



Título del artículo.

**Alteraciones sobre la calidad espermática y daño genético de los espermatozoides humanos por exposición *in vitro* a glufosinato de amonio grado técnico y comercial.**

Título del artículo en idioma inglés.

**Alterations in sperm quality and genetic damage of human sperm due to *in vitro* exposure to glufosinate ammonium of technical and commercial grade.**

Autores.

**M. K. Ramírez-Venancio  
Miguel Ángel Zayas-Balderas  
Solís Heredia María de Jesús  
Mercedes Calixto-Gálvez  
Salvador Muñoz-Barrios  
Sandra Quintana-Ponce  
Cecilia González-Calixto  
Mayrut Osdely Urióstegui-Acosta**

Referencia bibliográfica:

MLA

Ramírez-Venancio M. K., Miguel Ángel Zayas-Balderas, Solís Heredia María de Jesús, Mercedes Calixto-Gálvez, Salvador Muñoz-Barrios, Sandra Quintana-Ponce, Cecilia González-Calixto, Mayrut Osdely Urióstegui-Acosta. "Alteraciones sobre la calidad espermática y daño genético de los espermatozoides humanos por exposición *in vitro* a glufosinato de amonio grado técnico y comercial". *Tlamati* 11.2 (2020): 5-11. Print.

APA

Ramírez-Venancio, M. K., Zayas-Balderas, M. A., Solís-Heredia, Ma. de J., Calixto-Gálvez, M., Muñoz-Barrios, S., Quintana-Ponce, S., González-Calixto, C. y Urióstegui-Acosta, M. (2020). Alteraciones sobre la calidad espermática y daño genético de los espermatozoides humanos por exposición *in vitro* a glufosinato de amonio grado técnico y comercial. *Tlamati*, 11(2), 5-11.

---

ISSN Revista impresa: 2007-2066.

ISSN Revista digital: En trámite

Publicado el 31 de diciembre del 2020

© 2020 Universidad Autónoma de Guerrero

Dirección General de Posgrado e Investigación

Dirección de Investigación

*TLAMATI*, es una publicación trimestral de la Dirección de Investigación de la Universidad Autónoma de Guerrero. El contenido de los artículos es responsabilidad exclusiva de los autores y no refleja de manera alguna el punto de vista de la Dirección de Investigación de la UAGro. Se autoriza la reproducción total o parcial de los artículos previa cita de nuestra publicación.



## Alteraciones sobre la calidad espermática y daño genético de los espermatozoides humanos por exposición *in vitro* a glufosinato de amonio grado técnico y comercial

M. K. Ramírez-Venancio<sup>1</sup>  
 Miguel Ángel Zayas-Balderas<sup>1</sup>  
 Ma. de Jesús Solís-Heredia<sup>2</sup>  
 Mercedes Calixto-Gálvez<sup>1</sup>  
 Salvador Muñoz-Barrios<sup>1</sup>  
 Sandra Quintana-Ponce<sup>1</sup>  
 Cecilia González-Calixto<sup>3</sup>  
 Mayrut Osdely Urióstegui-Acosta<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Guerrero. Escuela Superior de Ciencias Naturales. Laboratorio de Inmunotoxigenómica. Carretera Nacional Chilpancingo-Petaquillas, Ex Rancho Shalako, Petaquillas, Guerrero-México. C. P. 39105. Tel +52 (747) 494 2100..

<sup>2</sup>Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados Departamento de Toxicología. Cd. de México, México.

<sup>3</sup>Universidad Autónoma de Guerrero. Facultad de Enfermería. Acapulco, Guerrero-México.

\*Autor de correspondencia  
 uriosteguiacosta@uagro.mx

### Resumen

Los plaguicidas organofosforados [OF] son de importancia médica por su impacto en la salud, en particular se ha reportado que los plaguicidas grado comercial son más reprotóxicos que el grado técnico. El glufosinato de amonio [GLA], que es un herbicida foliar OF se ha relacionado con efectos a nivel reproductivo y sobre el desarrollo embrionario, es por ello que el objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos adversos por la exposición *In vitro* a GLA grado técnico y comercial sobre los espermatozoides de humano. Las muestras de cinco donadores (se realizaron alícuotas de  $5 \times 10^6$ ) a los que se les evaluó previamente todos los parámetros de calidad espermática se expusieron a GLAt (técnico) y GLAc (comercial) concentraciones de 300, 500, 750 y 1000  $\mu\text{M}$  en medio de capacitación M16, se incubaron 1h/37°C/5% CO<sub>2</sub>, se evaluó la viabilidad, motilidad, y daño al ADN espermático. Se observó que el GLAc fue ligeramente más tóxico que el GLAt ya que disminuyó la viabilidad, motilidad, generó rupturas en el ADN y alteraciones sobre la condensación de la cromatina espermática. Por otro lado, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las mismas dosis con las diferentes presentaciones de GLA. El GLAc fue ligeramente más reprotóxico que el GLAt.

### Palabras clave

Plaguicidas Organofosforados, Glufosinato de amonio, Calidad espermática, Cromatina espermática.

### Como citar el artículo:

Ramírez-Venancio, M. K., Zayas-Balderas, M. A., Solís-Heredia, Ma. de J., Calixto-Gálvez, M., Muñoz-Barrios, S., Quintana-Ponce, S., González-Calixto, C. y Urióstegui-Acosta, M. (2020). Alteraciones sobre la calidad espermática y daño genético de los espermatozoides humanos por exposición *in vitro* a glufosinato de amonio grado técnico y comercial. *Tlamati*, 11(2), 5-11.

