

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E. A. P DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

# **Toxicidad embrionaria en ratones pretratados con el pesticida organofosforado “Diazinon”**

TESIS: Para optar el Título de Biólogo

AUTOR:

**Patricia Susana Díaz Saldívar**

**LIMA – PERÚ 2006**



<b>AGRADECIMIENTOS .</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN .</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT .</b>	<b>5</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .</b>	<b>7</b>
<b>2. OBJETIVOS . .</b>	<b>9</b>
<b>2.1 OBJETIVO GENERAL .</b>	<b>9</b>
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .</b>	<b>9</b>
<b>3. ANTECEDENTES .</b>	<b>11</b>
<b>3.1 PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS .</b>	<b>11</b>
<b>3.2 DIAZINON . .</b>	<b>13</b>
<b>3.2.1 Propiedades Químicas y Físicas . .</b>	<b>13</b>
<b>3.2.2 Usos, Aplicaciones y Comercialización . .</b>	<b>14</b>
<b>3.2.3 Niveles Medioambientales . .</b>	<b>14</b>
<b>3.2.4 Farmacocinética y Farmacodinámica . .</b>	<b>14</b>
<b>3.2.5 Efectos Reproductivos Masculinos .</b>	<b>16</b>
<b>3.2.6 Efectos Reproductivos Femeninos . .</b>	<b>16</b>
<b>3.3 DESARROLLO EMBRIONARIO PREIMPLANTACIONAL . .</b>	<b>17</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .</b>	<b>19</b>
<b>4.1 MATERIALES . .</b>	<b>19</b>
<b>4.1.1 Material Biológico . .</b>	<b>19</b>
<b>4.1.2 Material de Laboratorio .</b>	<b>19</b>
<b>4.2 MÉTODOS .</b>	<b>20</b>
<b>4.2.1 Tratamiento Paterno . .</b>	<b>21</b>
<b>4.2.2 Tratamiento Materno .</b>	<b>21</b>
<b>4.2.3 Obtención de Embriones . .</b>	<b>21</b>
<b>4.2.4 Determinación del Estadio de Desarrollo Embrionario . .</b>	<b>22</b>
<b>4.2.5 Gradación de Embriones . .</b>	<b>22</b>

4.2.6 Determinación del Número Celular e Índice Mitótico .	22
4.2.7 Análisis Estadístico .	23
5. RESULTADOS . .	25
5.1 TRATAMIENTO PATERNO .	25
5.1.1 Fecundidad y Total de Embriones .	25
5.1.2 Desarrollo embrionario .	26
5.1.3 Morfología embrionaria .	26
5.1.4 Transporte embrionario . .	27
5.1.5 Proliferación celular embrionaria .	27
5.1.6 Efecto sobre la Espermatogénesis . .	28
5.1.7 Relación Dosis - Efecto .	28
5.2 TRATAMIENTO MATERNO . .	29
5.2.1 Total de Embriones .	29
5.2.2 Desarrollo embrionario .	29
5.2.3 Morfología embrionaria .	29
5.2.4 Transporte embrionario . .	29
5.2.5 Proliferación celular embrionaria .	30
5.2.6 Relación Dosis - Efecto .	30
6. DISCUSIÓN .	31
7. CONCLUSIONES . .	37
BIBLIOGRAFÍA .	39
ANEXOS .	45

## AGRADECIMIENTOS

A mi asesor y revisor de tesis el Profesor Blgo. José L. Pino Gaviño, por su confianza y apoyo en la realización de la parte experimental de la presente investigación.

A la Profesora Blgo. Betty E. Shiga Oshige, por sus consejos y la revisión de la presente tesis.

Al. Mg. Carlos A. Ponce La Rosa, su asesoramiento profesional me permitió concluir exitosamente la redacción del presente manuscrito.

A mis compañeros del Laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por los 6 años de convivencia, especialmente a Kelly León, por su desinteresada colaboración en los trabajos del laboratorio.

A mi familia, especialmente a mi madre por sus cuidados y a mi hermana Consuelo por nunca decir que no.

Finalmente, a mis amigas por ser confidentes y estar conmigo en las buenas y en las malas.



## RESUMEN

Diazinon es uno de los pesticidas organofosforados de mayor uso alrededor del mundo. Al igual que otros organofosforados, ejerce su acción tóxica a través de la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa lo cual ocasiona que la acetilcolina se acumule en los espacios presinápticos y sobre-estímule diversos tejidos y órganos -entre ellos, los músculos respiratorios- llegando a producir muerte por asfixia en casos de sobredosis. A nivel reproductivo, en mamíferos, puede afectar las gónadas masculinas, disminuyendo así la calidad espermática. Se desconocen sus efectos a nivel de gónadas femeninas y sobre la progenie.

El objetivo de la presente tesis fue evaluar la toxicidad producida por el pesticida organofosforado Diazinon mediante la observación y análisis de los embriones preimplantacionales de ratón obtenidos a partir de hembras y machos tratados independientemente. Para ello, se trataron intraperitonealmente por 5 días consecutivos, cuatro grupos de diez individuos, tanto para el tratamiento paterno como materno. Tres de los grupos recibieron las dosis de 5,25, 10,5 y 21 mg/kg de peso corporal de Diazinon diluido en aceite de maíz, respectivamente; el cuarto grupo, usado como control negativo, fue tratado sólo con el vehículo. Luego de terminado el tratamiento, cada macho fue apareado semanalmente con una hembra no tratada durante 6 semanas, mientras que las hembras fueron apareadas por una sola vez con un macho no tratado. Al cuarto día de preñez todas las ratonas fueron sacrificadas para evaluar la cantidad, calidad, morfología, desarrollo y proliferación celular de los embriones preimplantacionales obtenidos.

Durante el tratamiento paterno, los parámetros embrionarios resultaron afectados de forma variable a lo largo de las seis semanas de evaluación. El efecto tóxico de Diazinon fue más evidente durante las semanas 1 y 5, poniendo así en evidencia que los espermatozoides, espermátides tardías, espermatoцитos tempranos y espermatogonias tipo B son los tipos celulares más sensibles al tratamiento. Durante el tratamiento materno sólo se incrementó el número de embriones retrasados y con morfología de grado 3 y 4. En ambos tratamientos se encontraron embriones con defecto en la formación del blastocele, lo que demostraría el potencial estrogénico de Diazinon sobre los embriones. Diazinon actúa de forma diferente en machos y hembras debido a las características biológicas de cada sexo y ello se ve reflejado en los resultados.

En conclusión, Diazinon afecta la calidad gamética masculina y femenina, siendo este efecto heredable y evidente durante el desarrollo embrionario preimplantacional del ratón.





## ABSTRACT

Diazinon is one of the most widely used organophosphate pesticides worldwide. Similar to other organophosphorates, it exerts its toxic action through the inhibition of the enzyme acetylcholinesterase, which induces acetylcholine accumulation in presynaptic spaces and thus overstimulating several tissues and organs -amongst them, the respiratory musculature- leading to death by asphyxia in case of an overdose. At the reproductive level, in mammals, Diazinon may affect the male gonads, hence decreasing sperm quality. Its effects over the female gonads and over the progeny of affected individuals are currently unknown

The objective of the present thesis was to evaluate the toxicity produced by the organophosphate pesticide Diazinon thru the observation and analysis of mouse preimplantation embryos recovered from independently exposed male and female mice. In order to do that, four groups of mice each composed of ten individuals were intraperitoneally treated during 5 consecutive days, both for paternal and maternal treatments. Three of those groups received doses of 5.25, 10.5, and 21 mg/kg of body weight of Diazinon, respectively, diluted on corn oil; the fourth group, regarded as the negative control, only received the vehicle. After finishing the treatment, each treated male mouse was caged and bred with an untreated female mouse on a weekly basis during 6 weeks, while treated female mice were bred with untreated males only once. On the fourth day of pregnancy, all pregnant female mice were sacrificed to assess the number, quality, morphology, stage of development and cell proliferation status in recovered preimplantation embryos.

During paternal treatment, the embryo parameters were affected on a variable basis along the six-week evaluation period. The toxic effect of Diazinon showed to be more evident on weeks 1 and 5, thus resulting that spermatozoa, late spermatids, early spermatocytes and type B spermatogonia are the most sensitive-to-treatment cell types. On the other hand, during maternal treatment, only the number of developmentally delayed and morphological grade 3 and 4 embryos augmented. In both treatments, embryos with defective blastocoele formation, a feature that demonstrates the estrogenic potential of Diazinon on preimplantation embryos. Diazinon acts differentially on males and females due to the biological characteristics of each gender, a fact that became reflected in our results.

In conclusion, Diazinon affects the male and female gamete quality, being this effect heritable and evident during preimplantation embryo development in the mouse.



# 1. INTRODUCCIÓN

Diazinon es un pesticida organofosforado de uso frecuente en la actividad agrícola y pecuaria para el control de plagas a nivel mundial (World Health Organization, WHO, 1998). La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (United States Environmental Protection Agency, EPA, 1991) reporta a Diazinon como el plaguicida organofosforado de mayor uso en dicho país. En el Perú, el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA, 2000) autoriza su comercialización para uso agrícola y como antiparasitario veterinario de uso externo, pero no posee reportes ni estadísticas sobre su frecuencia o modo de empleo.

Anualmente se reportan numerosos casos de envenenamiento por éste u otros pesticidas organofosforados, ya sea por su uso en la agricultura, por exposición accidental, por suicidios o raramente en homicidios. El modo de exposición es variable e incluye la exposición directa -dérmica o gastrointestinal-, por inhalación y por vía intravenosa. (Sungur y Güven, 2001).

Diazinon, al igual que los demás organofosforados (como Paration, Malation, Clorpirifos, etc), ejerce su efecto tóxico a través de la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, lo cual ocasiona la acumulación del neurotransmisor acetilcolina en las uniones neuronales. El incremento local de acetilcolina bloquea la transmisión neuromuscular del impulso nervioso; este bloqueo causa, entre otros síntomas, una deficiencia respiratoria aguda, lo que conlleva a la muerte (Poet *et al.*, 2004). Diazinon también causa daños y lesiones en diversos tejidos y órganos debido a que es bioactivado por la enzima citocromo P450, la cual lo transforma en diazoxon, una especie

química aun más tóxica (Kappers *et al.*, 2001).

A nivel reproductivo, Diazinon disminuye el peso de las gónadas masculinas, reduce la movilidad y la viabilidad espermática, e incrementa las anormalidades morfológicas en los espermatozoides de rata (El-Azíz *et al.*, 1994). En ratón, investigaciones recientes demuestran que Diazinon también altera la estructura de la cromatina espermática a través de su capacidad de fosforilar las protaminas, proteínas equivalentes a las histonas en los espermatozoides (Piña-Guzmán *et al.*, 2005). Cualquier alteración en la integridad de la cromatina espermática, además de comprometer la fertilidad masculina, afectará el normal desarrollo de la descendencia (Holland *et al.*, 1999; Sánchez-Peña *et al.*, 2004; Anderson, 2005).

No se tienen reportes en la literatura científica de los efectos de Diazinon sobre las gónadas o gametos femeninos, ni sobre el desarrollo embrionario en mamíferos. Pero se sabe que otros organofosforados pueden inducir la ovulación prematura, alterar los niveles de ciertas hormonas (andrógenos, estrógenos, FSH, LH y progesterona), disminuir el crecimiento de los folículos ováricos (Sharara *et al.*, 1998), modificar el ciclo estral o menstrual (Farr *et al.*, 2004) o disminuir la duración de los embarazos en humanos (Ezkenazi *et al.*, 2004). La alteración de cualquiera de estos factores puede causar anomalías severas sobre el desarrollo embrionario o fetal.

Este proyecto determinará en qué medida la exposición paterna y/o materna pregestacional a Diazinon puede alterar el desarrollo embrionario, sobre todo en etapas preimplantacionales por ser éstas más sensibles a xenobióticos como los pesticidas organofosforados, dentro de los cuales está Diazinon.

