



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

POSGRADO EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

**“ANÁLISIS DEL EFECTO DE CLOTIANIDINA SOBRE EL PERFIL
PROTEÓMICO DE LOS ESPERMATOZOIDES DE EPIDÍDIMO DE RATA”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

QUE PRESENTA

B. EXP. JESSICA ARREDONDO ESCALANTE

Matricula: 2223802026

Correo: jessbe.ae04@gmail.com

Orcid: 0000-0003-3185-0924

DIRECTOR: DR. HUMBERTO GONZALEZ MARQUEZ

JURADO

PRESIDENTA: DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA

SECRETARIA: DRA. ANA LILIA ROA ESPITIA

VOCAL: DRA. IRMA JIMENEZ MORALES

VOCAL: DR. ENRIQUE OTHON HERNANDEZ GONZALEZ

Iztapalapa, Ciudad de México, a 20 de junio de 2025.

Declaración de Originalidad

La que suscribe, **JESSICA ARREDONDO ESCALANTE** alumna del posgrado: MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa y autora de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: **“ANÁLISIS DEL EFECTO DE CLOTIANIDINA SOBRE EL PERFIL PROTEÓMICO DE LOS ESPERMATOZOIDES DE EPIDÍDIMO DE RATA”**.

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el H. Jurado para la obtención del grado de Maestra en Biología de la Reproducción Animal es de mi autoría y original, creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos, ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por su autoría y originalidad, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México, el 19 de junio de 2025.

Atentamente,



JESSICA ARREDONDO ESCALANTE

Carta de Confidencialidad

Ciudad de México, a 19 de junio de 2025.

Comisión Académica del Posgrado MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

P r e s e n t e.

La que suscribe, **JESSICA ARREDONDO ESCALANTE**, alumna con número de matrícula **2223802026** del posgrado **MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL** de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y los datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación **“ANÁLISIS DEL EFECTO DE CLOTIANIDINA SOBRE EL PERFIL PROTEÓMICO DE LOS ESPERMATOZOIDES DE EPIDÍDIMO DE RATA”** a desarrollar en LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA. Lo anterior, en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

En caso de que contravenga este compromiso, la Universidad se reserva el derecho de ejercer las acciones civiles y penales que procedan y, en consecuencia, asumo cualquier responsabilidad por el manejo indebido o sin la previa autorización expresa de la UAM-I de la referida información o resultados, así como por los eventuales perjuicios que pudiesen ocasionarse a esta Casa de Estudios.

Atentamente,



JESSICA ARREDONDO ESCALANTE

Comité Tutorial

DIRECTOR

Dr. Humberto González Márquez.

Departamento de Ciencias de la Salud UAM-Iztapalapa

hgm@xanum.uam.mx

ASESORA

Dra. Irma Jiménez Morales

Departamento de Ciencias de la Salud UAM-Iztapalapa

jimi@xanum.uam.mx

ASESOR

Dr. Enrique Othón Hernández González.

Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN-Unidad Zacatenco

enrique.hernandez@cinvestav.mx

Miembros del Jurado

Los miembros del jurado designado por la Comisión Académica de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada “**ANÁLISIS DEL EFECTO DE CLOTIANIDINA SOBRE EL PERFIL PROTEÓMICO DE LOS ESPERMATOZOIDES DE EPIDÍDIMO DE RATA**” con fecha 20 de junio de 2025.



Presidenta

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

Departamento de Ciencias de la Salud. DCBS. UAM-Iztapalapa

Correo electrónico: reyna@xanum.uam.mx



Secretaria

Dra. Ana Lilia Roa Espitia

Departamento de Biología Celular. CINVESTAV del IPN-Unidad Zacatenco

Correo electrónico: aroa@cinvestav.mx



Vocal

Dra. Irma Jiménez Morales

Departamento de Ciencias de la Salud. DCBS. UAM-Iztapalapa

Correo electrónico: jimi@xanum.uam.mx



Vocal

Dr. Enrique Othón Hernández González

Departamento de Biología Celular. CINVESTAV del IPN-Unidad Zacatenco

Correo electrónico: enrique.hernandez@cinvestav.mx

Datos de la maestría

El programa de la **Maestría en Biología de la Reproducción Animal** de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el **Programa Nacional de Posgrados de Excelencia del CONAHCyT (PNPC)** con número de registro 003797.