## Abstract

Organophosphate [OP] pesticides are of medical importance for their health impact, in particular commercial grade pesticides have been reported to be more reprotoxic than technical grade. Ammonium glufosinate [GLA] which is a foliar herbicide OF has been related to effects at the reproductive level and on embryonic development, which is why the aim of this work were to evaluate the adverse effects of *In vitro* exposure to grade GLA. technical and commercial on human sperm. Samples from five donors (5 x 106 aliquots were made) to which all sperm quality parameters were previously evaluated were exposed to GLAt (technical) and GLAc (commercial) concentrations of 300, 500, 750 and 1000 mM in M16 training medium, 1h / 37C / 5% CO2 were incubated, viability, motility, and damage to sperm DNA were evaluated. It was observed that the GLAc was slightly more toxic than the GLAt since it decreased the viability, motility, generated breaks in the DNA and alterations on the condensation of the spermatic chromatin, on the other hand, statistically significant differences were observed between the same doses with the different GLA presentations. GLAc was slightly more reprotoxic than GLAt.

**Keywords:** Organophosphate pesticides, Ammonium glufosinate, Sperm quality, Sperm chromatin.

## Introducción

Estudios recientes han mostrado un fuerte deterioro global en la salud reproductiva masculina (Sengupta, Borges Dutta y Krajewska-Kulak 2017), particularmente, México enfrenta una pobreza severa y malos resultados en salud (World Bank, 2017). En las últimas dos décadas, varios estudios han reportado que la exposición ambiental y ocupacional a plaguicidas se ha asociado con alteraciones en la fertilidad masculina (Martenies y Perry, 2013), estas alteraciones se aprecian por una baja calidad espermática, el incremento en la incidencia de criptochidismo, hispopadías y tumores en células testiculares que han sido atribuidas por la exposición a químicos disruptores endocrinos en el ambiente, alimentos y productos farmacéuticos, incluyendo micotóxicas y plaguicidas (Kumar, Telang, Singh, Jain, Afroz y Patil, 2011; Skakkebaek, Rajpert-De Meyts, Buck Louis, Toppari, Andersson, Eisenberg, Jensen, Jørgensen, Swan, Sapra y Ziebe, 2016). La prevalencia de la infertilidad (definida como la incapacidad de una pareja para concebir después de un año de relaciones sexuales frecuentes, sin medidas anticonceptivas) se ha estimado que ocurre en 15% de las parejas en edad reproductiva (Irvine, 1998), se atribuye al factor masculino 40 a 50% de los casos (Bhasin, De Krester y Baker, 1994).

Existen plaguicidas de diferentes categorías químicas, como los organoclorados [OCL], organofosforados [OF], carbamatos [CB] y piretroides. Estos plaguicidas son ampliamente estudiados por su actividad disruptiva endocrina. Los plaguicidas son usados extensivamente en la agricultura en áreas tropicales, con la finalidad de incrementar la producción de los campos agrícolas. Con la aplicación de estos agentes químicos se espera que incrementen las producciones agrícolas en función de los aumentos de las poblaciones a nivel mundial (Nili-Ahmadabadi, Ali-Heidar, Ranjbar, Mousavi, Ahmadimoghaddam y Larki-Harchegani, 2018; Wielogórska, Elliott, Danaher y Connolly, 2015). Los OF son extensamente usados en la agricultura/horticultura y ahora han remplazado a los OCL, debido a su eficiencia en el control de plagas y su rápida degradación en el ambiente (Li, Nagahara, Takahashi, Takeda, Okumura y Minami, 2002).

El glufosinato de amonio [GLA] es un herbicida foliar, que químicamente es un OF no selectivo y se utiliza para

controlar el crecimiento de malezas post-emergentes. La Organización Mundial de la Salud [OMS] lo clasifica como moderadamente peligroso (Grupo II) (OMS, 2010). Está registrado para su uso en cultivos y zonas no cultivables en: plantas ornamentales y una variedad de áreas industriales, residenciales y públicas (International Programme on Chemical Safety-International Chemical Safety Information [IPCS-INCHEM], 1991; National Institutes on Health [NIH], 2015).

Con respecto a su toxicocinética, esta es limitada, sin embargo, en ratas se ha reportado en ratas, un Nivel sin Efecto Adverso Observable [NOAEL] de 14 mg/kg de peso corporal (IPCS 1991). La DL50 establecida en ratones de la cepa ICR es de 436 mg/kg de peso corporal, mientras que la dosis reportada para intentos suicidas en humanos es aproximadamente 13.9 mg/kg de peso corporal (IPCS 1991, Schulte-Hermann, Wogan, Berry, Brown, Czeizel, Giavini y Neubert, 2006; Mao, Hung, Wu, Tsai, Wang, Ger y Yang, 2012).

El GLA inhibe selectivamente la actividad de la glutamina sintetasa y el glutamato descarboxilasa, resultando en un incremento de los niveles del ácido glutámico, generando toxicidad en el sistema nervioso central (Watanabe y Sano, 1998). Los efectos severos del envenenamiento agudo por GLA son convulsiones, paro respiratorio, coma y alteración de la conciencia (Hori, Tanaka, Fujisawa y Shimada, 2003).