Así mismo, el estudio de los efectos de la exposición gamética paterna y materna al pesticida organofosforado Diazinon sobre la embriogénesis, a través de la evaluación de la progenie en estadios preimplantacionales en modelos animales mamíferos, contribuirá al conocimiento de las consecuencias biológicas que la exposición a este pesticida puede causar sobre la capacidad reproductiva en individuos expuestos de manera recurrente, dentro de los cuales se encuentra el hombre.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el potencial tóxico del pesticida organofosforado Diazinon sobre el desarrollo embrionario preimplantacional de la progenie de individuos machos y hembras de un modelo animal *in vivo* expuestos al pesticida de manera independiente.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Determinar si la exposición crónica a Diazinon provoca el adelanto o retraso del desarrollo embrionario preimplantacional *in vivo* en el ratón tras exposición materna o paterna por separado. mediante la concordancia entre el estadio de desarrollo y el tiempo gestacional.

-Estudiar el efecto de la exposición crónica a Diazinon sobre la morfología de los embriones preimplantacionales de ratón, provenientes de hembras y machos tratados independientemente con el pesticida.

-Determinar si el transporte embrionario se ve afectado negativamente como

consecuencia del tratamiento paterno o materno con Diazinon.

-Determinar si la proliferación celular de los embriones preimplantacionales de ratón se ve alterada por efecto de la exposición paterna o materna al pesticida, a través del análisis del número celular y del índice mitótico.

-Determinar los estadios de la espermatogénesis que exhiben mayor sensibilidad a Diazinon mediante la correlación de los parámetros embrionarios con los distintos tiempos de evaluación.

## 3. ANTECEDENTES

### 3.1 PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS

Los pesticidas organofosforados (POs) son un grupo diverso de compuestos químicos usados tanto para propósitos domésticos como agropecuarios. Los primeros compuestos organofosforados fueron sintetizados a comienzos del siglo XIX, cuando Lassaigne reaccionó etanol con ácido fosfórico; posteriormente, en 1854 Philip de Clermont describió la síntesis del tetraetil pirofosfato (Furtado y Chan, 2004). En el año 1932, Von Krueger investigó el uso de los organofosforados como pesticidas y sintetizó por primera vez un compuesto que tenía un fósforo unido a un flúor, el cual fue el prototipo del compuesto neurotóxico diisopropil fluorofosfato (DFP). Hacia el año 1952, Schrader inició la investigación de los efectos biológicos de los POs; sin embargo fue Gross el primero en sugerir que la acción tóxica de los organofosforados se debía a su habilidad de interactuar con la enzima acetilcolinesterasa. La producción masiva de los compuestos organofosforados como pesticidas fue posible después de la segunda guerra mundial (Aluigi *et al.*, 2005).

Los POs normalmente son ésteres, amidas o tioles derivados de compuestos fosfóricos, fosfónicos, fosforotiónicos o ácidos fosforotiónicos (International Programme on Chemical Safety; IPCS, 1986). En general, su estructura química consta de un fósforo

unido, por un enlace doble, a un oxígeno o azufre (como en Diazinon) y, por tres enlaces simples, a tres diferentes tipos de radicales, los cuales pueden ser grupos alquilo, arilo, alifáticos, aromáticos o heterocíclicos (Fig. 1).

Cuando un PO tiene originalmente un fósforo unido por doble enlace a un azufre (como es el caso del grupo de compuestos fosforotiónicos al cual pertenece Diazinon) y luego este azufre es cambiado por un oxígeno, se dice que este nuevo compuesto es el "oxón" del anterior. Así, para el caso de Diazinon su forma oxónica se llamaría Diazoxon (IPCS, 1986).

Existen varios criterios para clasificar a los pesticidas. De acuerdo a su estructura química, los POs se pueden clasificar en diez grupos diferentes, los cuales son descritos en el anexo 1 (IPCS, 1986). Por otro lado, la WHO clasifica a los pesticidas en cuatro grupos de acuerdo a su peligrosidad, la cual depende de los valores de la dosis letal media ( $LD_{50}$ ) determinados en ratas adultas (IPCS, 2005, Anexo 2).

Desde el punto de vista biológico, los POs son inhibidores irreversibles de la enzima acetilcolinesterasa, debido a su habilidad para fosforilar el grupo hidroxilo de la serina ubicada en el sitio activo de la enzima. La fosforilación ocurre por la pérdida del grupo lábil del PO y el establecimiento de un enlace covalente con la acetilcolinesterasa (Aluigi *et al.*, 2005).

La enzima acetilcolinesterasa es la encargada de degradar la acetilcolina en colina y acetato, inhibiendo así la sinapsis colinérgica. Cuando esta enzima resulta inhibida, la acetilcolina se acumula en el espacio pre-sináptico y se une de manera prolongada a los receptores nicotínicos y muscarínicos, tanto a nivel de cerebro, uniones neuromusculares y nervios periféricos, todos componentes del sistema nervioso central, así como también a nivel de los receptores muscarínicos y nicotínicos del sistema nervioso periférico (Sungur y Güven, 2001) y de otros tipos celulares donde se produce una acetilcolina no neuronal, tales como el ovario y la placenta (Cruz *et al.*, 2006; Bhuiyan *et al.*, 2006).

La acetilcolina se une a dos tipos de receptores, los nicotínicos y los muscarínicos. Los receptores nicotínicos son canales iónicos bloqueados por un ligando; su activación generalmente causa el siguiente flujo de iones cargados positivamente, resultando en la despolarización de la membrana. Están formados por cinco sub-unidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  y  $\delta$ ), homólogas o idénticas, arregladas de tal manera que permiten la formación de un canal iónico central. La acetilcolina se une a dos sub-unidades  $\alpha$ , ocasionando a apertura del canal iónico y con ello el ingreso de sodio al interior de la célula. La conformación de los isotipos de los receptores varía de acuerdo al tipo celular donde se encuentren. Los receptores muscarínicos pertenecen a la gran familia de receptores acoplados a la proteína G, de los cuales se han identificado cinco subtipos (desde M1 hasta M5), con ubicaciones diferentes para cada tipo celular. Las proteínas G (compuestas por las sub-unidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) regulan el acoplamiento del receptor muscarínico a su sistema efector celular; así la activación del receptor, causada por la unión de la acetilcolina, resulta en la disociación de la heterotrimérica proteína G en sus sub-unidades  $\alpha$  y  $\beta/\gamma$ , involucradas en la transducción de la señal muscarínica. El tipo de señal depende del tipo de receptor que es activado; por ejemplo, si acetilcolina se une a M1 se produce una despolarización de la membrana postsináptica, mientras que la unión de la acetilcolina a



M2 produce una hiperpolarización de la misma (Racké *et al.*, 2006).

Los efectos de los POs a nivel de sistema nervioso central se evidencian por los siguientes síntomas: irritabilidad, estremecimiento, balbuceo, ataxia, debilidad generalizada y delirio. Los efectos a nivel de receptores muscarínicos periféricos incluyen salivación, lagrimeo, micción involuntaria, diarrea, y emesis (vómitos), mientras que los efectos a nivel de receptores nicotínicos comprenden calambres, debilidad muscular, parálisis y fallas respiratorias (Hatjian *et al.*, 2000).

Se sabe que los organofosforados pueden inducir aberraciones cromosómicas (tanto numéricas como estructurales), incrementar el intercambio de cromátides hermanas e inducir anomalías espermáticas (Bustos-Obregón *et al.*, 1998). Por otro lado también pueden incrementar la frecuencia de micronúcleos en médula ósea (Malhi y Grover, 1986) y de aneuploidias sexuales espermáticas (Recio *et al.*, 2001).

## 3.2 DIAZINON

Diazinon (O,O-dietil O-2-isopropil-6-metilpirimidin-4-il fosforotioato, nombre IUPAC) es el pesticida organofosforado más usado tanto en Estados Unidos (EPA, 2004), la Comunidad Europea (Aluigi *et al.*, 2005) y en algunos países de América Latina, como México (Piña-Guzmán *et al.* 2005). De acuerdo a su estructura química (Figura 2), Diazinon es un organotiofosfato pirimidínico heterocíclico y pertenece al grupo de los pesticidas fosforotiónicos (IPSC, 1986; Anexo 1). Según la clasificación de la WHO este pesticida pertenece a la clase II que corresponde a los pesticidas moderadamente peligrosos (Anexo 2). Está registrado para una gran variedad de usos tanto en cultivos terrestres como acuáticos, así como también para uso veterinario (EPA, 2000).

### 3.2.1 Propiedades Químicas y Físicas

Al 90% de pureza, Diazinon es un líquido denso, de color ligeramente amarillo, con olor penetrante (como a un éster) e insoluble en agua (EPA, 2000). Las presentaciones comerciales tienen diferentes características dependiendo de la concentración de Diazinon que contengan. Es soluble en la mayoría de solventes orgánicos, como alcoholes, éteres, benceno y ciclohexano; su punto de ebullición es inferior al del agua (Tabla 1), es ligeramente volátil y su temperatura de descomposición sobrepasa los 120°C (WHO, 1998).

El análisis de la estructura química de Diazinon ha mostrado la presencia de enlaces polares como el enlace entre P=S; sin embargo, debido a la presencia del anillo pirimidínico con su radical alquilo, la molécula es relativamente hidrofóbica. Esto se refleja en su baja solubilidad en agua (40 mg/L) y en los valores relativamente altos del coeficiente de partición en agua-octanol (Kow), del coeficiente de partición de la materia de carbón (Koc) y en el coeficiente de absorción (Kd). Ver Tabla 1.

Este pesticida se degrada fácilmente por hidrólisis a diferentes valores de pH; su

hidrólisis es rápida en condiciones ácidas, con una vida media de 12 días a pH 5. Bajo condiciones neutrales y alcalinas, Diazinon se hidroliza lentamente, con una vida media de 138 días a pH 7 y 77 días a pH 9 (EPA, 2004).

### 3.2.2 Usos, Aplicaciones y Comercialización

---

Diazinon es un pesticida de contacto que actúa sobre una amplia gama de insectos, siendo eficaz contra formas juveniles y adultas de insectos voladores y rastreros, de ácaros y de arañas. Utilizado a partir de comienzos de los años 50, la WHO (1998) reportó que entre 1987 a 1997 el uso doméstico anual total del Diazinon fue de aproximadamente 6 millones de kilogramos de ingrediente activo.

Según la EPA (2000), Diazinon está registrado y autorizado para ser usado en una gran variedad de alimentos tanto para consumo humano como para consumo del ganado y además como antiparasitario para uso ganadero (aerosoles para ovejas y etiquetas para marcar el ganado). Diazinon también tiene aplicaciones veterinarias como en collares antipulgas de animales domésticos. Desde agosto de 1986 la EPA prohibió el uso de Diazinon en alimentos cultivados en invernaderos, debido a que presentaban un alto contenido de residuos del pesticida.

El SENASA, ente regulador de la comercialización de los pesticidas en el Perú, tiene registradas nueve marcas comerciales de este pesticida con autorización para la venta al público, tanto para uso ganadero como para uso agrícola.

Comercialmente, está disponible en polvo, gránulos, polvos hidrosolubles y concentrados emulsivos en solución. Está también disponible en formulaciones mixtas, mezclado con otros insecticidas.

### 3.2.3 Niveles Medioambientales

---

La WHO (1998) clasifica a Diazinon como un pesticida moderadamente peligroso para el medio ambiente, debido a que sus niveles de prevalencia son generalmente bajos. Aparentemente, esto se debe a que es degradado por hidrólisis, por fotólisis, por metabolismo microbiano y a que se disipa por volatilización de superficies impermeables (EPA, 2004).

Los residuos de Diazinon en frutas y productos animales también son muy bajos. Los resultados de estudios experimentales sugieren que esto se debe a que Diazinon es catalizado rápidamente por estos organismos después de ser expuestos.