Agradecimiento beca CONAHCYT

Se recibió apoyo mediante una beca del **CONAHCyT** para estudios de posgrado con número de registro CVU: 1251419

Dedicatorias

Con todo mi amor y gratitud a mis padres, David y María de la luz, por creer en mí, acompañarme y apoyarme en cada una de mis decisiones. Porque con su ejemplo de amor, humildad, determinación, responsabilidad y pasión me inspiran a crecer como persona en cada una de las áreas de mi vida.

A mis amados hermanos, David y Karen, por impulsarme a dar lo mejor de mí y por darme todo su amor y cariño a pesar de todo.

Con cariño y eterna gratitud a mis abuelos Guadalupe, Heraclio y Fernando que descansan en paz. Gracias por su amor y apoyo incondicional que aún perdura en mi corazón, son parte de la inspiración en mi vida para seguir adelante.

Jessica

Agradecimientos

A Dios, por guiarme y fortalecerme; por el amor, la sabiduría, inteligencia y la paciencia depositada en mí, para llevar a cabo cada una de las actividades realizadas durante la maestría.

A mis padres, por todo su apoyo, por sus oraciones, su amor incondicional, sus consejos, gracias.; también por darme ánimo y aliento en los momentos más complicados de todo este proceso.

A mis hermanos, por escucharme y alentarme, gracias por darme tranquilidad cada que se acercaban fechas importantes.

A la Dra. Irma, Dra. Reyna y Dr. Humberto por recibirme en su equipo de trabajo, por impulsarme y darme herramientas para desarrollarme en el mundo de la investigación, gracias por cada aprendizaje.

Al equipo de trabajo del laboratorio de andrología y de expresión génica: A Oscar, Ingrid, Paola, Leslie y Karla, por su apoyo y consejo durante los experimentos y exposiciones.

A los Miembros del Jurado, por hacer de este, un mejor trabajo, por su tiempo, dedicación y apoyo.

ÍNDICE

Lista de Figuras	A
Lista de Tablas	E
Abreviaturas.....	G
Resumen	H
Abstract	I
Capítulo 1 Introducción	1
1.1 Los insecticidas neonicotinoides	2
1.1.1 Toxicidad en organismos no objetivo.....	2
1.1.2 Exposición Humana y Ambiental	2
1.1.3 Estructura química.....	3
1.1.4 Modo de acción de los neonicotinoides	5
1.1.5 Clotianidina	6
1.1.6 Receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR)	8
1.2. Espermatozoide	9
1.3 Maduración epididimaria.....	10
1.4 Perfil proteómico en espermatozoides.....	11
1.5 Modelo animal experimental.....	13
Capítulo 2 Antecedentes.....	14
2.1 MALDI-TOF	15
Capítulo 3 Planteamiento del problema.....	17
3.1 Pregunta de investigación	17
3.2 Hipótesis	17
Capítulo 4 Objetivos	17
4.1 Objetivo general	17
4.2 Objetivos específicos	17

Capítulo 5 Materiales y Métodos.....	18
5.1 Diseño experimental.....	18
5.2 Medidas de seguridad para el uso de clotianidina	18
5.3 Obtención de muestras	18
5.4 Análisis microscópico	18
5.5 Concentración	18
5.6 Viabilidad.....	19
5.7 Anormalidades morfológicas	19
5.8 Movilidad	19
5.9 Análisis del perfil proteómico de proteínas de espermatozoides mediante el programa Biotyper y espectrometría de masas	20
5.9.1 Obtención de la muestra.....	20
5.9.2 Extracción proteica	20
5.9.3 Construcción de la nueva entrada de la base de datos en Biotyper	21
5.9.4 Comparación de la base de datos bacteriana con la nueva entrada construida	23
5.10 Electroforesis en Gel SDS-Page de proteínas solubles espermáticas.	23
5.11 Preparación de la muestra	23
5.12 Análisis estadístico.....	24
Capítulo 6 Resultados.....	25
6.1 Seguimiento del peso de los animales de experimentación	25
6.2 Disección del testículo y epidídimo.....	27
6.2.1 Análisis morfológico testicular.....	28
6.2.2 Epidídimo.....	29
6.3 Análisis Morfológico	30
6.4 Evaluación espermática (Análisis microscópico)	31
6.4.1 Concentración espermática	31
6.4.2 Viabilidad	32