En poblaciones humanas se observó que en agricultores italianos se asoció la exposición a una mezcla de plaguicidas, entre ellos el GLA, con la generación de daño al ADN en células somáticas y la presencia de aductos 8-hidroxiguanosina (8-oxodG) en células de sangre periférica (Cortes-Genchi Villegas-Arrizón, Aguilar-Madrid, Del Pilar, Maruris-Reducindo y Juárez- Pérez, 2008; Koureas Tsezou, Tsakalof, Orfanidou, y Hadji-Christodoulou, 2014; Locia-Morales, 2014). A nivel reproductivo, el estudio realizado en trabajadores chinos de una fábrica de plaguicidas (etil-paratión, metil-paratión y metamidofos), redujo en la concentración y motilidad espermática (Padungtod, Savitz, Overstreet, Christiani, Ryan y Xu, 2000). Por su parte, Sánchez-Peña, Reyes, Lopez-Carrillo, Recio, Morán-Martínez, Cebrian y Quintanilla-Vega (2004) reportaron la presencia de células inmaduras y alteración en la estructura de la cromatina de los espermato-

Tabla 1. Parámetros basales espermáticos de cada donador.

No. de donador	Viabilidad (%)	Motilidad (%)	Concentración ( $10^6$ células/mL)	Morfología (%)
1	90±0.7	82±8.5	107±9.9	84.5±0.3
2	84±1.4	78.5±2.1	70.5±0.7	89±0.7
3	85±2.8	81±8.5	85.5±0.7	91±1.2
4	89±5.7	85.5±4.9	84±9.9	90.2±1.0
5	89.5±0.7	88.5±2.1	85±7.0.	86±0.5

Se presenta la media  $\pm$  DS de los parámetros de calidad de las veces que dono muestra.

zoides de agricultores de La Comarca Lagunera, México; quienes estuvieron expuestos a una mezcla de plaguicidas. Finalmente, Pérez-Herrera, Polanco-Minaya, Salazar-Arredondo, Solís-Heredia, Hernández-Ochoa, Rojas-García y Quintanilla-Vega (2008), reportaron una disminución de la calidad del semen y daño al ADN en agricultores del estado de Yucatán, afectando los distintos estadios de maduración de las células espermáticas. En un modelo murino se observó que plaguicidas como el diazinón grado comercial (administrado a dosis únicas), alteró la calidad espermática (viabilidad, motilidad, morfología), provocó rupturas en el ADN y alteración en la compactación de la cromatina espermática a los 8 días post-exposición (Piña-Guzmán, Solís-Heredia y Quintanilla-Vega, 2005), Urióstegui-Acosta, Hernández-Ochoa, Solís-Heredia, Martínez-Aguilar, y Quintanilla-Vega (2014), reportaron que la exposición a dosis repetidas a metamidofos grado comercial fue más reprotóxica que la exposición a metamidofos grado técnico. Estudios recientes del grupo de trabajo de González-Calixto, Moreno-Godínez, Marutis-Reducindo, Hernández-Ochoa, Quintanilla-Vega y Urióstegui-Acosta en el 2017, mostraron que el GLA grado técnico alteró la calidad espermática y generó rupturas en el ADN de los espermatozoides de ratones expuestos de manera aguda. Finalmente, la exposición de espermatozoides *in vitro* a metilparatión grado comercial y técnico, alteró los parámetros de calidad espermática y generó alteraciones en la membrana plasmática de los espermatozoides (Cervantes-Leyva y Vázquez-Peña, 2018).

El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos sobre los parámetros de calidad (viabilidad y motilidad) y daño al ADN espermático por la exposición *in vitro* a GLA grado técnico y comercial sobre los espermatozoides de humano.

## Materiales y métodos

### Reactivos

Glufosinato de amonio grado técnico [GLAt], dimetil sulfoxido [DMSO] y albúmina de suero bovino [BSA] fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St Louis, MO). EspermaVIT y EspermaCON fueron adquiridos de MegaFertil (México City, México) y la naranja de acridina [AO] de Amersham (Amersham, UK). El Glufosinato de amonio grado comercial [GLAc] fue adquirido en una expendedora de plaguicidas.

### Muestras espermáticas

Las muestras de semen fueron obtenidas de cinco voluntarios sanos, que presentaron parámetros normales de calidad de semen de acuerdo con los criterios establecidos

por la OMS en el 2010 (véase Tabla 2). Para el daño al ADN e integridad de la cromatina espermática, se consideró lo establecido por Evenson (2016). Las muestras de semen (tres muestras por individuo) fueron colectadas en contenedores de plástico de boca ancha estériles y la calidad espermática se evaluó antes de cumplir 1 h de haber colectado la muestra.

### Exposición a Glufosinato de amonio

Alicuotas de  $5 \times 10^6$  espermatozoides (con al menos un 70% de motilidad progresiva), se trataron con GLAt y GLAc a concentraciones de 300, 500, 750 y 1000  $\mu$ M en DMSO (0.15%) en medio de capacitación M16, suplementado con BSA (3.5 mg/mL). Los tratamientos se realizaron por duplicado para cada concentración de GLAt y GLAc. Cada tratamiento se llevó a un volumen final de 1 ml, posteriormente se incubó por 1 h a 37°C en una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de O<sub>2</sub>.

Después de la exposición a los diferentes tratamientos de GLAt y GLAc, las muestras se centrifugaron a 3500 rpm/6 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en medio M16.