Diazinon no ha sido detectado en muestras de agua potable y sus concentraciones en el agua superficial están en el nivel de nanogramos/Litro (ng/L). Los niveles de Diazinon registrados en el suelo son variables y su tiempo de vida media es menor que en el agua debido a los procesos de descomposición que ocurren en él (EPA, 2004).

### 3.2.4 Farmacocinética y Farmacodinámica

---

Al igual que los demás pesticidas organofosforados, Diazinon es un inhibidor irreversible de la enzima acetilcolinesterasa en el tejido nervioso, lo cual resulta en la acumulación del neurotransmisor acetilcolina en las uniones neuronales, produciéndose una estimulación colinérgica excesiva y una neurotoxicidad asociada (Poet *et al.*, 2004). Cuando la dosis es lo suficientemente elevada puede ocasionar la muerte por insuficiencia respiratoria, debido a que el incremento local de acetilcolina bloquea la transmisión neuromuscular y en consecuencia se produce un paro respiratorio que conlleva a la muerte (Bustos-Obregón *et al.*, 1998).

Diazinon puede ser absorbido desde el tracto gastrointestinal, a través de la piel y por inhalación. La absorción transdermal en humanos es baja. Diazinon y sus metabolitos no se acumulan en el tejido corporal, entre el 59 al 95% de una dosis oral de Diazinon es excretada en 24 horas y lo restante es excretado en los 7 días siguientes, principalmente en la orina (WHO, 1998).

Este pesticida ingresa al organismo bajo la forma de tiofosfato y luego es biotransformado a su forma oxónica llamada Diazoxon, la cual puede llegar a ser hasta 100 veces más tóxica (Sams *et al.*, 2004). La biotransformación ocurre en el hígado y es catalizada por la enzima citocromo P450, la cual también cataliza el proceso de transformación de Diazinon a 2-isopropil-4-metil-6-hidroxi pirimidina (IMHP) y dietiltiofosfato (Kappers *et al.*, 2001; Timchalk *et al.*, 2005). Ver Figura 3.

Las principales vías metabólicas de degradación para Diazinon, según la WHO (1998), son las siguientes:

- Hidrólisis del enlace éster, permitiendo la formación de los derivados del anillo hidroxipirimidínico.

- Transformación del enlace P=S, para permitir la formación de derivados de P=O.

- Oxidación de los sustituyentes isopropílicos, permitiendo la formación de los correspondientes alcoholes terciarios y primarios.

- Oxidación de los sustituyentes metilos, permitiendo la formación del correspondiente alcohol.

- Hidrólisis mediado por glutatión del enlace éster, permitiendo la formación del respectivo glutatión conjugado.

Diazoxón es adicionalmente transformado por las esterasas A (hepática) y B (extrahepática) que lo convierten también en IMHP y dietiltiofosfato, los cuales finalmente son eliminados del organismo vía el aparato excretor (Timchalk *et al.*, 2005). El metabolismo extrahepático de Diazinon, especialmente por la hidrólisis de Diazoxón en el plasma, es más importante, desde el punto de vista toxicológico, que el metabolismo hepático (WHO, 1998).

Se conocen tres tipos de esterasas: A, B y C. Las esterasas tipo A no son inactivadas por los pesticidas organofosforados y son las responsables de la detoxificación de Diazoxón. Las esterasas tipo B, como la carboxilesterasa, la butirilcolinesterasa y la acetilcolinesterasa se unen a Diazoxón y son inactivadas. Las esterasas tipo C no interactúan con los organofosforados. Las esterasas se encuentran distribuidas en varios tejidos del cuerpo y ello contribuye en la detoxificación de Diazoxón

(Kappers *et al.*, 2001).

### 3.2.5 Efectos Reproductivos Masculinos

---

A nivel del sistema reproductor masculino, El-Azíz *et al.* (1994) reporta que Diazinon disminuye el peso de las gónadas, reduce la motilidad y viabilidad espermática, e incrementa las anormalidades en la morfología espermática en ratas.

Diazinon también es capaz de fosforilar las protaminas en sus residuos de cisteína, lo cual altera la estructura de la cromatina de los espermatozoides (Piña-Guzmán *et al.*, 2005). La estructura de la cromatina espermática es completamente reorganizada durante los estadios tardíos de la espermatogénesis; es allí donde las histonas son reemplazadas por protaminas, cuyos residuos ricos en cisteína se unen al DNA para neutralizar su carga negativa. Inmediatamente después de su síntesis, las protaminas son fosforiladas facilitando su correcta unión al DNA; pero una vez formado el complejo DNA-protamina, las protaminas son defosforiladas antes que el espermatozoide llegue al epidídimo (Brewer *et al.*, 2002). En consecuencia, la fosforilación y defosforilación de las protaminas es requerida para una apropiada condensación de la cromatina.

Las alteraciones en la estructura de la cromatina e integridad del DNA podrían tener implicaciones en la fertilidad masculina y podrían ejercer un efecto desfavorable en la descendencia si un espermatozoide dañado llega a fecundar un ovocito (Evenson *et al.*, 1999; Sánchez-Peña *et al.*, 2004).

Otros organofosforados han sido analizados más profundamente en cuanto a su reprotoxicidad. Quinalfos, que tiene la misma clasificación que Diazinon (ver Anexos 1 y 2) y del cuál se sabe que afecta el eje hipotálamo-pituitario-gonadal, es capaz de alterar la masa de testículos, vesícula seminal, próstata, hipotálamo y pituitaria, incrementar las concentraciones en suero de las gonadotropinas y testosterona e inhibir la actividad de la acetilcolinesterasa en hipotálamo, pituitaria y testículos (Sarkar *et al.*, 2000).

Metamidofos es otro pesticida organofosforado que al ser aplicado durante 6 semanas a ratones machos adultos, los cuales son posteriormente apareados con una hembra no tratada, ocasiona la disminución de la tasa de fecundación, de la tasa de clivaje e incrementa el número de embriones preimplantacionales degenerados (Burrueal *et al.*, 2000). Paration, que es más tóxico que Diazinon, es capaz de disminuir la concentración espermática, alterar la morfología y estabilidad de la cromatina en espermatozoides e inducir apoptosis en células germinales de ratón (Sobarzo y Bustos-Obregón, 2000; Bustos-Obregón *et al.*, 2001). Finalmente, Metil Paration es capaz de alterar la maduración epididimal de los espermatozoides y la integridad del DNA de las células de la línea germinal masculina gracias a mecanismos posiblemente asociados al estrés oxidativo (Narayana *et al.*, 2005; Piña-Guzmán *et al.*, 2006).

### 3.2.6 Efectos Reproductivos Femeninos

---

En general, los químicos medioambientales como los pesticidas pueden alterar la reproducción femenina a través de mecanismos directos o indirectos. El efecto directo

ocurre usualmente si el químico medioambiental es estructuralmente similar a una molécula endógena y es capaz de entrar en los órganos reproductivos, lo cual puede alterar ciertos procesos celulares como la diferenciación, la mitosis, la meiosis, la muerte celular programada, la migración, la comunicación intracelular, la reparación del DNA o la función mitocondrial. El efecto indirecto ocurre si uno de estos químicos requiere de la conversión metabólica dentro del cuerpo, antes de que sea capaz de ejercer su efecto tóxico (como en el caso de Diazinon), o si llega a interferir con las hormonas endógenas (McLachlan y Arnold, 1996).

No se tienen reportes que detallen los efectos de Diazinon sobre el aparato reproductor femenino de mamíferos, pero se sabe que otros organofosforados como Paration, Malation o Clorpirifos pueden inhibir el crecimiento de los folículos ováricos, inducir la ovulación prematura, disminuir los niveles de LH y progesterona o causar anomalías en el desarrollo de los ovocitos (Sharara *et al.*, 1998).

En estudios epidemiológicos realizados en humanos, se ha llegado a determinar que ciertos organofosforados pueden alterar niveles hormonales, afectar los ovarios e incluso alterar el flujo o la duración del ciclo menstrual (Farr *et al.*, 2004). Así mismo, se ha encontrado una relación directa entre la disminución del tiempo de embarazo y la exposición de algunos organofosforados durante la etapa gestacional (Ezkenazi *et al.*, 2004).

Otros trabajos realizados en animales de experimentación han demostrado los efectos degenerativos de Metil Paration sobre los órganos reproductivos tanto femeninos como masculinos (Edwards y Tchounwou, 2005). Sortur y Kaliwal (1999) reportan que Metil Paration altera la duración del ciclo estral y disminuye el número de crías vivas tras 15 días de tratamiento en ratas. Estudios sobre las placentas de ratas tratadas prenatalmente demuestran que Metil Paration afecta las células gigantes del trofoblasto, las cuales se ven morfológicamente normales pero presentan abundantes vacuolas fagosómicas en su citoplasma; también se encontró la presencia de fibrosis y de hemorragia en la decidua uterina, así como células deciduales con núcleos picnóticos y citoplasma acidófilo (Levario-Carrillo *et al.*, 2004). Se han reportado además efectos teratogénicos en embriones de pollo expuestos a este pesticida (Kumar y Devi, 1992).

### 3.3 DESARROLLO EMBRIONARIO PREIMPLANTACIONAL

El desarrollo embrionario preimplantacional abarca desde el estadio de huevo fecundado hasta el estadio de blastocisto expandido en todas las especies de mamíferos (Hogan *et al.*, 1994). Ver Figura 8 y Foto 7. Al término del periodo preimplantacional, el blastocisto expandido sale de la zona pelúcida (eclosión o *hatching*) y se implanta en el endometrio uterino, donde luego se transformará en gástrula y continuará con su desarrollo.

En el ratón, el periodo preimplantacional tiene una duración aproximada de 108 horas. Al término de este tiempo todos los embriones deben estar en el estadio de

blastocisto o blastocisto expandido, dentro de los cuernos uterinos (Hogan *et al.*, 1994).

Las alteraciones en su desarrollo, causadas por xenobióticos como los pesticidas, se evidencian cuando la morfología es anormal, cuando el estadio de desarrollo es inferior al que se espera o cuando el número celular se ve disminuido (Alm *et al.*, 1996). El transporte embrionario también puede ser alterado y esto se evidencia cuando al cuarto día de gestación, los embriones, en lugar de encontrarse en los cuernos uterinos, aún permanecen en los oviductos.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 MATERIALES

#### 4.1.1 Material Biológico

---

Se emplearon ratones (*Mus musculus*) albinos de la cepa Swiss Rockefeller. Individuos machos de 10 a 12 semanas de edad y de fertilidad probada y hembras vírgenes de 6 a 8 semanas de edad fueron mantenidos bajo condiciones estándar de bioterio, las cuales comprenden un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 de oscuridad, temperatura promedio de 23°C y alimentación con comida balanceada en pellets (Nutri Vial, Perú) y agua *ad libitum*.