6.4.3 Anormalidades	32
6.4.4 Movilidad	35
6.5 Perfil proteómico espermático	36
6.5.1 Nueva entrada en la base de datos.....	36
6.5.2 Análisis comparativos con los grupos experimentales.....	41
6.5.3 Electroforesis de proteínas de espermatozoides de rata tratadas con Clotianidina.....	50
6.5.4 Posibles marcadores moleculares	51
Capítulo 7 Discusión	53
Capítulo 8 Conclusiones	62
Capítulo 9 Bibliografía.....	63

Lista de Figuras

Figura 1. Estructura de la acetilcolina, la nicotina y los neonicotinoides. Nueva clase de insecticidas muy específicos para los receptores nicotínicos de acetilcolina de insectos. Estructuras en formato mapas de potencial electrostático (ESP) (negativo, azul; positivo, rojo).	4
Figura 2. Esquema de las estructuras principales del espermatozoide (Sansegundo Hernando & Ester)	9
Figura 3. Esquema representativo de la espermatogénesis con cada una de sus fases: La proliferativa (mitosis), la meiótica y la espermiogénesis. Tomado de(Calcáneo & de la Cueva, 2021).	10
Figura 4. Tinción con eosina nigrosina en espermatozoides de rata	19
Figura 5. Ejemplo de la selección de picos para evaluación de las 500 ppm (2.5 Da), la imagen muestra el criterio de selección de los picos que se consideran para realizar el cálculo de las 500 ppm.....	22
Figura 6. Ejemplo de exclusión de los espectros planos y los picos atípicos, se observa el criterio que se utilizó para eliminar los espectros con aspecto similar al mostrado en la imagen	22
Figura 7. Peso de la rata de acuerdo con el tratamiento durante las 6 semanas, en azul se muestra el grupo control (administración únicamente con agua), en naranja el grupo de 2mg/kg/día y en gris el grupo de 10 mg/kg. Media ± error estándar; n=6. Análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una $p < 0.05$	25
Figura 8. Último registro del peso de las ratas tratadas con clotianidina durante 6 semanas consecutivas, en azul se encuentra el promedio de los pesos de las ratas del grupo control (tratados únicamente con agua potable), en naranja el promedio de las ratas del grupo de 2 mg/kg/día y en gris el grupo de 10 mg/kg. Media ± error estándar; n=6. Análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una $p < 0.05$	26
Figura 9. Pesos de los testículos. A) Testículos izquierdos del grupo control, 2 y 10 mg/kg/día respectivamente. B) Testículos de lado derecho del grupo control, 2 y 10 mg/kg/día respectivamente. Media ± error estándar; n=6 Análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una $P < 0.05$. Valores de P (Testículo Derecho $p = 0.392$ y Testículo izquierdo $p = 0.876$).	27

Figura 10. Testículos de rata macho tratados con diferentes dosis de clotianidina.....	28
Figura 11. Peso del epidídimo de ratas tratadas con Clotianidina. A) pesos del epidídimo izquierdo del grupo control, 2 y 10 mg/kg/día respectivamente. B) pesos del epidídimo derecho del grupo control, 2 y 10 mg/kg). Media ± error estándar; n=6 Análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una P<0.05.(Epidídimo derecho valor p= 0.616 y epidídimo izquierdo valor p= 0.176.....	29
Figura 12. Epidídimos de rata tratados con diferentes dosis (0,2 y 10 mg/kg/día) de clotianidina, se observa que a mayor dosis hay una modificación del grosor del conducto deferente y del corpus en los grupos tratados con 2 y 10 mg/kg/día, no se observó diferencia en la cabeza, ni en la cauda epididimaria	30
Figura 13. Concentración espermática por mililitro de cada grupo, en azul se encuentra el grupo control, en naranja el grupo 2mg/kg/día y en gris el grupo de 10 mg/kg/día. Media ± error estándar; n=6 Análisis por T-Student con una p<0.05.....	31
Figura 14. Viabilidad espermática de ratas tratadas con clotianidina en dosis diferentes (0, 2, 10 mg/kg/día), se muestra que al incrementar la dosis del tóxico disminuye la viabilidad. * Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con las dosis y el grupo control. Media ± error estándar; n=6.Análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una p<0.05 (valor p.0.000).....	32
Figura 15. Anormalidades producidas por la clotianidina en espermatozoides de rata. En azul se muestra el porcentaje del grupo control, en naranja el porcentaje de anormalidades del grupo de 2 mg/kg/día y en gris el porcentaje del grupo de 10 mg/kg/día. Media ± error estándar; n=6. * Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo control. Análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una p<0.05 (valor p.0.001).....	33
Figura 16. Anormalidades encontradas, espermatozoides de rata observados en el microscopio de contraste de fase a 400x, estas muestras no tienen ninguna tinción.....	34
Figura 17. Residuos citoplasmáticos encontrados en la pieza principal del flagelo. En azul se muestra el porcentaje del grupo control, en naranja el porcentaje de anormalidades del grupo de 2 mg/kg/día y en gris el porcentaje del grupo de 10 mg/kg/día. Media ± error estándar; n=6. * Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo control. Análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una p<0.05.(valor p.0.034).....	34