### Evaluación de la integridad del ADN y estructura de la cromatina espermática por citometría de flujo

Se empleó la técnica Sperm Chromatin Structure Assay [SCSA], modificada por Evenson (2016). La técnica de SCSA evalúa la susceptibilidad de la cromatina espermática a la desnaturalización ácida *in situ*. Las muestras fueron incubadas con el fluorocromo naranja de acridina [NA], el cual posee propiedades metacromáticas que le permiten intercalarse entre las bases del ADN de doble cadena y emitir una fluorescencia verde (ADN no desnaturalizado) y cuando se intercala con el ADN de cadena sencilla emite una fluorescencia roja (ADN desnaturalizado). Se evaluaron el Índice de Fragmentación del ADN [DFI], y la Alta fluorescencia del ADN [HDS], los cuales representan el daño al ADN y el porcentaje de células con una cromatina inmadura o alterada, respectivamente.

Para ello, una alícuota de  $2 \times 10^6$  espermatozoides se

Tabla 2. Parámetros establecidos en el Manual de la OMS en su 5ta edición.

Parámetros	Valores
Viabilidad	58%
Motilidad	32%
Concentración	$15 \times 10^6$ células/mL
Morfología	4% o más

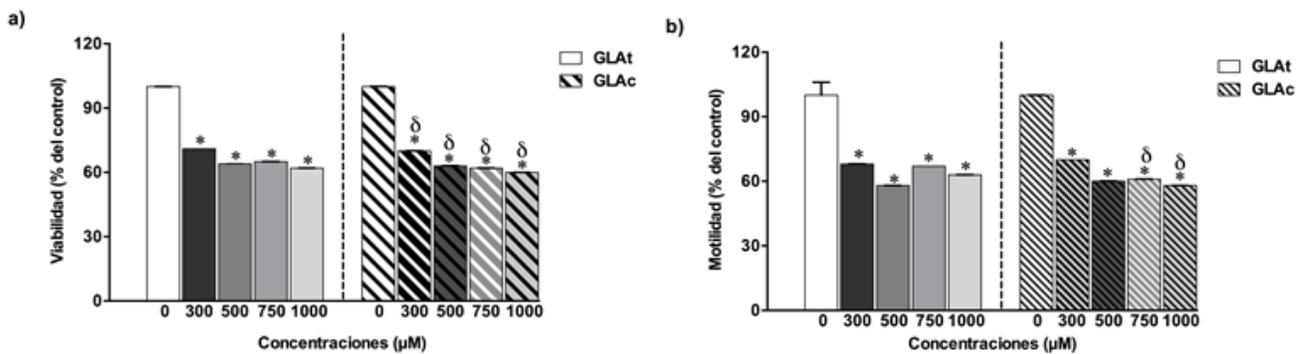


Figura 1. Viabilidad y motilidad espermática después de la exposición a GLAt y GLAc. Los espermatozoides fueron incubados a las diferentes dosis (300M, 500M, 750M y 1000M) por 1 h/37°C/5% CO<sub>2</sub>/95% O<sub>2</sub> después de ese tiempo se evaluó la viabilidad (a) y motilidad (b). Los datos representan la media y DE. Los grupos control y tratado se conformaron de 5 muestras y sus respectivos duplicados, respectivamente, por dosis. \*Diferencia significativa comparada al grupo testigo ( $p < 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de ANOVA y la prueba Pos-Hoc Bonferroni y <sup>δ</sup>Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) comparada entre GLAt y GLAc y las mismas dosis fue con la prueba de Pearson.

resuspendió en 200 µl del amortiguador TNE (Tris-HCl 0.01 M, NaCl 0.15 M y EDTA 0.01 M, pH 7.4), y se sonóico (Ultrasonic processor GE-130) a un máximo de potencia de 60 % a 4 °C/3 min para eliminar las células somáticas contaminantes. Posteriormente, a una alícuota de 100 µL de esta suspensión ( $1 \times 10^6$  espermatozoides) se le agregaron 200 µL de la solución permeabilizante (HCl 0.08 N, NaCl 0.15 M y Tritón X-100 0.1 %, pH 1.2) y la muestra se dejó reposar sobre una cama de hielo durante 30 seg para facilitar la entrada del fluorocromo a las células. Inmediatamente después se adicionaron 600 µL de la solución de tinción (ácido cítrico 0.1 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.2 M, EDTA 0.001 M, NaCl 0.15M y 600 µl de NA) y la muestra se dejó reposar en hielo durante 3 min. Posteriormente, la preparación celular fue depositada en un tubo de polipropileno para su análisis en un citómetro de flujo (FACSsort Becton Dickinson, CA). Una muestra de referencia fue evaluada en cada corrida como control de calidad. Los datos fueron analizados en el programa SCSASoft® (SCSA Diagnostic, Inc., Brookings, SD).

#### Análisis estadístico

Los resultados estadísticos se reportaron como media  $\pm$  Desviación Estándar [DE] de cinco donadores (tres muestras independientes de cada donador), duplicados de cada experimento fueron realizados. Se analizaron los grupos control y tratados por la prueba de análisis de varianza y con la prueba pos-hoc Bonferroni. Los tratamientos de las muestras con la misma concentración de GLAt y GLAc fueron analizados con la prueba Pearson. El programa estadístico STATA® versión 12 (Stata Corp., College Station, TX), se usó para todos los cálculos estadísticos. La significancia estadística fue  $p < 0.05$ .