#### 4.1.2 Material de Laboratorio

---

a.Reactivos:

- Pesticida Diazinon al 60% de la marca comercial Neogan D-60
- Buffer fosfato salino (PBS)

- Citrato de Sodio (Matheson Coleman & Bell)
- Metanol absoluto (J. T. Baker)
- Ácido acético glacial (J. T. Baker)
- Colorante Giemsa (SIGMA)
- Agua destilada
- Aceite de maíz
- Alcohol de 70°
- b.Equipos:
  - Microscopio de contraste de fase Carl Zeiss Jena
  - Microscopio estereoscópico Bausch & Lomb
  - Potenciómetro digital Oakton
  - Cámara fotográfica digital Canon S-50
  - Balanza analítica Sartorius
  - Plancha termoregurable Chicago Surgical and Electrical Co.
  - Micropipetas de 10 a 100  $\mu$ L
- c.Otros:
  - Pinzas de acero punta fina
  - Tijeras
  - Placas embriológicas de vidrio
  - Láminas excavadas
  - Aguja hipodérmica 30G
  - Pipetas Pasteur
  - Láminas de vidrio
  - Beakers
  - Mechero de alcohol
  - Filtro de 0.22  $\mu$
  - Parafilm (American Can Company)
  - Alimento balanceado con 18% de proteínas (Nutri Vial)
  - Tips

## 4.2 MÉTODOS



### 4.2.1 Tratamiento Paterno

---

Los ratones machos fueron repartidos al azar en cuatro grupos de 10 individuos cada uno. Tres grupos fueron inyectados intraperitonealmente por 5 días consecutivos con 5,25, 10,5 y 21 mg de Diazinon/Kg de peso corporal, disuelto en 100  $\mu$ L de aceite de maíz. El cuarto grupo, denominado grupo control, fue tratado solamente con el vehículo (aceite de maíz, 100  $\mu$ L). Luego de terminado el tratamiento, cada macho tratado fue aislado y apareado semanalmente con una hembra virgen no tratada, por un periodo de 6 semanas para cubrir todo el ciclo espermatogénico, que en el ratón es de 35 días (Ehling *et al.*, 1978; Piña-Guzman *et al.*, 2005) (Figura 4). La cópula fue verificada por la presencia del tapón vaginal (Foto 1) en cada una de las ratonas. Todas las ratonas con tapón fueron separadas de los machos y reservadas hasta el momento de la evaluación.

### 4.2.2 Tratamiento Materno

---

Se trabajó con cuatro grupos de 10 ratonas que recibieron las mismas dosis de tratamiento que los ratones machos, durante el mismo tiempo. El tratamiento fue iniciado en la etapa de proestro del ciclo estral, para que al día siguiente de terminado el tratamiento, las ratonas se encontraran en el estadio de estro y así pudieran ser apareadas con machos no tratados y de fertilidad probada.

El ciclo estral en las ratonas comprende cuatro etapas que son identificadas fácilmente por la observación de la morfología vaginal (Hogan *et al.*, 1994). Estas etapas y sus respectivas características se detallan a continuación:

- Diestro: La abertura de la vagina es pequeña; el tejido se ve ligeramente azulado y muy húmedo (Foto 2A).

- Proestro: La vagina tiene una abertura grande; el tejido tiene humedad y una coloración entre rosada y rojiza; además se pueden observar estriaciones tanto en el labio dorsal como ventral (Foto 2B).

- Estro: Las características de la vagina son similares a las del proestro pero el tejido tiene poca humedad y un color rosado pálido; además las estriaciones son menos pronunciadas ya que los labios se tornan más turgentes (Foto 2C).

- Metaestro: La vagina se observa completamente pálida, los labios pierden turgencia y en algunos casos se puede observar la presencia de restos de tejido en las paredes internas y alrededores de la vagina (Foto 2D).

Al igual que en el tratamiento anterior, luego de verificada la cópula por la presencia del tapón vaginal, las ratonas fueron separadas de los machos y reservadas hasta el momento de la evaluación.

### 4.2.3 Obtención de Embriones

---

Tras 96 horas post cópula (cuarto día de preñez), las ratonas de ambos tratamientos

fueron sacrificadas por dislocación cervical. Luego de realizar un corte transversal en el abdomen de cada ratona (Figura 5), se procedió a extraer los ovarios, oviductos y cuernos uterinos (Figura 6 y 7). Los ovarios fueron empleados para el recuento de cuerpos lúteos, los cuales pueden ser reconocidos, con la ayuda de un estereoscopio, por su forma esférica y su color sanguinolento (Foto 3). Los oviductos y los cuernos uterinos fueron perfusionados por separado (Fotos 4 y 5) con PBS y la ayuda de una jeringa hipodérmica con aguja 30G, para así lograr la expulsión de los embriones contenidos en ambos órganos. Los embriones fueron recuperados con una pipeta Pasteur adelgazada al calor del mechero, unida a una manguera de jebe que en el extremo opuesto tenía un filtro de 0,22µm (Foto 6), y colocados en láminas excavadas para su observación bajo el microscopio.

#### 4.2.4 Determinación del Estadio de Desarrollo Embrionario

---

A las 96 horas post cópula, los embriones deben estar en los cuernos uterinos y, a su vez, estar en los estadios de blastocisto inicial, blastocisto o blastocisto expandido (Hogan *et al.*, 1994). La presencia de embriones en los oviductos o en estadios anteriores (mórula compactada, mórula no compactada, 16 células, 8 células, 4 células, 2 células, ovocito fecundado y ovocito no fecundado) es evidencia de retraso en el transporte y desarrollo normal de los embriones como consecuencia del tratamiento. Por ello se realizó el recuento de los embriones encontrados en oviducto y en estadios anteriores a los de blastocisto inicial. Ver Foto 7.

#### 4.2.5 Gradación de Embriones

---

Para determinar si la morfología se vio afectada por el tratamiento, se empleó un microscopio de contraste de fase y el sistema de gradación de embriones descrito por Dawson (1995). Este método clasifica a los embriones en cuatro categorías diferentes, las cuales se detallan a continuación:

- Grado I: Blastómeros homogéneos, simétricos y sin fragmentación (Foto 8A).
- Grado II: Todos los blastómeros intactos, pero con la presencia de algunos fragmentos de citoplasma y/o diferencias en el tamaño de los blastómeros (Foto 8B).
- Grado III: Blastómeros asimétricos y por lo menos uno de ellos está completamente fragmentado (Foto 8C).
- Grado IV: Blastómeros asimétricos y fragmentación superior al 30 % en los blastómeros (Foto 8D).

#### 4.2.6 Determinación del Número Celular e Índice Mitótico

---

Para realizar el recuento del número de células, y así poder determinar el índice mitótico (IM), se empleó la técnica de Tarkowski (1966), que permite observar los núcleos de las células tanto en interfase como en mitosis. Para la aplicación de esta técnica, los

embriones obtenidos fueron colocados en una solución de citrato de sodio al 1% por 15 minutos; luego cada embrión fue colocado en una lámina porta objeto y fijado con solución Carnoy (3:1 de metanol y ácido acético glacial). Las láminas se dejaron secar a temperatura ambiente, y una vez secas fueron coloreadas con la solución colorante Giemsa al 2%. Con la ayuda del microscopio se realizó el recuento del total de núcleos coloreados, que son equivalentes al número de células por embrión (Foto 9). El recuento de núcleos en mitosis fue realizado para determinar el índice mitótico (IM), que fue calculado con la siguiente fórmula:

$$IM = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de núcleos en mitosis}}{\text{Total de núcleos observados}}$$

#### 4.2.7 Análisis Estadístico

---

Se calcularon los valores de las medias aritméticas y de los errores estándar para los diferentes parámetros con el programa estadístico SPSS versión 11.0 (SPSS Inc., USA). Empleando el paquete estadístico GraphPad Prism versión 4 (GraphPad Software Inc., USA), la normalidad de los resultados obtenidos se determinó mediante el test de Kolmogorov-Smirnoff, mientras que las diferencias entre los grupos de tratamiento se establecieron mediante el Análisis de Varianza ANOVA y los tests *post hoc* de Dunnet y Tukey (para datos paramétricos) o mediante las pruebas de Kruskal-Wallis y *t* de Student (para datos no paramétricos). Para determinar la relación dosis-efecto del pesticida se empleó la prueba de regresión lineal usando también el paquete estadístico GraphPad Prism. El valor de *p* inferior o igual a 0,05 ( $p \leq 0,05$ ) fue considerado como significativo.



## 5. RESULTADOS

### 5.1 TRATAMIENTO PATERNO

#### 5.1.1 Fecundidad y Total de Embriones

---

El número de hembras fecundadas y el promedio de embriones producidos por cada macho tratado son dos parámetros que nos permiten determinar cuán afectada puede verse la fertilidad masculina como consecuencia del tratamiento. Los valores para ambas variables se detallan en la Tabla 2. El número de ratonas preñadas (Gráfico 1) se vio disminuido en todos los grupos de tratamiento, pero sólo en el grupo de la dosis de 10,5 mg/kg de peso corporal ( $5,2 \pm 0,65$ ) fue significativamente diferente del grupo control ( $9,2 \pm 0,40$ ). Para el total de embriones, como se observa en el Gráfico 2, sólo se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la semana 1 para la dosis de 10,5 mg/kg de peso corporal de Diazinon ( $8,2 \pm 0,40$ ) versus el respectivo control ( $10,1 \pm 0,60$ ) y en la semana 5 para las dosis de 10,5 mg/kg ( $9,5 \pm 0,65$ ) y de 21 mg/kg ( $9,2 \pm 0,66$ ) versus el control ( $11,8 \pm 0,49$ ).

Se calculó la diferencia entre el promedio total de embriones y el promedio de cuerpos lúteos encontrados en ambos ovarios (Tabla 2 y Gráfico 3), ya que con ello

podemos determinar si el total de embriones obtenidos coincide con el total de ovocitos ovulados. Al comparar los promedios de las diferencias para las seis semanas de evaluación, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ ) en la semana 1 para las dosis de 5,25 y 10,5 mg/kg ( $2,5 \pm 0,54$  y  $3,0 \pm 0,82$ , respectivamente) versus el grupo control ( $0,1 \pm 0,10$ ), en la semana 2 para la dosis de 21 mg/kg ( $1,8 \pm 0,60$ ) versus el respectivo control ( $0,2 \pm 0,20$ ), en la semana 4 para las dosis de 10,5 y 21 mg/kg ( $2,2 \pm 0,66$  y  $1,9 \pm 0,55$ , respectivamente) versus el grupo control ( $0,3 \pm 0,16$ ) y, finalmente, en la semana 5 para la dosis de 21 mg/kg ( $3,0 \pm 0,55$ ) versus el grupo control (0.0).

### 5.1.2 Desarrollo embrionario

---

El recuento de los embriones encontrados en los diferentes estadios del desarrollo preimplantacional (Tablas 2 y 3 y Gráficos 5 y 6) fue realizado para determinar cuán afectado podría verse el desarrollo embrionario con el tratamiento paterno. Con la finalidad de facilitar el análisis estadístico, los embriones fueron agrupados en dos categorías: en la primera se incluyeron a todos los embriones en los tres subestadios de blastocisto (inicial, intermedio y expandido), y en la segunda se incluyeron a todos los demás embriones en estadios previos (mórula compactada, mórula no compactada, 16 células, 8 células, 4 células, 2 células, ovocito fecundado y ovocito no fecundado). En el análisis del promedio del número de blastocistos por hembra no tratada apareada con los machos de los cuatro grupos de tratamiento a lo largo de las seis semanas de evaluación se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) solamente en la primera semana de evaluación, para las dosis de 10,5 y 21 mg/kg ( $4,8 \pm 1,35$  y  $5,6 \pm 1,74$ , respectivamente) versus el respectivo control ( $9,5 \pm 0,60$ ). En lo que respecta a los promedios de embriones en estadios de pre-blastocisto por cada hembra sin tratamiento, no se encontraron diferencias significativas a lo largo de las seis semanas de evaluación.