Figura 18. Espermatozoide de rata teñido con eosina-nigrosina visto a un aumento de 400x en microscopio óptico A) Espermatozoide con gota citoplasmática en la pieza principal del flagelo; B) Espermatozoide con exceso de citoplasma residual en la pieza principal del flagelo	35
Figura 19. Porcentaje de movilidad espermática de rata tratadas con clotianidina, a) progresiva rápida, b) progresiva lenta; c) no progresiva y d) inmovilidad. En azul se encuentran los porcentajes del grupo control, en naranja los del grupo 2mg/kg/día y en gris los del grupo 10mg/kg. Media \pm error estándar; n=6. Análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una $p < 0.05$	35
Figura 20. Espectro de proteínas espermáticas del grupo control en un rango de 2 a 16 kDa	38
Figura 21. Superposición entre espectros Ejemplo de una de las comparaciones de la base de datos de rata control y base de datos Bruker - Clostridium baratii bacteria anaeróbica. En la parte superior se observa el espectro de la bacteria Clostridium baratii y en la parte inferior la nueva entrada para la base de datos de muestras espermáticas del grupo control. Se observa que los picos mayoritariamente están en color rojo, lo que indica que no hay similitud en ambos espectros; intervalo= 1.25	40
Figura 22. Espectro que muestra proteínas en un rango de 2 a 16 kDa de espermatozoides del grupo 2 mg/kg/día, los picos con mayor resolución e intensidad fueron tomados en cuenta para la comparación entre espectros.....	42
Figura 23. Superposición entre espectros. Ejemplo de una de las comparaciones de las proteínas espermáticas del grupo 2 mg/kg/día y la base de datos creada a partir de proteínas espermáticas del grupo control. Se obtuvo un intervalo mayor a 2.30, en azul se observa los espectros del grupo control y de colores (verde, amarillo y rojo) el grupo tratado con 2 mg/kg/día.....	44
Figura 24. Espectro que muestra proteínas en un rango de 2 a 16 kDa de espermatozoides del grupo 10 mg/kg/día; de los picos con mayor resolución e intensidad fueron tomados en cuenta para la comparación entre espectros.....	46
Figura 25. Superposición entre espectros. Ejemplo de una de las comparaciones de las proteínas espermáticas del grupo 10 mg/kg/día y la base de datos creada a partir de proteínas espermáticas del grupo control. Se obtuvo un intervalo mayor a 2.00; en azul se observan los espectros del grupo control y en verde, amarillo y rojo se observa el grupo tratado con 10 mg/kg/día.....	48

Figura 26. SDS-PAGE de proteínas solubles totales de espermatozoides de rata tratados con clotianidina. Tres muestras independientes en un intervalo de 10 a 150 kDa, en el primer carril se observa el marcador de masa molecular (M); el segundo se muestra el grupo control (0), en el tercero el grupo 2 mg/kg/día (2), y en el cuarto carril el grupo 10 mg/kg/día (10). En color rojo se indican las proteínas que no se encuentran en todos los carriles y en amarillo las proteínas con mayor densidad óptica. El análisis se realizó en ImageJ.50