#### Resultados

##### Parámetros basales espermáticos previos a la exposición a GLAt y GLAc

Se evaluaron los parámetros de calidad espermática de las muestras de semen de los 5 donadores previo a la expo-

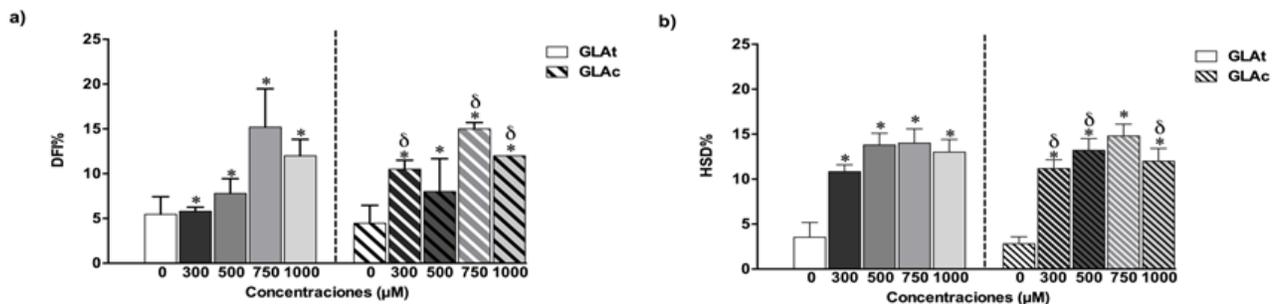


Figura 2. Rupturas al ADN y alteraciones de la integridad de la cromatina por la exposición a GLAt y GLAc. Los espermatozoides fueron incubados a las diferentes dosis (300M, 500M, 750M y 1000M) por 1 h/37°C/5% CO<sub>2</sub>/95% O<sub>2</sub>, después de ese tiempo se evaluó el DFI% (a) y HSD% (b). Los datos representan la media y DE. Los grupos control y tratado se conformaron de 5 muestras y sus respectivos duplicados, respectivamente, por dosis. \*Diferencia significativa comparada al grupo testigo ( $p < 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de ANOVA y la prueba Pos-Hoc Bonferroni y <sup>δ</sup>Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) comparada entre GLAt y GLAc y las mismas dosis fue con la prueba de Pearson.

sición con las diferentes concentraciones de GLA, los cuales cumplieron con las medidas estándar (como son: viabilidad, motilidad, concentración y morfología espermática) establecidas por la OMS (2010), (véanse Tabla 1 y Tabla 2).

#### *La exposición in vitro a GLAt y GLAc afecta la calidad de los espermatozoides*

La viabilidad y motilidad se evaluó posterior a la exposición para determinar si afectaba la exposición a las diferentes concentraciones (300  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 750  $\mu$ M y 1000  $\mu$ M) y presentaciones GLAt y GLAc de GLA. La viabilidad disminuyó en un 29 %, 36 %, 35 % y 38 % en el grupo de GLAt, mientras que con el GLAc 30 %, 37 %, 38 % y 40 %. Mientras que la motilidad en el grupo expuesto a GLAt se alteró en un 32 %, 42 %, 33 % y 37% y finalmente en el grupo de GLAc esta disminución fue de un 30 %, 40 %, 39 % y 42 % (concentraciones de 300  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 750  $\mu$ M y 1000 M), todos comparado respectivamente con el grupo control ( $p < 0.05$ ). Se compararon si había diferencia entre las mismas dosis de ambos grupos y se observó diferencia en viabilidad en todas las dosis ( $p < 0.05$ ), mientras que en la motilidad estas diferencias solo se vieron en las concentraciones de 750  $\mu$ M y 1000  $\mu$ M ( $p < 0.05$ ), (véase Figura 1).

#### *Alteraciones sobre el DFI% Y HSD% por exposición a GLAt y GLAc*

El DFI% se alteró 0.06 veces en la concentración de 300  $\mu$ M, 0.2 veces en 500  $\mu$ M, 1.7 veces en 750  $\mu$ M y 1.2 veces en 1000  $\mu$ M, el grupo tratado con GLAt, mientras que en el grupo tratado con GLAc a las concentraciones de 300  $\mu$ M a 1000  $\mu$ M, se alteró 1.4, 0.7, 2.4, 1.7 veces, comparado con el grupo control ( $p < 0.05$ ). Se observó una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las mismas dosis en las diferentes presentaciones de GLA (GLAt *Vs* GLAc) (véase Figura 2).

### **Discusión**

Actualmente se han realizado numerosas investigaciones epidemiológicas en distintas poblaciones agrícolas en el mundo donde se ha estudiado los efectos asociados con la exposición a plaguicidas (Cortés-Genchi et al. 2007), los cuales son ampliamente utilizados en México, el GLA que es un herbicida OF muy empleado en México, representa un problema de salud (Pérez-Herrera et al. 2008, Rojas-García, Medina-Díaz, Robledo-Marengo, Barrón-Vivanco, Girón-Pérez, Velázquez-Fernández, González-Arias, et al. 2011, Urióstegui-Acosta et al. 2014). A nivel reproductivo masculino estudios del grupo de trabajo han demostrado que el GLA disminuyó la viabilidad, motilidad e incrementa el daño morfológico, así como generó rupturas en el ADN y alteraciones de la cromatina espermática (González-Calixto et al., 2017). Aunque el GLA ha sido estudiado por sus efectos embriogénicos, dismorfogénicos y teratogénicos, así como por su capacidad de inducir partos prematuros y abortos en hembras expuestas experimentalmente, es limitado lo que se sabe de los efectos sobre tracto reproductor masculino (IPCS, 1999, Schulte-Hermann et al. 2006). En este trabajo evaluamos si había diferencias