### 5.1.3 Morfología embrionaria

---

La determinación de la calidad embrionaria por medio del análisis de la morfología nos permite establecer de forma directa los efectos tóxicos causados por el tratamiento. Los embriones obtenidos fueron clasificados y agrupados en cuatro categorías, según los criterios detallados en la sección de Materiales y Métodos. En la categoría de grado 1 (Tabla 3 y Gráfico 7), se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ ) durante las semanas 1, 2, 3, 5 y 6. Detallando los valores para cada semana tenemos que en la semana 1 las dosis de 5,25 ( $5,8 \pm 0,77$ ), 10,5 ( $4,7 \pm 1,23$ ) y 21 ( $2,3 \pm 1,39$ ) mg/kg, fueron significativamente diferentes del grupo control ( $9,3 \pm 0,76$ ), en la semana 2 las diferencias fueron entre la dosis de 21 mg/kg ( $3,4 \pm 1,12$ ) versus el respectivo grupo control ( $8,0 \pm 0,97$ ), en la semana 3 entre la dosis 21 mg/kg ( $3,6 \pm 0,93$ ) versus el grupo control ( $8,2 \pm 1,55$ ), en la semana 5 entre las dosis de 10,5 ( $5,8 \pm 1,31$ ) y 21 mg/kg ( $4,4 \pm 1,36$ ) versus el respectivo grupo control ( $10,5 \pm 0,95$ ) y durante la semana 6 entre la dosis de 21 mg/kg ( $3,8 \pm 1,43$ ) versus el grupo control ( $10,4 \pm 1,28$ ). En la categoría grado 2 (Gráfico 8) sólo se obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0,01$ ), durante la semana 5, para la dosis de 21 mg/kg ( $3,4 \pm 0,93$ ) versus el control ( $0,4 \pm 0,22$ ). Para la categoría grado 3 (Gráfico 9),

las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre la dosis de 21 mg/kg ( $3,1 \pm 1,06$ ) y el grupo control ( $0,7 \pm 0,37$ ) se presentaron durante la semana 3. Finalmente, en la categoría grado 4 (Gráfico 10), sólo la dosis de 21 mg/kg ( $2,4 \pm 1,07$ ) fue diferente del grupo control ( $0,5 \pm 0,27$ ), durante la primera semana.

En el grupo de embriones degenerados se encontró un tipo de morfología que no correspondía a ninguno de las categorías antes mencionadas. Los embriones se caracterizaron por presentar más de un blastocelo en el estadio de blastocisto y provenían de ratonas fecundadas durante la primera semana de evaluación del tratamiento paterno. En total 4 (13,8%) de los 29 embriones degenerados presentaron esta anomalía. Se encontró un embrión para cada una de las dosis de 5,25 y 21 mg/kg y dos embriones para la dosis de 10,5 mg/kg. Las cuatro ratonas que presentaron este tipo de embriones representan el 2,4% de las 173 ratonas evaluadas para el tratamiento paterno.

#### 5.1.4 Transporte embrionario

El transporte embrionario está regulado por cambios en ciertas hormonas y puede verse afectado por el tratamiento con agentes externos como los pesticidas. Los resultados mostraron que sólo 3 (1,7%) del total de ratonas evaluadas presentaron retraso en el transporte de embriones; por ello, estos datos no fueron considerados para el análisis estadístico. De las 3 ratonas con retraso, una pertenecía al grupo de 5,25 mg/kg en la semana 6 y las dos restantes eran del grupo de 21 mg/kg en las semanas 1 y 3, respectivamente.

#### 5.1.5 Proliferación celular embrionaria

La proliferación celular es otro parámetro relacionado con la calidad embrionaria; puede ser medida por recuento del número de células por embrión y comparando los valores del índice mitótico. El análisis del número celular fue realizado a partir del promedio de células por embrión en estadios de blastocisto inicial, intermedio y expandido para los cuatro grupos de tratamiento (Tabla 4).

En el grupo de blastocistos expandidos se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ ) durante la semana 1 (Gráfico 11) para la dosis de 21 mg/kg ( $48,2 \pm 2,41$ ) versus el grupo control ( $59,9 \pm 1,19$ ) y en la semana 4 (Gráfico 14) para la dosis de 10,5 mg/kg ( $66,3 \pm 3,97$ ) versus el grupo control ( $55,3 \pm 2,20$ ). Los embriones en blastocisto intermedio presentaron diferencias significativas sólo en la semana 5 (Gráfico 15) para la dosis de 10,5 mg/kg ( $36,2 \pm 2,33$ ) versus el grupo control ( $46,5 \pm 1,90$ ). El grupo de embriones en blastocisto inicial no presentó diferencias significativas.

Los valores del índice mitótico (Tabla 5) muestran diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en los estadios de blastocisto inicial, para la dosis de 10,5 durante la semana 4 ( $0,018 \pm 0,007$ ) versus el grupo control (0,0) y de blastocisto intermedio para las dosis de 10,5 mg/kg durante la semana 6 ( $0,016 \pm 0,011$ ) versus el grupo control (0,0) y de 21 mg/kg durante la semana 2 ( $0,002 \pm 0,002$ ) versus el grupo control ( $0,032 \pm 0,011$ ). El

estadio de blastocisto expandido no presentó diferencias significativas.

### 5.1.6 Efecto sobre la Espermatogénesis

---

Analizados todos los parámetros ya mencionados, se quiso determinar cuál etapa de la espermatogénesis sería la más sensible al tratamiento. Para ello se compararon las medias aritméticas de los datos obtenidos a lo largo de las seis semanas de evaluación dentro de cada grupo de tratamiento, a diferencia de los resultados anteriores donde las comparaciones fueron hechas semana por semana entre los grupos que recibieron dosis de pesticida versus el control.

Comparando los valores de los promedios del total de embriones (Gráfico 17), se encontraron diferencias significativas en el grupo control para las semanas 3 ( $10,4 \pm 0,63$ ) y 4 ( $10,0 \pm 0,63$ ) versus la semana 6 ( $13,3 \pm 0,59$ ). Para los valores de los promedios de cuerpos lúteos (Gráfico 18), también se encontraron diferencias significativas solamente en el grupo control durante las semanas 1 ( $11,2 \pm 0,65$ ), 2 ( $11,1 \pm 0,48$ ) y 4 ( $10,3 \pm 0,65$ ) versus la semana 6 ( $13,6 \pm 0,65$ ). En cuanto al promedio del total de embriones en blastocisto (Gráfico 19) o en pre-blastocisto (Gráfico 20) y del total de embriones en las cuatro categorías morfológicas (Gráfico 21) no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los grupos y en ninguna de las seis semanas del tratamiento. En el promedio de células por embrión (Gráfico 22), se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ ) sólo en la dosis de 10,5 mg/kg entre la semana 5 versus las semanas 3 y 4 para blastocisto intermedio y entre la semana 4 versus la semanas 5 y 6 para blastocisto expandido.

### 5.1.7 Relación Dosis - Efecto

---

Se elaboró la prueba de regresión lineal para determinar si el efecto producido por el pesticida guardaba alguna relación con el incremento de la dosis. Se encontró que el promedio del total de embriones (Gráfico 23) por ratona no tratada tiende a disminuir sólo en la semana 5 [ $Y = (-0,1219 \pm 0,03744)X + (11,42 \pm 0,4503)$ ,  $r^2 = 0,84$ ]. El total de embriones en blastocisto (Gráfico 24) tiende a disminuir a medida que la dosis se incrementa durante todas las semanas, pero no se encontraron diferencias significativas. Por el contrario, el promedio del total de embriones retrasados en estadios de pre-blastocistos (Gráfico 25) tiende a aumentar en casi todas las semanas con excepción de la semana 5, pero sólo en la semana 3 fue significativamente diferente ( $p < 0,01$ ).

En el análisis de la morfología se encontró que para la categoría grado 1 (Gráfico 26) el promedio de embriones disminuye a medida que la dosis se incrementa durante todas las semanas, pero fue significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) sólo en las semanas 1, 2, 4 y 6. En la categoría grado 2 (Gráfico 27), el promedio de embriones tiende a aumentar a medida que la dosis aumenta sólo en la semana 5. Para la categoría grado 3 (Gráfico 28) no se encontraron diferencias significativas. Finalmente, para la categoría grado 4 (Gráfico 29) se observó que el promedio de embriones aumentó sólo en las semanas 4 y 6. En relación al número celular, sólo se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para el número de células por embrión en blastocisto inicial (Gráfico 30) durante la



---

semana 3. Para el número de células por embrión en blastocisto intermedio (Gráfico 31) o blastocisto expandido (Gráfico 32) no se encontraron diferencias significativas.

## 5.2 TRATAMIENTO MATERNO

### 5.2.1 Total de Embriones

---

En el tratamiento materno no se encontraron diferencias significativas para los promedios del total de embriones (Gráfico 33 y Tabla 6) y del total de cuerpos lúteos (Gráfico 34 y Tabla 6) para los tres grupos tratados con Diazinon versus el grupo control. Analizando las diferencias encontradas entre el total de cuerpos lúteos y el total de embriones, tampoco se encontraron diferencias significativas entre todos los grupos de tratamiento.

### 5.2.2 Desarrollo embrionario

---

Los embriones encontrados fueron clasificados de acuerdo a su estadio de desarrollo y agrupados en las categorías de blastocisto y de pre-blastocisto. En el análisis del promedio del número total de blastocistos por hembra tratada (Gráfico 35 y Tabla 6) no se encontraron diferencias significativas. En los valores promedios para los embriones en estadios de pre-blastocisto (Gráfico 36 y Tabla 6) sólo se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre el grupo que recibió la dosis de 5,25 mg/kg ( $5,5 \pm 1,40$ ) versus el grupo control ( $1,9 \pm 0,43$ ).

### 5.2.3 Morfología embrionaria

---

Para el análisis de la morfología embrionaria (Gráfico 37 y Tabla 7), los embriones fueron agrupados en cuatro categorías, de las cuales sólo presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) las categorías grado 3 para la dosis de 21 mg/kg ( $2,5 \pm 0,54$ ) versus el grupo control ( $0,6 \pm 0,22$ ) y grado 4 para la dosis de 5,25 mg/kg ( $2,3 \pm 0,70$ ) versus el respectivo grupo control ( $0,4 \pm 0,27$ ).

En el tratamiento materno también se encontraron embriones con más de un blastocele, pero en mayor cantidad que en el tratamiento paterno; así se encontraron 1, 1 y 6 embriones de este tipo para las dosis de 5,25, 10,5 y 21 mg/kg, respectivamente. Estos embriones representan el 17,8% de un total de 45 embriones degenerados y fueron recuperados a partir de 7 ratonas que equivalen al 18,4% de un total de 38 ratonas evaluadas para el tratamiento materno.

### 5.2.4 Transporte embrionario

---

Los resultados mostraron que de las 38 ratonas evaluadas en total, ninguna tuvo retraso

en el transporte embrionario.

### **5.2.5 Proliferación celular embrionaria**

---

La proliferación celular de los embriones no se vio afectada por el tratamiento ya que no se encontraron diferencias significativas ni en el número de células por embrión (Gráfico 38 y Tabla 8) ni en los valores del índice mitótico (Gráfico 39 y Tabla 9), para los tres estadios de blastocisto evaluados, en ninguno de los tres grupos tratados con el pesticida Diazinon.

### **5.2.6 Relación Dosis - Efecto**

---

La relación dosis-respuesta fue significativa en los valores promedio para el total de embriones en morfología de grado 2 ( $r^2 = 0,92$ ) y en los valores promedio del número de células por embrión en blastocisto expandido ( $r^2 = 0,97$ ).

## 6. DISCUSIÓN

La genotoxicidad mediada por el factor masculino sobre la descendencia ya ha sido demostrada en numerosos compuestos en los que se incluyen a los contaminantes medioambientales como los pesticidas y, dentro de ellos, a los organofosforados (Burrueel *et al.*, 2000; Toppari *et al.*, 1996). Una manera eficiente y rápida de evaluar o medir dichos efectos está dada por el análisis de los embriones preimplantacionales producidos por los gametos masculinos expuestos a un agente genotóxico (Holland *et al.* 1999).