Lista de Tablas

Tabla 1. Principales compuestos neonicotinoides, fórmulas moleculares y masas.....	3
Tabla 2. Comparación de receptor nicotínico de la Acetilcolina entre Mamíferos e Insectos.....	5
Tabla 3. Lista de algunos productos comerciales que tienen como ingrediente activo clotianidina.....	7
Tabla 4. Resumen de la producción de granos en México en el Año 2021. Los valores reales de clotianidina en México no han sido reportados. Nc: no conocido.....	7
Tabla 5. Excreción entre ratas hembra y macho después de la administración en dos dosis.....	8
Tabla 6. Diferencia entre proteínas en el eyaculado fresco y el eyaculado capacitado in vitro.....	13
Tabla 7. Índice gonadosomático.....	27
Tabla 8. Mediciones de los testículos de rata tratada con clotianidina	28
Tabla 9. Índice gonadosomático de epidídimos de ratas con respecto al peso final de las ratas tratadas con clotianidina.....	29
Tabla 10. Mediciones realizadas en ImageJ de epidídimos para cada tratamiento.....	31
Tabla 11. Anormalidades espermáticas en cada grupo.....	33
Tabla 12. Masas asignadas en el espectro de la Fig.20. Se ejemplifican los picos que tienen mayor resolución entre las 120 proteínas totales obtenidas.....	37
Tabla 13. Intervalos asignados para determinar si existe similitud entre los espectros comparados, el intervalo va de 0 a 3.....	39
Tabla 14. Comparación base de datos de rata control y 10 bases de datos diferentes Bruker.	40
Tabla 15. Lista de masas asignadas al espectro del grupo de 2 mg/kg/día (Fig. 22).....	41
Tabla 16. Comparación de la base de datos creada con muestras espermáticas de grupos tratados con 2 mg/kg/día	43
Tabla 17. Lista de masas asignadas en el espectro del grupo 10 mg/kg/día (Fig.23).....	45

Tabla 18. Comparación de la base de datos creada con muestras espermáticas de grupos tratados con 10 mg/kg	47
Tabla 19. Promedio del número de proteínas proporcionado por el equipo para cada grupo: control, 2mg/kg/día y 10 mg/kg.....	48
Tabla 20. Número total de proteínas por masa molecular en el intervalo 2 a 15 kDa.....	49
Tabla 21. Proteínas con masas moleculares diferentes.	51
Tabla 22. Proteínas espermáticas de gallo identificadas por medio de sus péptidos específicos por espectrometría de masas MALDI-TOF.	52

Abreviaturas

ACN: acetonitrilo

Da: dalton

FA: ácido fórmico

gr: gramo

HDLS: lipoproteínas de alta densidad.

ICM-MS: espectrometría de masas de ionización/desorción láser asistida por matriz de células intactas

kDa: kilodalton

kg: kilogramo

m/z: masa carga

MALDI-TOF: desorción ionización laser asistida por matriz tiempo de vuelo

mg: miligramo

mL: mililitro

MM: masa molecular

nAChR: receptores nicotínicos de acetilcolina.

OMS: Organización Mundial de la Salud

PI: punto isoeléctrico

ppm: partes por millón

ROS: especies reactivas de oxígeno

rpm: revoluciones por minuto

SNC: sistema nervioso central

μL: microlitro

Resumen

Los neonicotinoides son insecticidas utilizados para controlar plagas de insectos. Su modo de acción es la activación de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) neuronales, lo que causa parálisis central y muerte en poco tiempo. Aunque se considera que son relativamente seguros para los mamíferos, incluidos los humanos, existe controversia sobre los efectos adversos de los neonicotinoides en organismos no objetivo en exposiciones crónicas. La clotianidina es un neonicotinoide muy utilizado en cultivos en México. El testículo, el epidídimo, las células de Sertoli y los espermatozoides, así como otros órganos de mamíferos, poseen receptores nicotínicos, lo que puede explicar algunos efectos de toxicidad no neuronal de estos insecticidas. La clotianidina puede causar toxicidad reproductiva en ratas bajo exposición crónica. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la clotianidina en dosis menores a la NOAEL (nivel sin efecto adverso observable) en la morfología del testículo y el epidídimo, así como en la calidad espermática y en perfil proteómico de los espermatozoides de la cauda del epidídimo en ratas Wistar macho. Se administraron por ingesta forzada, dosis de 2 mg/kg/día (n=6) y 10 mg/kg/día (n=6) de clotianidina, y al grupo control (n=6) únicamente se le administró agua potable, durante 6 semanas consecutivas. Se recolectaron los testículos y epidídimos para el análisis morfológico, y se obtuvieron espermatozoides de la cauda del epidídimo para evaluar su concentración, viabilidad y morfología, y realizar un perfil proteómico para observar si clotianidina afecta el número de proteínas totales. Los resultados muestran que no hay diferencias significativas en el peso de las ratas, del testículo ni del epidídimo. Sin embargo, se observó disminución en el grosor del conducto deferente y del corpus del epidídimo, aumento en la concentración espermática, disminución en la viabilidad e incremento en las anomalías morfológicas, observando un porcentaje alto de gota citoplasmática en la pieza principal del flagelo. Se encontró una disminución significativa en el total de proteínas espermáticas en un intervalo de 2 a 250 kDa de los grupos experimentales tratados con 2 y 10 mg/kg/día de clotianidina. Por lo tanto, se propone que la clotianidina altera la fisiología espermática, específicamente a procesos relacionados con su desarrollo y maduración.