estadísticas en la exposición a GLAt y GLAc en un sistema de espermatozoides *in vitro*, y se demostró que el GLAc y GLAt disminuyen la viabilidad y motilidad de los espermatozoides humanos. De igual manera, este trabajo nos muestra que el GLAt y GLAc es tóxico para los espermatozoides maduros, por otro lado, se demostró que tanto el GLAt y el GLAc generaron rupturas en el ADN y alteraciones sobre la cromatina de los espermatozoides maduros. Estos resultados concuerdan con los reportado por Urióstegui-Acosta y colaboradores (2014) en donde en ratones expuestos a METt y METc (3.75, 5 y 7 mg/kg/d/4 d/via I.P.) encontraron alterados los parámetros de calidad espermática con el METc, mientras que con el METt no se observaron diferencias significativas. De igual manera se demostró que ambas presentaciones de MET generaron rupturas al ADN espermático y alteraciones sobre la compactación de la cromatina concluyendo que el GLAc es más reprotóxico.

Otros estudios de los efectos de los plaguicidas sobre el tracto reproductor masculino han mostrado que la exposición *in vivo* a plaguicidas OF alteran los parámetros de calidad espermática, tal es el trabajo de Piña-Guzmán y colaboradores (2005) en donde ratones machos en edad reproductiva expuestos a dosis únicas de metil paratión (3-12 mg/kg/d/I.P) alteraba la viabilidad y motilidad espermática; así como la exposición a dosis agudas de metamidofos (3.75, 5 y 7 mg/kg/d/4d/I.P), se alteró la viabilidad, motilidad y morfología espermática, estudios *In vitro* (espermatozoides humanos), han demostrado que la exposición a dosis bajas de metil paratión, clorpirifos, diazinón, y sus metabolitos metil paraoxón, clorpirifos oxón, diazoxón, alteró la viabilidad espermática y generó rupturas en el ADN espermático (Salazar-Arredondo, De Jesús-Solís, Rojas-García, Hernández-Ochoa y Quintanilla-Vega, 2008). En poblaciones ocupacionalmente expuestas a plaguicidas grado comercial se han reportado alteraciones en los parámetros de calidad como: viabilidad, motilidad, morfología y se ha reportado rupturas sobre el ADN (ensayo cometa) y alteraciones sobre la compactación de la cromatina (Sánchez-Peña et al., 2004; Pérez-Herrera et al., 2008).

Aunque la comparación entre el GLAt y GLAc, nos indica que los coadyuvantes en donde se diluyen los plaguicidas comerciales son tóxicos, la composición exacta de la formulación del vehículo de GLAc es confidencial y puede variar. Hasta ahora, se conoce parcialmente la toxicocinética del GLA y se podría suponer que el vehículo de formulación puede contener ingredientes para mejorar la penetración de la membrana celular del GLA (Williamson, Long, Kallman y Wilson, 1989). Esto sugiere que el GLA tiene como blanco al ADN. Estos efectos pueden estar relacionados con algunos de los tres mecanismos de acción de los OF como son: generación de estrés oxidativo, alquilación del ADN y proteínas (es decir, la formación de aductos alquilado), así como fosforilación de proteínas. Se ha propuesto que uno de los mecanismos más estudiados recientemente es la fosforilación de proteínas, como es el estudio en donde dosis únicas del insecticida OF diazinón fosforila proteínas nucleares (protaminas), de los espermatozoides en ratones alterando así la estructura de la cromatina de los espermatozoides (Piña-Guzmán et al., 2005). Por otro lado, se evaluó la capacidad de MET para fosforilar proteínas de las células espermáticas. Los análisis de inmunodetección mostraron que residuos de serina y tirosina de las proteínas (extracto total del espermatozoide) fueron fosforilados en

diferentes estadios de maduración de los espermatozoides (28 y 45 dpt). Por lo tanto, estas alteraciones en las proteínas pueden explicar algunos de los efectos observados en la función espermática de los ratones expuestos a MET (Urióstegui-Acosta et al., 2014). Con respecto al daño oxidativo se ha abordado estudios en modelo murino, en poblaciones y en sistemas *in vitro*, en donde se ha involucrado los efectos con la generación del daño oxidativo (Sharma, Bashir, Irshad, Gupta, Dogra, 2005; Gultekin, Delibas, Yasar y Kilinc, 2001; Ranjbar, Pasalar y Abdollahi, 2002). Un posible origen del estrés oxidativo (generación de ROS) es a través de la activación del CYP durante el metabolismo OF, que produce principalmente superóxido (Bondy y Naderi., 1994). Con respecto a este mecanismo tenemos los trabajos de Piña-Guzmán, Solis-Heredia, Rojas-García, Urióstegui-Acosta y Quintanilla-Vega (2006) y Urióstegui-Acosta, (2007), en donde ratones expuestos a dosis únicas y repetidas de Metil Paratión se observó la generación de estrés oxidativo evaluado a través de la determinación de malondialdehído [MDA], un producto de la lipoperoxidación de la membrana plasmática y se asoció con las alteraciones a los parámetros de calidad espermática y daño genético. Aunque la generación de daño oxidativo por OF es un mecanismo muy plausible de su toxicidad en el ADN espermático, nuestros resultados sugieren que ambas presentaciones de GLA ejercen efectos genotóxicos probablemente por un mecanismo oxidativo, estudios que actualmente se están realizando para evaluar esta hipótesis.