Los resultados obtenidos en la presente tesis para el tratamiento paterno concuerdan con los datos reportados por Piña-Guzmán *et al.* (2005), quienes, tras evaluar dos grupos de ratones 8 y 15 días post tratamiento con una dosis única de 8,125 mg/kg de Diazinon, encontraron que la movilidad, viabilidad y morfología normal de los espermatozoides disminuía, pero sólo en la evaluación de 8 días, tiempo en el cuál se analiza la acción del pesticida sobre los estadios espermatogénicos de espermatozoide y espermátide tardía. Este resultado se debería a que, en primer lugar, Diazinon altera la condensación espermática, por medio de la fosforilación de las protaminas, y en segundo lugar, a que puede dañar directamente al DNA descondensado gracias a sus propiedades alquilantes. En la presente tesis, encontramos que el total de embriones, de blastocistos, de embriones con morfología grado 1 y grado 4, y el total de células por embrión en blastocisto expandido, se ven negativamente afectados, en común pero no únicamente, durante la primera semana de evaluación post tratamiento, especialmente con las dosis más altas. Ello implica que probablemente los espermatozoides y espermátides tardías, afectadas en su integridad genética por acción de este pesticida, son capaces de transmitir esta información genética dañada y afectar el desarrollo preimplantacional.

Similares resultados se encontraron durante la quinta semana de evaluación, excepto en la morfología grado 4 (pero sí en la morfología grado 2) y en el total de blastocistos, donde las diferencias no fueron significativas versus el respectivo control. Durante esta semana son evaluadas las células espermatogénicas que se encuentra en los estadios de espermatogonia tipo B o espermatocito primario temprano, tipo celular que está iniciando la meiosis (Piña-Guzmán *et al.* 2005). Los procesos de proliferación mitótica de las espermatogonias, de división meiótica de los espermatocitos y de diferenciación celular de las espermátides, constituyen eventos potencialmente susceptibles a los efectos de tóxicos medioambientales, de drogas o de radiaciones ionizantes, que sean capaces de llegar directa o indirectamente hasta donde éstas se producen, es decir hasta los testículos. Estos agentes pueden producir daño celular o genómico en el epitelio germinal y producir carcinomas y/o defectos heredables (Bjorge *et al.*, 1996). Se ha llegado a determinar que Diazinon, a pesar de ser genotóxico, no produce cáncer, es decir es incapaz de producir carcinomas (WHO, 1998; EPA, 2000).

Las espermatogonias son las más sensibles a las radiaciones ionizantes y a los agentes alquilantes, comparadas con los espermatocitos y las espermátides. Esto se debe a que ellas se desarrollan en la base de las células de Sertoli quedando bajo la barrera hemato-testicular y a que se encuentran en estado proliferativo. Además el daño citotóxico, no letal, producido en las espermatogonias puede inducir mutaciones en su DNA y provocar cambios genéticos estables en los espermatozoides (Bjorge *et al.*, 1996). Ello explicaría el porqué de las diferencias significativas encontradas durante la quinta semana post tratamiento.

Por otro lado, se sabe que los organofosforados tienen propiedades alquilantes y clastogénicas, es decir, son capaces de inducir quiebres en el material genético por lo que son potencialmente mutagénicos (Wild, 1995). Gran parte del daño que sufre el DNA, tanto espontáneamente como inducido por diversos agentes químicos y físicos, es atenuado mediante complejos mecanismos de reparación que actúan constantemente durante todas las etapas de la vida celular, incluyendo la gametogénesis y la fecundación. Sin embargo, si bien los gametos masculinos y femeninos necesitan asegurar la transmisión fiel de su información genética de una generación a otra, la evolución no habría sido posible si los genomas no fueran capaces de mutar; por ello la gametogénesis podría tolerar, normalmente, un cierto número de mutaciones. Estos requerimientos, aparentemente contradictorios, de inestabilidad y estabilidad del genoma, podrían lograrse en base a las vías de reparación del DNA (Baarends *et al.*, 2001). Debido a ello, los errores genéticos producidos por el pesticida durante la espermatogénesis podrían no llegar a repararse y ser transmitidos.

Las semanas 1 y 5, si bien fueron las más representativas, no fueron las únicas en presentar diferencias significativas con el grupo control. Así para la morfología grado 1 tuvieron diferencias significativas, las semanas 2, 3 y 6, y para grado 3 la semana 3. Para el número de células por embrión en blastocisto expandido lo fue la semana 4 y para el índice mitótico se encontraron diferencias en la semana 4 para blastocistos iniciales y en las semanas 2 y 6 para blastocistos intermedios. Esto evidencia que, si bien los estadios de espermatogonia tipo B, espermatocito primario temprano y espermatozoide son los más sensibles al tratamiento, no son los únicos en ser afectados. En general todos los

---

estadios del ciclo espermatogénico se ven afectados por acción del pesticida, pero en una proporción variable.

Los pesticidas no solamente ejercen daño por acción inhibitoria directa sobre los testículos, si no que además pueden alterar los niveles hormonales, actuando a nivel del eje hipotálamo-pituitaria-gónadas, con las subsecuentes implicaciones espermatogénicas (Sarkar *et al.*, 2000). Los organoclorados son reconocidos por su ya demostrado efecto estrogénico a nivel de tracto reproductivo (Toppari *et al.*, 1996); sin embargo, para los organofosforados, el panorama no está del todo claro. Así, Quinalfos, un pesticida organofosforado con efectos endocrinos demostrados, afecta el eje hipotálamo-pituitaria-gonadal por inhibición de la acetilcolinesterasa, aumentando la concentración de acetilcolina en hipotálamo e hipófisis, lo cual incrementa los niveles de LH. Los altos niveles de LH sobre-estimulan a las células de Leydig a liberar más testosterona, por lo que sus niveles plasmáticos también se ven incrementados, afectando, negativamente, la espermatogénesis y la fertilidad masculina (Sarkar *et al.*, 2000).

Las células de Leydig están ubicadas en el espacio intersticial entre los túbulos seminíferos del testículo y son las principales productoras de testosterona, hormona que contribuye al normal desarrollo de la espermatogénesis vía las células de Sertoli y de las glándulas anexas del sistema reproductor masculino (Payne y Youngblood, 1995). En ellas se ha observado una alta expresión de carboxilesterasas, enzimas que estarían involucradas en la biosíntesis de testosterona (Mikhailov y Torrado, 2000). Las carboxilesterasas pueden ser inhibidas por compuestos organofosforados como Clorpirifos, a nivel de cerebro e hígado, tanto *in vivo* como *in vitro* (Chanda *et al.*, 1997). Las carboxilesterasas de las células de Leydig también podrían ser inhibidas causando la disminución de la síntesis de testosterona. En consecuencia, la espermatogénesis, también, se vería afectada negativamente.

No se sabe si Diazinon incrementa o disminuye los niveles de testosterona y/o de otras hormonas relacionadas a los procesos reproductivos, pero en cualquiera de los dos casos, tanto la espermatogénesis como la fecundidad masculina serían afectadas de forma negativa. En nuestros resultados se observó la disminución del número de hembras preñadas (en la dosis de 10,5 mg/kg), del número total de embriones (durante las semanas 1 y 5 para las dosis de 10,5 y 21 mg/kg) y el aumento de las diferencias entre el total de ovocitos ovulados y el total de embriones encontrados (para la dosis de 5,25 mg/kg en la semana 1, de 10,5 mg/kg en las semanas 1 y 4 y de 21 mg/kg en las semanas 2, 4 y 5), poniendo en evidencia que Diazinon disminuye la fecundidad masculina, posiblemente debido a mecanismos hormonales, asociados a su capacidad de inhibir más de un tipo de estererasas, distribuidas en diversos tejidos y órganos.

Se sabe que algunos pesticidas organofosforados comprometen la fecundidad femenina debido a que pueden alterar las concentraciones de las hormonas esteroidales, trayendo como consecuencia la modificación del crecimiento folicular, de la ovulación, de la calidad ovocitaria y de la duración del ciclo estral o menstrual (Sharara *et al.*, 1998; Farr *et al.*, 2004). Greenlee *et al.* (2004) menciona que la exposición materna a los pesticidas estaría asociada a la ocurrencia de muerte fetal o de recién nacidos, siendo particularmente sensible el periodo comprendido entre la tercera y quinta semana de

gestación. Así mismo, la exposición al organofosforado Triclorfon, antes o durante la fecundación, induce una alta frecuencia de micronúcleos, aneuploidias y retardo en el desarrollo de embriones preimplantacionales y de fetos en gestación media (Tian *et al.*, 2000).

Normalmente, la maduración folicular responde a una regulación extraovárica donde participa el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas mediante la secreción de FSH y LH y a una regulación intraovárica mediante la producción local de estradiol. La FSH y el estradiol promueven, inicialmente, la proliferación de las células de la granulosa, para luego estimular en ellas la expresión de los genes de la citocromo P450 aromatasa (relacionada a la producción de estradiol a partir de andrógenos), de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la inhibina (reguladora de los niveles de FSH) y de los receptores de LH, necesarios para que la maduración folicular ocurra. Así mismo, el estrógeno folicular desencadena la respuesta "feedback" sobre el hipotálamo y la hipófisis, lo que gatilla la producción de LH y una disminución de la FSH por acción de la inhibinas. El pico de LH reinicia la meiosis del ovocito (detenida en la profase I), rompe las paredes del folículo y libera el complejo ovocito-cumulus oophorus. Previo a la ovulación, el ovocito completa la meiosis I, libera el primer cuerpo polar y detiene nuevamente la meiosis en la fase de metafase II, hasta cuando ocurra la fecundación (Elvin y Matzuk, 1998). Se deduce que las alteraciones en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas y en los niveles de estradiol tiene un marcado efecto en la maduración folicular, lo cual repercute en la calidad ovocitaria y en la fecundidad femenina.

Maxwell y Dutta (2005) reportan que Diazinon causa cambios en la estructura de los folículos ováricos y en los niveles de estradiol en peces, lo cual repercute sobre los mecanismos de "feedback" del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. Por lo tanto, si Diazinon afecta los niveles de las hormonas reproductivas en peces, se podría esperar similares resultados sobre mamíferos como el ratón, y que ello pudiera repercutir en la fecundidad femenina o en la cantidad y calidad de los ovocitos, trayendo como consecuencia la disminución del número de embriones de buena calidad obtenidos a partir de hembras pretratadas con el pesticida. Nuestros resultados demuestran que la fecundidad femenina no se ve comprometida por efecto del pesticida ya que no se encontraron diferencias significativas entre el promedio de embriones y de cuerpos lúteos de los grupos tratados versus el grupo control. Sin embargo, sí se encontraron diferencias en el promedio de embriones retrasados y con morfología grado 4 para la dosis de 5.25 mg/kg y con morfología grado 3 para la dosis de 21 mg/kg.

La disminución en la calidad embrionaria, pero no de la fecundidad femenina puede ser atribuida a más de un mecanismo. El primero de ellos estaría relacionado a posibles efectos sobre el sistema endocrino, por medio de la variación de los niveles basales de algunas hormonas reproductivas, de forma similar a lo reportado en peces (Maxwell y Dutta, 2005). Un posible segundo mecanismo estaría dado por la acción tóxica directa de Diazinon sobre el DNA del ovocito, ya que, como se ha mencionado antes, los metabolitos de este pesticida, tienen propiedades alquilantes y puede afectar directamente el genoma ovocitario, sobre todo en las etapas de la meiosis donde el DNA es más susceptible a los efectos de las toxinas reproductivas, como lo son la profase y el periodo de segregación de los cromosomas (Handel y Sun, 2005). Un tercer mecanismo

---

de ovotoxicidad del pesticida estaría relacionado los eventos de maduración del ovocito, ya que como reportan Pocar *et al.* (2003) algunos contaminantes ambientales pueden alterar tanto al RNA mensajero almacenado en el ooplasma (el cual se sintetiza durante la maduración del ovocito, se almacena y luego es utilizado en el periodo previo a la activación del genoma embrionario) como a la redistribución de los gránulos corticales, evento importante para la maduración citoplasmática del ovocito, ya que impide la poliespermia.

La presente tesis confirma la utilidad del análisis de embriones preimplantacionales de ratón como modelo para una evaluación rápida y eficiente de los posibles efectos sobre la descendencia de individuos expuestos a diversos xenobióticos, como los pesticidas. Mediante el análisis de parámetros relacionados a la calidad embrionaria, no sólo observamos los efectos sobre la descendencia obtenida a partir de gametos masculinos y femeninos expuestos a determinado tóxico, sino que además determinamos, indirectamente, la sensibilidad de los gametos al respectivo agente tóxico.