Abstract

Neonicotinoids are insecticides used to control insects. Their action mode involves the activation of acetylcholine nicotinic neural receptors (nAChR), which causes central paralysis and death to occur quickly. Although considered relatively safe for mammals, including humans, there is controversy regarding the adverse effects of neonicotinoids on non-target organisms and chronic exposures. Clothianidin is a neonicotinoid used in Mexican crops. The testis, epididymis, Sertoli cells, and sperm, as well as other organs of mammals, possess a nicotinic receptor, which can explain insecticide toxicity in the nervous system. Clothianidin causes reproductive toxicity. The objective of this study was to determine the effect of clothianidin at doses lower than the NOAEL (no observable adverse effect level) on the morphology of the testis and epididymis, as well as on sperm quality and the proteomic profile of sperm from the cauda epididymis in Wistar male rats. We administered forced ingestion of clothianidin 2 (n=6) and 10 mg/kg/día (n=6); the control group had only drinking water (n=6) for six consecutive weeks. We collected testes and epididymis for morphological analysis. We obtained sperm from the cauda epididymis to assess concentration, viability, and morphology. We also built a proteomic profile to observe if clothianidin affects the total number of proteins. The results demonstrate no significant difference in the weight of rats, testis nor epididymis. However, we observed a decrease in the vas deferens and the corpus of the epididymis, an increase in sperm concentration, a decrease in viability, and an increase in morphological abnormalities, with a high percentage of cytoplasmic droplets in the principal piece of the tail. We found a significant decrease in total proteins in the interval of 2-250 kDa from experimental groups treated with 2 and 10 mg/kg/day of clothianidin. Therefore, we have proposed that clothianidin could alter sperm physiology, specifically to processes related to development and maturation.

Capítulo 1 Introducción

A lo largo de los años, los insecticidas han formado parte de la vida cotidiana, su uso para controlar todo tipo de insectos en el hogar y en la industria agroalimentaria ha sido esencial. La eficacia de estos productos se ha explotado a su máximo sin tomar en cuenta los daños que pudieran provocar a organismos no objetivo, por ejemplo, en insectos polinizadores como las abejas, aves, mamíferos, peces, anfibios y humanos. Tal es el caso de los insecticidas sistémicos que penetran en las plantas y llegan a todos los organismos que los consumen, los neonicotinoides. Actúan como agonistas de la acetilcolina en el sistema nervioso central de insectos, como por ejemplo la “mosca blanca”, que es muy perjudicial para algunos cultivos. Su uso en masa ha provocado el descenso de polinizadores principalmente las abejas, lo que ha provocado una fuerte regulación en Europa. La clotianidina es un insecticida perteneciente a los neonicotinoides, en México su uso no está regulado y se desconocen los valores reales de su uso. Al ser sistémicos, pueden actuar en receptores de organismos no objetivo, provocando efectos negativos a largo plazo. Los neonicotinoides son reconocidos por el receptor de la acetilcolina, por lo que los aparatos y sistemas que lo presentan se ven afectados. El sistema reproductor masculino presenta receptores nicotínicos a acetilcolina, por lo que se ha propuesto que pueden interferir en funciones esenciales, entre ellas se encuentra el desarrollo y la maduración de los espermatozoides, vitales para la fertilidad masculina. En estos eventos participan glicoproteínas de membrana, cinasas que fosforilan los residuos de tirosina, canales y enzimas, su daño o ausencia podría perjudicar la reproducción masculina. El daño o la ausencia de proteínas específicas, podría permitirnos observar el panorama de los daños y la posibilidad de encontrar marcadores moleculares que permitan determinar la manera en la que afecta la clotianidina, y proponer los mecanismos de acción que expliquen el por qué la exposición sostenida a la clotianidina genera daños significativos a organismos no objetivo.