## Conclusiones

Estos hallazgos nos permiten tener en cuenta que algunos plaguicidas grado comercial, así como técnico, resultan ser tóxicos, aunque en algunos casos existen ligeras diferencias como es en este, esto es un indicio que los coadyuvantes en los que los plaguicidas se disuelven son tóxicos y que esto impacta en la calidad espermática y por ende en la capacidad fertilizantes de los varones que se dediquen a la actividad agrícola o en la producción de agroquímicos.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al M. en C. Víctor Hugo Rosales García por el apoyo técnico brindado en la realización de los ensayos y por su asistencia con el citometro de flujo (CINVESTAV-IPN), de igual manera al Laboratorio de Toxicología ambiental de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas-UAGro y al Laboratorio de Toxicología Reproductiva Masculina del Departamento de Toxicología (CINVESTAV-IPN), por su apoyo en el préstamo de sus instalaciones. Este estudio fue financiado por el Proyecto Semilla otorgado a MUA (# 094/2015) por la UAGro.

## Referencias

- Bhasin, S., De Krester, D.M., Baker, H.W. (1994). Pathophysiology and natural history of male infertility. *J Clin Endocrinol Metab*, 79, 1525-1529.
- Bondy SC, Naderi S. Contribution of hepatic cytochrome P450 systems to the generation of reactive oxygen species. *Biochem Pharmacol* 1994;48: 155-9.
- Cervantes-Leyva, D., y Vázquez-Peña, J.Y. (2018). *Evaluación de los efectos adversos por la exposición In vitro a Metil-Paratión grado comercial sobre los espermatozoides de humano*. Tesis de licenciatura, Escuela Superior de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Guerrero, 24-26 p.
- Cortés-Genchi, P., Villegas-Arrizón, A., Aguilar-Madrid, G., Del Pilar, P.R.M., Maruris-Reducindo, M. y Juárez-Pérez, C. (2007). Symptom prevalence and pesticide management on agricultural workers. *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc*, 46, 145-152.
- Evenson, D. (2016). The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Animal Reproduction Science*, 169, 56-75.
- González-Calixto, C., Moreno-Godínez, Ma. E., Marutis-Reducindo, M., Hernández-Ochoa, M.I., Quintanilla-Vega, Ma. B., Urióstegui-Acosta, M.O. (2018). El glufosinato de amonio altera la calidad y el ADN de los espermatozoides de ratón. *Rev. Int. Contam. Ambie. (Especial sobre Contaminación y Toxicología por Plaguicidas (CTP))*, 34, 7-15.
- Gultekin F, Delibas N, Yasar S, Kilinc I. In vivo changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos-ethyl in rats. *Arch Toxicol* 2001;75:88-96.
- Hori, Y., Tanaka, T., Fujisawa, M., Shimada, K. (2003). Toxicokinetics of DL-glufosinate enantiomer in human BASTA poisoning. *Biol Pharm Bull*, 26, 540-543.
- Programme on Chemical Safety-International Chemical Safety Information. (1991). Programme on Chemical Safety. 828. Glufosinate ammonium (Pesticide residues in food: 1991 evaluations Part II Toxicology) [en línea] <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v91pr12.htm> 06-15-15.
- Irvine, D.S. (1998). Epidemiology and aetiology of male infertility. *Hum Reprod*, 13 (Suppl 1), 33-44.
- Koureas, M., Tsezou, A., Tsakalof, A., Orfanidou, T. y Hadji-Christodoulou, C. (2014). Increased levels of oxidative DNA damage in pesticide sprayers in Thessaly Region (Greece). Implications of pesticide exposure. *Sci. Total Environ*, 496, 358-364.
- Kumar, S.N., Telang, A.G., Singh, K.P., Jain, A.K., Afroz, M., Patil, R.D. (2011). Experimentally induced toxicity of ochratoxin a and endosulfan in male wistar rata: a hormonal disorder in adult male rats. *J. Anim. Vet. Adv*, 10, 1750-1755.
- Li, Q., Nagahara, N., Takahashi, H., Takeda, K., Okumura, K., Minami, M. (2002). Organophosphorus pesticides markedly inhibit the activities of natural killer, cytotoxic T lymphocyte and lymphokine-activated killer: a proposed inhibiting mechanism via granzyme inhibition. *Toxicology*, 172, 181-190.
- Locía-Morales, D. (2014). *Polimorfismo en el gen PON1 y daño del AND en población expuesta ocupacionalmente a plaguicidas organofosforados*. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, 30 p.
- Mao Y.C., Hung D.Z., Wu M.L., Tsai W.J., Wang L.M., Ger J. y Yang C.C. (2012). Acute human glufosinate-containing herbicide poisoning. *Clin. Toxicol.* 50, 396-402. DOI: 10.3109/15563650.2012.676646
- Martenies, S. E. y Perry, M, J. (2013). Environmental and occupational pesticide exposure and human sperm pa-