Así, nuestros resultados demuestran que los gametos masculinos son más susceptibles a los efectos de Diazinon que los femeninos, ya que durante el tratamiento paterno se encontraron diferencias significativas en todas las variables analizadas, siendo particularmente sensibles los estadios de la espermatogénesis correspondientes a las semanas 1 y 5, mientras que en el tratamiento materno sólo se encontraron diferencias en el total de embriones atrasados y en el total de embriones grado 3 y 4. Tanto machos como hembras difieren en la forma de producción de sus gametos y en los mecanismos de control hormonal, por ello pueden reaccionar de manera diferente frente a un mismo tratamiento.

Es importante destacar la presencia de los embriones con más de un blastocele encontrados tanto en el tratamiento materno como en el tratamiento paterno, ya que este tipo particular de morfología ha sido reportado como consecuencia de un posible efecto estrogénico del pesticida organoclorado Metoxiclor sobre embriones preimplantacionales (Amstislavsky, *et al.* 2003). Los pesticidas organoclorados son reconocidos por su ya demostrado efecto estrogénico relacionado a su capacidad para unirse a los receptores de estrógeno. Así, para que Metoxiclor pueda unirse al receptor de estrógeno, primero sufre un proceso de demetilación, lo que resulta en la formación de metabolitos con uno o dos radicales OH capaces de unirse a los receptores de estrógeno (Hall *et al.*, 1997). Una prueba más de que este tipo particular de morfología se relaciona con efectos estrogénicos está dado por los reportes de Van der Auwera y Hooghe (2001), quienes encontraron el mismo tipo de blastocisto anómalo como consecuencia del uso de gonadotrofinas en ratonas superovuladas. Se ha demostrado que los receptores de estrógeno aparecen durante el estadio de cigoto, desaparecen durante el estadio de 4 células y reaparecen durante los estadios de mórula y blastocisto en ratón (Hiroi *et al.*, 1999); por ello es evidente que los embriones preimplantacionales pueden ser blanco de cualquier xenoestrógeno. Teniendo en cuenta que el potencial estrogénico de Diazinon ha sido demostrado en cultivos celulares (Kojima *et al.*, 2005; Manabe *et al.*, 2006), nuestros resultados ponen en evidencia el efecto estrogénico de Diazinon sobre los embriones preimplantacionales ya que también es capaz de afectar la formación del blastocele de forma similar a Metoxiclor y a las gonadotrofinas. Los embriones están

expuestos directamente a la acción del pesticida durante el tratamiento materno;; ello explicaría por qué el porcentaje de ratonas que produjeron este tipo de embriones es mayor en el tratamiento materno (18,4%) que en el tratamiento paterno (2,4%). Durante el tratamiento paterno, los embriones se ven expuestos de forma indirecta a los metabolitos del pesticidas, ya que ellos pueden llegar hasta el fluido seminal (Greenlee *et al.*, 2004) y ser transferidos durante la cópula, como lo evidencia los resultados encontrados durante la primera semana de evaluación y de esta forma afectar también a los embriones.

Se ha comprobado que los organofosforados son compuestos capaces de alterar el balance que se produce entre proliferación celular y apoptosis (Billing, 1996). La apoptosis es un fenómeno biológico que controla la proliferación celular y el crecimiento de los tejidos. En este proceso, células aisladas ponen en marcha un programa de muerte organizada que está altamente regulado tanto intra como extracelularmente y en el que participan diversos mediadores fisiológicos como hormonas, receptores de membrana y transductores intracelulares. Luego de iniciada la apoptosis, se produce la digestión de DNA celular y la célula queda convertida en tres a cinco cuerpos apoptóticos, cada uno con organelos aparentemente intactos y rodeados por membrana plasmática, que finalmente serán digeridos por células fagocíticas (Billing, 1996).

Durante el desarrollo preimplantacional, la apoptosis sólo ocurre después de la activación del genoma del embrión y permite la eliminación de células innecesarias, falsamente diferenciadas o que se encuentren en ubicaciones ectópicas; por ello, para un óptimo desarrollo no sólo se requiere una alta tasa de proliferación y de diferenciación, sino también de apoptosis (Huppers *et al.*, 2005). En nuestros resultados, la proliferación celular sólo se vio afectada en el tratamiento paterno. Se encontró que mientras para la dosis de 10,5 mg/kg la proliferación celular aumenta, para la dosis de 21 mg/kg disminuía, y sólo en algunas semanas; por ello es poco evidente que Diazinon afecte la proliferación celular embrionaria.

El transporte embrionario a través del oviducto en ratón, al igual que en rata, está regulado por estradiol y progesterona; así mientras estradiol acelera el transporte, progesterona lo retarda (Orihuela *et al.*, 2003). Por ello, variaciones en los niveles de estas hormonas pueden ser evidenciados por la cantidad de embriones encontrados en oviducto y en útero. Nuestros resultados no reportaron variación en el transporte embrionario, ni en machos ni en hembras. Si Diazinon tiene efecto estrogénico podría acelerar el transporte de los embriones, pero debido a que la metodología empleada sólo permite determinar retardo pero no aceleración en el transporte, este efecto no pudo ser determinado.

Finalmente, la relación dosis-respuesta para Diazinon fue encontrada sólo en algunos de los parámetros analizados, tanto para el tratamiento materno como paterno. Si bien los ratones de cada grupo fueron tratados de igual forma, cada uno de ellos difiere en su biología interna y en su potencial respuesta de reacción frente al pesticida (Burrue *et al.*, 2000). Ello se ve reflejado en la distribución de los datos y en consecuencia en las diferencias significativas encontradas.



## 7. CONCLUSIONES

- Diazinon, afecta diferencialmente los diferentes tipos celulares del epitelio seminífero. Así, los espermatozoides maduros, espermátides tardías, espermatogonias tipo B y espermocitos tempranos resultan ser los más afectados por el tratamiento.

- Diazinon afecta negativamente la gametogénesis masculina siendo este daño heredable y evidenciable durante el desarrollo embrionario preimplantacional.

- El ovocito, durante su etapa de maduración ovocitaria, es sensible a los efectos tóxicos de Diazinon y ello repercute en la calidad de los embriones preimplantacionales obtenidos a partir de hembras tratadas pregestacionalmente.

- Diazinon altera la formación del blastocelo en embriones preimplantacionales de ratón y este efecto es atribuible a una posible acción estrogénica del pesticida sobre los embriones.

- Diazinon no afecta el transporte ni la proliferación de los embriones preimplantacionales de ratón obtenidos a partir de gametos masculinos y femeninos pretratados individualmente.

- El análisis de embriones preimplantacionales obtenidos a partir de machos y hembras pretratados con un agente tóxico constituye un buen modelo de evaluación de los efectos tóxicos de pesticidas como Diazinon sobre la gametogénesis y la descendencia.



---

# BIBLIOGRAFÍA

- ALM, H., TIEMANN, V., TORNES, H. 1996. Influence of organochloride pesticides on development of mouse embryo *in vitro*. *Reprod Toxicol*. 10(4): 321–326.
- ALUIGI, M.G., ANGELINI, C., FALUGI, C., FOSSA, R., GENEVER, P., GALLUS, L., LAYER, P.G., PRESTIPINO, G., RAKONCZAY, Z. SGRO, M. THIELECKE, H., TROMBINO, S. 2005. Interaction between organophosphate compounds and cholinergic functions during development. *Chem Biol Interact*. 157-158: 305-316.
- AMSTISLAVKSY, S., KIZILOVA, E., EROSCHENKO, V. 2003. Preimplantation mouse embryo development as a target of the pesticide methoxychlor. *Reprod Toxicol*. 17: 79–86.
- ANDERSON, D. 2005. Male-mediated developmental toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 207: S506–S513.
- BAARENDS, W. M., VAN DER LAAN, R., GROOTEGOED, A. 2001. DNA repair mechanisms and gametogenesis. *J Reprod Fertil*.121: 31-39.
- BHUIYAN, M. B., MURAD, F., FANT, M. E. 2006. The placental cholinergic system: localization to the cytotrophoblast and modulation of nitric oxide. *Cell Commun and Signal*. 4: 4 (doi:10.1186/1478-811X-4-4). In: <http://www.biosignaling.com/content/pdf/1478-811X-4-4.pdf> .
- BILLING, H., CHUM S-Y., EISENHAUER, K., HSUEH, A. 1996. Gonadal cell apoptosis: Hormone-regulated cell demise. *Hum Reprod*. 2: 103-117.

- BJORGE, C., BRUNBORG, G., WIGER, R., HOLME, J., SCHOLZ, T., DYBING, E., SODERLUND, E. 1996. A comparative study of chemically induced DNA damage in isolated human and rat testicular cells. *Reprod Toxicol.* 10: 509-519.
- BREWER, L., CORZETT, M., BALHORN, R. 2002. Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. *J Biol Chem.* 277(41): 38895–38900.
- BURRUEL, V. R., RAABE, O. G., OVERSTREET, J. W. WILSON, B. W., WILEY, L. M. 2000. Paternal effects from methamidophos administration in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 165: 148–157.
- BUSTOS-OBREGÓN, E., DIAZ, O., SOBARZO, C. 2001. Parathion induces mouse germ cells apoptosis. *Ital J Anat Embryol.* 106(Suppl 2): 199-204.
- BUSTOS-OBREGÓN, E., VALENZUELA, M., ROJAS, M. 1998. Agropesticidas and testicular damage. In: Male reproduction: A multidisciplinary overview. Churchill Communications Europe. España. pp 257- 264.
- CHANDA, S.M., MORTENSEN, S.R., MOSER, V.C., PADILLA, S. 1997. Tissue-specific effects of chlorpyrifos on carboxylesterase and cholinesterase activity in adult rats: an in vitro and in vivo comparison. *Fundam Appl Toxicol.* 38(2): 148-157.
- CRUZ, M.E., FLORES, A., PALAFOX, M.T., MELÉNDEZ, G. RODRÍGUEZ, J.O., CHAVIRA, R., DOMÍNGUEZ, R. 2006. The role of the muscarinic system in regulating estradiol secretion varies during the estrous cycle: the hemiovariectomized rat model. *Reprod Biol Edocrinol.* 4:43 (doi:10.1186/ 1477-7827-4-43). In: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=1564398&blobtype=pdf> .
- DAWSON, K. J., CONAGHAN, J., OSTERA, GR., WINSTON, R.M.L., HARDY, K. 1995. Delaying transfer to the third day post-insemination, to select nonarrested embryos, increases development to the fetal heart stage *Hum Reprod.* 10: 177–182.
- EDWARDS, F. L., TCHOUNWOU, P. B. 2005. Environmental toxicology and health effects associated with Methyl Parathion exposure – A scientific review. *Int J Environ Res Public Health*2(3): 430-441.
- EHLING, U.H., MACHEMER, L. BUSELMSIER, W., DYCKA, J., FROHBERG, H., KRATOCHVILOVA, J. LANG, R., LORKE, D., MULLER, D., PEH, J., ROHRBORN, G., ROLL, R., SCHULZ-SCHENCKING, M., WEIMANN, H. 1978. Standard protocol for the dominant lethal test in male mice. *Arch. Toxicol.* 39: 173–185.
- EL-AZIZ, M.I., SAHLAB, A.M., EL-KHALIK, M. 1994. Influence of Diazinon and Deltamethrin on reproductive organs and fertility of male rats. *Dtsch Tieraerztl Wochenschr.* 101: 230-232.
- ELVIN, J.A., MATZUK, M. M. 1998. Mouse models of ovarian failure. *Rev Reprod.* 3: 183-195.
- EVENSON, D., JOST, L., MARSHALL, D., ZINAMAN, M., CLEGG, E., PURVIS, K., DE ANGELIS, P., CLAUSSEN, O. 1999. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod.* 14: 1039–1049.
- EZKENAZI, B., HARLEY, K., BRADMAN, A., WELTZIEN, E., JEWELL, N. P. BARR, D. B., FURLONG, C. E., HOLLAND, N. T. 2004. Association of *in utero* organophosphate pesticide exposure and fetal growth and length of gestation in an agricultural population. *Environ Health Perspect.* 112(10): 1116–1124.

