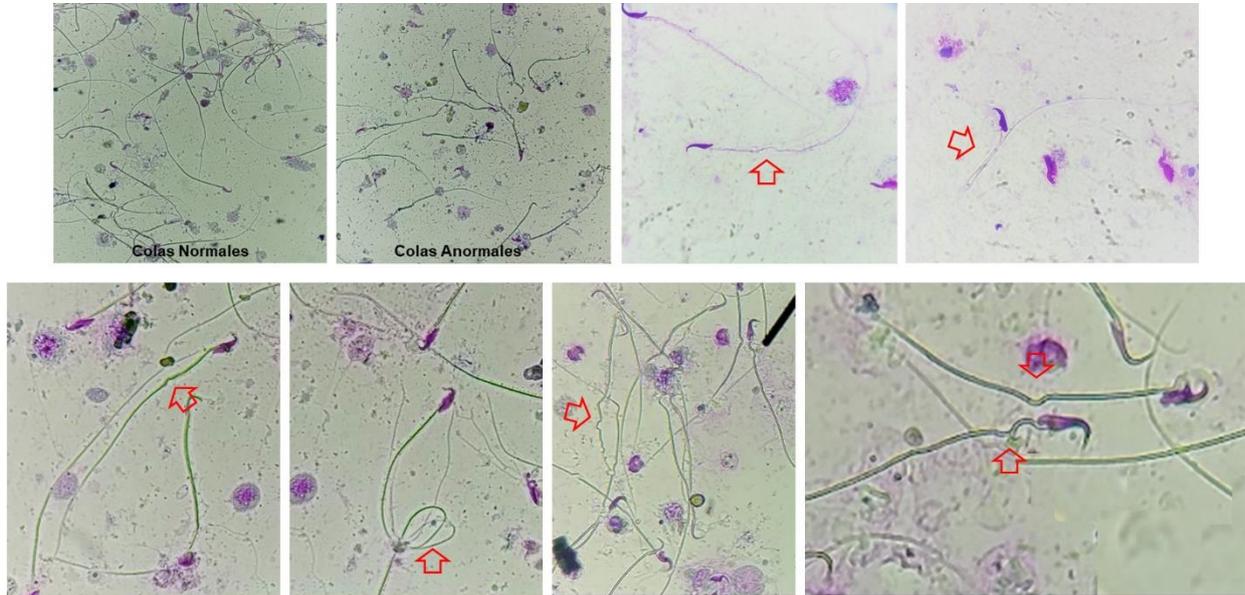


Fig. Microfotografías de anomalías de la cola del espermatozoide de rata, las flechas indican la alteración, tinción con Giemsa, 400X.

Anexo 04: Preparación de la Dosis Letal 50 de Stermin 600 SL.

El STERMIN 600 SL, es un insecticida Organofosforado, translúcido, incoloro, pungente, concentrado soluble, con una composición química de O, S – dimethyl phosphoroamidothioate (Methamidophos) 600 g/L, Dietilenglicol y humectantes 570 g/L, altamente tóxico, con dosis de toxicidad de DL₅₀ oral aguda: 20 mg/kg y DL₅₀ dermal aguda: 410 mg/kg. Inhibe la acción de acetilcolinesterasa (Ach) la enzima responsable de la destrucción y terminación de la actividad biológica del neurotransmisor acetilcolina (AC). Con la acumulación de la AC, se altera el funcionamiento normal del impulso nervioso. Se utiliza en el control de *Myzus persicae* “Pulgón”, *Liriomyza huidobrensis* “Mosca minadora”, *Premnotrypes suturicallus* “Gorgojo de los andes”, *Prodiplosis longifila* “Mosquilla del ovario”, *Spodoptera frugiperda* “Cogollero”. Se expende en el comercio con otros nombres como: LASSER 600, MATADOR 600 SL, MISIL 600 SL, MONOFOS, THODORON 600, METAMIDOFOS.⁴⁴

PREPARACIÓN DE LA LD₅₀

1 litro de STERMIN 600 SL contiene 600 gramos de ingrediente activo/L (ia)

1 litro de Stermin, contiene 600 gramos de ingrediente activo (ia)

Para Convertir 600 g (ia) a miligramos (mg)

Multiplicar 600 gr (ia) x 1,000 mg = 600,000 mg = 6×10^5 mg.

Para calcular el volumen, hacer una regla de tres simple:

$$\begin{array}{rcl} \text{Si en 1,000 ml. de Stermin} & \text{-----} & 600,000 \text{ mg de (ia)} \\ X & \text{-----} & 200 \text{ mg} \end{array}$$

$$X = \frac{1,000 \text{ ml} \times 200 \text{ mg}}{600,000 \text{ mg}}$$

$$X = 0.3333333 = 0.330 \text{ ml}$$

Convertir los ml a μ l:

$$0.330 \times \frac{1,000 \mu\text{l}}{1 \text{ ml}} = 333.3 \mu\text{l}$$

Con este valor se procede a 1 litro de la solución LD₅₀ (200 mg/lit)

De aquí hacer diluciones decrecientes a 25, 50, 75% LD₅₀ de STERMIN para administrar 10ml por kilo de peso de los animales de experimentación.

83.325 μ l de la solución LD ₅₀ (200 mg/lit)	(25% de LD ₅₀)
166.65 μ l de la solución LD ₅₀ (200 mg/lit)	(50% de LD ₅₀)
249,98 μ l de la solución LD ₅₀ (200 mg/lit)	(75% de LD ₅₀)
333.3 μ l de la solución LD ₅₀ (200 mg/lit)	(100% de LD ₅₀)