- rameters: a systematic review. *Toxicology*, 307, 66-73.
- National Institutes on Health (Febrero 20, 2015). *TOXNET. Toxicology Data Network. Glufosinate- ammonium NIH*. U.S-National Library of Medicine. Obtenido de: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/m/77182-82-2> 19/12/2016.
- Nili-Ahmadabadi, A., Ali-Heidar, F., Ranjbar, A., Mousavi, L., Ahmadimoghaddam, D., Larki-Harchegani, A. (2018). Protective effect of amlodipine on diazinon-induced changes on oxidative/antioxidant balance in rat hippocampus. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 13, 368-76.
- Organización Mundial de la Salud. (2010). *Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*, World Health Organization. Fifth ed. University Press, Cambridge, New York.
- Padungtod, C., Savitz, D. A., Overstreet, J. W., Christiani, D. C., Ryan, L. M. y Xu, X. (2000). Occupational pesticide exposure and semen quality among Chinese workers. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 42, 982-992.
- Pérez-Herrera, N., Polanco-Minaya, H., Salazar-Arredondo, E., Solís-Heredia, M., Hernández-Ochoa, I., Rojas-García, E. y Quintanilla-Vega, B. (2008). PON1Q192R genetic polymorphism modifies organophosphorous pesticide effects on semen quality and DNA integrity in agricultural workers from southern Mexico. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 230, 261-268.
- Piña-Guzmán, B., Solís-Heredia, M. y Quintanilla-Vega, B. (2005). Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 202, 189-198.
- Piña-Guzmán, B., Solís-Heredia, M.J., Rojas-García, A.E., Urióstegui-Acosta, M., Quintanilla-Vega, B. (2006). Genetic damage caused by methyl-parathion in mouse spermatozoa is 712 related to oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 216, 216-224.
- Ranjbar A, Pasalar P, Abdollahi M. (2002). Induction of oxidative stress and acetyl- cholinesterase inhibition in organophosphorous pesticide manufacturing workers. *Human & Experimental Toxicology*, 21, 179-82
- Rojas-García, A. E., Medina-Díaz I. M., Robledo-Marengo, M. de L., Barrón-Vivanco, B. S., Giron-Pérez, M. I., Velázquez-Fernández, J. B., González-Arias, C. A., Albores-Medina, A., Quintanilla-Vega, B., Ostrosky-Wegman, P. et al. (2011). Hematological, biochemical effects, and self-reported symptoms in pesticide retailers. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 53, 517-521.
- Salazar-Arredondo, E., De Jesús-Solís, H. M., Rojas-García, E., Hernández-Ochoa, I., y Quintanilla-Vega, B. (2008). Sperm chromatin alteration and DNA damage by methyl-parathion, chlorpyrifos and diazinon and their oxon metabolites in human spermatozoa. *Reproductive Toxicology*, 25, 455-460.
- Sánchez-Peña, L., Reyes, B., Lopez-Carrillo, L., Recio, R., Morán-Martínez, J., Cebrian, M. y Quintanilla-Vega, B. (2004). Organophosphorous pesticide exposure alters sperm chromatin structure in Mexican agricultural workers. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 196, 108-113.
- Schulte-Hermann R., Wogan G.N., Berry C., Brown N.A., Czeizel A., Giavini E. y Neubert D. (2006). Analysis of reproductive toxicity and classification of glufosinate-ammonium. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 44, 1-76.
- Sengupta, P., Borges Jr., E., Dutta, S. y Krajewska-Kulak, E. (2017). Decline in sperm count in European men during the past 50 years. *Human & Experimental Toxicology*, 37, 247-255.
- Sharma, Y., Bashir, S., Irshad, M., Gupta, S. D., Dogra, T. D. (2005). Effects of acute dimethoate administration on antioxidant status of liver and brain of experimental rats. *Toxicology*, 206, 49-57
- Skakkebaek, N. E., Rajpert-De Meyts, E., Buck Louis, G. M., Toppari, J., Andersson, A. M., Eisenberg, M. L., Jensen, T. K., Jørgensen, N., Swan, S. H., Sapra, K. J., Ziebe, S. (2016). Male reproductive disorders and fertility trends: influences of environment and genetic susceptibility. *Physiological Reviews*, 96, 55-97.
- Urióstegui-Acosta M. (2007). *Daño oxidativo y rupturas en el ADN espermático por la exposición a metil paratión*. Tesis Maestría. CINVESTAV-IPN, Cd. de México, México.
- Urióstegui-Acosta, M., Hernández-Ochoa, I., de Jesús Solís-Heredia, M., Martínez-Aguilar, G., y Quintanilla-Vega, B. (2014). Comparative effect of technical and commercial formulations of methamidophos on sperm quality and DNA integrity in mice. *Environmental toxicology*, 29(8), 942-949.
- Watanabe, T. y Sano, T. (1998). Neurological effects of glufosinate poisoning with a brief review. *Human & Experimental Toxicology*, 17, 35-39.
- Wielogórska, E., Elliott, C.T., Danaher, M., Connolly, L., 2015. Endocrine disruptor activity of multiple environmental food chain contaminants. *Toxicology in Vitro*, 29, 211-220.
- Williamson, E. G., Long, S. F., Kallman, M. J., y Wilson, M. C. (1989). A comparative analysis of the acute toxicity of technical-grade pyrethroid insecticides and their commercial formulations. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 18(1), 27-34
- World Bank. (2017). *World Bank Country and Lending Groups: Historical Classifications*, FY. Obtenido de: <https://datahelpdesk.worldbank.org/knowledgebase/articles/906519-world-bank-country-andlending-groups>.