- FARR, S. L., COOPER, G. S., CAI, J., SAVITZ, D., SANDLER, D. 2004. Pesticide use and menstrual cycle characteristics among premenopausal women in the agricultural health study. *Am J Epidemiol.* 160: 1194-1204.
- FURTADO, M., CHAN, L. 2004. Toxicity of Organophosphates. In: <http://www.emedicine.com/med/topic1677.htm>.
- GREENLEE, A. R., ELLIS, T. M., BERG, R. L. 2004. Low-dose agrochemicals and lawn-care pesticides induce developmental toxicity in murine preimplantation embryos. *Environ Health Perspect.* 112(6): 703-709
- HALL, D., PAYNE, L. A., PUTNAM, J. M., HUET-HUDSON, Y. M. 1997. Effect of methoxychlor on implantation and embryo development in the mouse. *Reprod Toxicol.* 11(5): 703-708.
- HANDEL, M. A., SUN, F. 2005. Regulation of meiotic cell divisions and determination of gamete quality: Impact of reproductive toxins. *Sem Reprod Med.* 23(3): 213-221.
- HATJIAN, B.A., MUTCH, E., WILLIAMS, F.M., BLAIN, P.G., EDWARDS, J.W. 2000. Cytogenetic response without changes in peripheral cholinesterase enzymes following exposure to a sheep dip containing Diazinon in vivo and in vitro. *Mutat Res.* 472: 85-92.
- HIROI, H., MOMOEDA, M., INOUE, S., TSUCHIYA, F., MATSUMI, H., TSUTSUMI, O., MURAMATSU, M., TAKETANI, Y. 1999. Stage-specific expression of estrogen receptor subtypes and estrogen responsive finger protein in preimplantation mouse embryos. *Endocr J.* 46(1): 153-158.
- HOGAN, B., BEDDINGTON, R., CONSTANTINI, F., LACY, E. 1994. Manipulating the embryo mouse. Cold Spring Laboratory Press. New York. pp. 19 -109.
- HOLLAND, W., ALHBORN, T., TURTELTAUB, K., MARKEE, C., MOORE, D., WYROBECK, A. J., SMITH, M. T. 1999. Acrylamide causes pre-implantation abnormalities in embryos and induces chromatin-adducts in male germ cells of mice. *Reprod Toxicol.* 13(3): 167-178.
- HUPPERTZ, B., HERRLER, A. 2005. Regulation of proliferation and apoptosis during development of the preimplantation embryo and the placenta birth defects. *Birth Defec Res. (Part C)* 75: 249-261.
- INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY (IPCS). 1986. **Environmental Health Criteria 63 / Organophosphorus Insecticides: A General Introduction.** In : <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc63.htm> .
- INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY (IPCS). 2005. The WHO Recommended and Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2004. In : <http://www.inchem.org/documents/pds/pds/other/class.pdf> .
- KAPPERS, W., EDWARDS, R., MURRAY, S., BOOBIS, A. 2001. Diazinon is activated by CYP2C19 in human liver. *Toxicol Appl Pharmacol.* 177: 68-76.
- KOJIMA, M., FUKUNAGA, K., SASAKI, M., NAKAMURA, M., TSUJI, M., NISHIYAMA, T. 2005. Evaluation of estrogenic activities of pesticides using an in vitro reporter gene assay. *Int J Environ Health Res.* 15(4): 271-280.
- KUMAR, K.B., DEVI, K.S. 1992. Teratogenic effects of methyl parathion in developing chick embryos. *Vet Hum Toxicol.* 34(5): 408-410.

- LEVARIO-CARRILLO, M., OLAVE, M.E., CORRAL, D.C., ALDERETE, J.G., GAGIOTI, S.M., BEVILACQUA, E. 2004. Placental morphology of rats prenatally exposed to methyl parathion. *Exp Toxicol Pathol.* 55(6): 489-496.
- MALHI, P.K., GROVER, I. S. 1986. Genotoxic effects of some organophosphorus pesticides. Part II. In vivo chromosomal aberration bioassay in bone marrow cells in rat. *Mutat Res.* 188: 45–51.
- MANABE, M., KANDA, S., FUKUNAGA, K., TSUBURA, A., NISHIYAMA, T. 2006. Evaluation of the estrogenic activities of some pesticides and their combinations using MtT/Se cell proliferation assay. *Int J Hyg Environ Health.* 209(5): 413-421.
- MAXWELL, L.B., DUTTA, H.M. 2005. Diazinon-induced endocrine disruption in bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. *Ecotoxicol Environ Saf.*60(1): 21- 27
- McLACHLAN, J., ARNOLD, S. 1996. Environmental estrogens. *Am Sci.* 84: 452–461.
- MIKHAILOV, A., TORRADO, M. 2000. Carboxylesterases moonlight in the male reproductive tract: a functional shift pivotal for male fertility. *Front Biosci.* 5: 53-62.
- NARAYANA, K., PRASHANTHI, N., NAYANATARA, A., KUMAR, H.H., ABHILASH, K., BAIRY, K.L. 2005. Effects of methyl parathion (o,o-dimethyl o-4-nitrophenyl phosphorothioate) on rat sperm morphology and sperm count, but not fertility, are associated with decreased ascorbic acid level in the testis. *Mutat Res.* 588(1): 28-34.
- ORIHUELA, P., PARADA-BUSTAMANTE, A., CORTÉS, P., GATICA, C., CROXATTO, H. 2003. Estrogen receptor, cyclic adenosine monophosphate, and protein kinase A are involved in the nongenomic pathway by which estradiol accelerates oviductal oocyte transport in cyclic rats. *Biol Reprod.* 68: 1225 –1231.
- PAYNE, A. H., YOUNGBLOOD, G. L. 1995. Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biol Reprod.* 52: 217-225.
- PIÑA-GUZMAN, B., SOLÍS-HEREDIA, M. J., QUINTANILLA-VEGA, B. 2005. Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines. *Toxicol Appl Pharmacol.* 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 related to oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol.* 216(2): 216–224.
- POCAR, P., BREVINI, T. A., FISCHER, B., GANDOLFI, F. 2003. The impact of endocrine disruptors on oocyte competence. *Reproduction* 125: 313–325.
- POET, T.S., KOUSBA, A.A., DENNISON, S.L., TIMCHALK, C. 2004. Physiologically based pharmacokinetic/pharmacodynamic model for the organophosphorus pesticide Diazinon. *Neurotoxicol.*25: 1013–1030.
- RACKÉ, K., JUERGENS, U. R., MATTHIESEN, S. 2006. Control by cholinergic mechanisms. *Europ J Pharmacol.* 533: 57–68.
- RECIO, R., ROBBINS, W. A., OCAMPO-GÓMEZ, G., BORJA-ABURTO, V., MORÁN-MARTÍNEZ, J., FROINES, J. R., GARCÍA-HERNÁNDEZ, R., CEBRIÁN, M. E. 2001. Organophosphorous pesticide exposure increases the frequency of sperm sex null aneuploidy. *Environ Health Perspect.* 109(12): 31-34.
- SAMS, C., COCKER, J., LENNARD, M.S. 2004. Biotransformation of Chlorpyrifos and

- Diazinon by human liver microsomes and recombinant human Cytochrome P450s (CYP). *Xenobiotica*. 34(10): 861–873.
- SÁNCHEZ-PEÑA, L.C., REYES, B.E., LÓPEZ-CARRILLO, L., RECIO, R., MORÁN-MARTÍNEZ, J., CEBRIÁN, M., QUINTANILLA-VEGA, B. 2004. Organophosphorous pesticide exposure alters sperm chromatin structure in Mexican agricultural workers. *Toxicol Appl Pharmacol*. 196: 108–113.
- SARKAR, R., MOHANAKUMAR, K. P., CHOWDHURY, M. 2000. Effects of an organophosphate pesticide, Quinalphos, on the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in adult male rats. *J Reprod Fertil*. 118: 29-38.
- SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD AGRARIA (SENASA). 2000. Listado de plaguicidas registrados. Disponible en [http://www.senasa.gob.pe/importador\\_exportador/servicios/plaguicidas/Plaguicidas.htm](http://www.senasa.gob.pe/importador_exportador/servicios/plaguicidas/Plaguicidas.htm)
- SHARARA, F. I., SEIFER, D. B., FLAWS, J. A. 1998. Environmental toxicants and female reproduction. *Fertil Steril*. 70(4): 613–622.
- SOBARZO, C., BUSTOS-OBREGÓN E. 2000. Sperm quality in mice acutely treated with parathion. *Asian J Androl*. 2: 147-150.
- SORTUR, S.M., KALI WAL, B.B. 1999. Effect of methyl parathion formulation on estrous cycle and reproductive performance in albino rats. *Indian J Exp Biol*. 37(2): 176-178.
- SUNGUR, M., GÜVEN, M. 2001. Intensive care management of organophosphate insecticide poisoning. *Crit Care*. 5(4): 211–215.
- TARKOSWKI, A. K. 1966. An air-drying method for chromosome preparation from the mouse eggs. *Cytogenet*. 5: 394–400.
- TIAN, Y., ISHIKAWA, H., YAMAUCHI, T. 2000. Analysis of cytogenetic and developmental effects on pre-implantation, mid-gestation and near term mouse embryos after treatment with Trichlorfon during zygote stage. *Mut Res*. 471: 37–44.
- TIMCHALK, C., POET, T. S., HINMANB, M. N., BUSBYC, A. L., KOUSBAD, A. A. 2005. Pharmacokinetic and pharmacodynamic interaction for a binary mixture of Chlorpyrifos and Diazinon in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol*. 205: 31-42.
- TOPPARI, J., LARSEN, J., CHRISTIANSEN, P., GIWERCMAN, A., GRANDJEAN, P., GUILLETE, L., JEGOU, B., JENSE, T., JOUANNET, P., KEIDING, N., LEFFERS, H., MCLACHLAN, J., MEYER, O., MULLER, J., RAJPERT, E., SCHEIKE, T., SHARPE, R., SUMPTER, J., SKAKKEBAEK, N. 1996. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspec*. 104(Supp. 4): 741-803.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). 1991. Guidelines for developmental toxicity risk assessment. In: <http://www.epa.gov/NCEA/raf/pdfs/devtox.pdf> .
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). 2000. Human health risk assessment of Diazinon. Health Effects Division, Office of Pesticide Programs. In: [http://www.epa.gov/pesticides/op/diazinon/final\\_red.pdf](http://www.epa.gov/pesticides/op/diazinon/final_red.pdf) .
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). 2004. Interim Reregistration Eligibility Decision: Diazinon. Office Of Prevention, Pesticides And Toxic Substances. In: [http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/diazinon\\_ired.pdf](http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/diazinon_ired.pdf) .

VAN DER AUWERA, I., HOOGHE, T. 2001. Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. *Hum Reprod.* 16(6): 1237-1243.

WILD, D. 1995. Mutagenicity studies on organophosphorous insecticides. *Mutat Res.* 16(4): 359-363.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 1998. **Environmental health criteria 198 to Diazinon.** United Nations Environment Programme. In: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc198.htm> .



# ANEXOS

Consultar capítulo completo en:

[http://www.cybertesis.edu.pe/sisbib/2006/diaz\\_sp/pdf/diaz\\_sp-TH.back.2.pdf](http://www.cybertesis.edu.pe/sisbib/2006/diaz_sp/pdf/diaz_sp-TH.back.2.pdf)