1.1 Los insecticidas neonicotinoides

Los neonicotinoides son insecticidas que funcionan como método químico para controlar plagas de insectos desde la década de los 90 en todo el mundo. Su eficacia se debe a la afinidad que tienen por los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) de insectos chupadores, áfidos y mosca blanca, así los neonicotinoides actúan como agonistas de la acetilcolina. Esta última es un neurotransmisor que tiene como función mediar la actividad sináptica en el sistema nervioso, por lo que los neonicotinoides causan parálisis a los insectos y su muerte en poco tiempo. Aunque se ha sugerido que, al no generar toxicidad aguda, son relativamente seguros para los mamíferos incluidos los humanos (Houchat et al., 2020; Matsuda et al., 2020; Taillebois et al., 2018; Tomizawa & Casida, 2005), los daños que podrían producir concentraciones bajas y crónicas pueden ser graves. Debido a dichos efectos, existe preocupación con respecto a los daños de los neonicotinoides en los organismos no objetivo.

1.1.1 Toxicidad en organismos no objetivo

Inicialmente se asumió que los neonicotinoides tenían baja toxicidad en mamíferos debido a diferencias estructurales en los nAChR entre insectos y vertebrados (Tomizawa & Casida, 2003). Sin embargo, estudios recientes revelan efectos adversos en polinizadores, aves insectívoras y organismos acuáticos:

- **Abejas:** Alteración de la navegación y reducción de colonias, exacerbada por sinergias con fungicidas (Sgolastra et al., 2017; Zhao et al., 2020).
- **Aves:** Declinaciones poblacionales asociadas a reducción de presas insectívoras y exposición directa (DiBartolomeis et al., 2019; Hallmann et al., 2014).
- **Mamíferos:** Evidencia de bioacumulación en tejidos y alteraciones endocrinas en roedores. Estos hallazgos motivaron restricciones en la Unión Europea (2013) y reevaluaciones regulatorias globales (Goulson, 2013; Wood & Goulson, 2017).

1.1.2 Exposición Humana y Ambiental

La persistencia ambiental de los neonicotinoides facilita su detección en:

- **Agua:** Concentraciones de hasta 0.1 µg/L en ríos de Canadá y USA (Montiel-Leon et al., 2019; Sultana et al., 2018).
- **Alimentos:** Residuos múltiples en apio (1.327 mg/kg) y otras hortalizas (Fang et al., 2015; USA Department of Agriculture, 2018).

- **Polen:** Mezclas con fungicidas en colmenas, aumentando la toxicidad para abejas (Gawel et al., 2019; Thompson et al., 2014).

A pesar de su omnipresencia, los efectos crónicos en humanos, particularmente en la salud reproductiva, permanecen subestimados (Han et al., 2018).

1.1.3 Estructura química

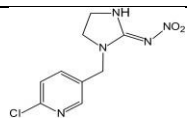
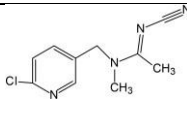
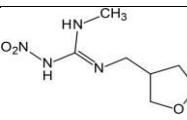
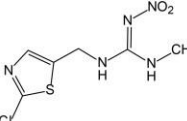
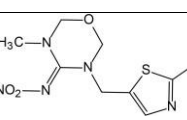
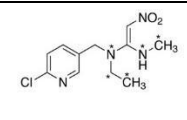
Estos compuestos se clasifican en tres familias estructurales:

- **Cloropiridinilos:** Imidacloprid, Nitenpiram, Acetamiprid, Tiacloprid.

- **Clorotiazolilos:** Tiametoxam, Clotianidina.

- **Tetrahidrofuranos:** Dinotefurano (Pang et al., 2020).

Tabla 1. Principales compuestos neonicotinoides, fórmulas moleculares y masas.

Nombre	Fórmula Molecular	Masa Molecular (g·mol ⁻¹)	Estructura molecular
Imidacloprid	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂	255.67	
Acetamiprid	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄	255.67	
Dinotefurano	C ₇ H ₁₄ N ₄ O ₃	202.21	
Clotianidina	C ₆ H ₈ ClN ₅ O ₂ S	249.68	
Tiametoxam	C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S	291.71	
Nitenpiram	C ₁₁ H ₁₅ ClN ₄ O ₂	270.72	

La estructura química en espacio de la acetilcolina, nicotina y de algunos neonicotinoides se presenta en la figura 1. Se puede observar que la estructura en

el espacio presenta similitudes que producen una unión al receptor nicotínico de la acetilcolina.

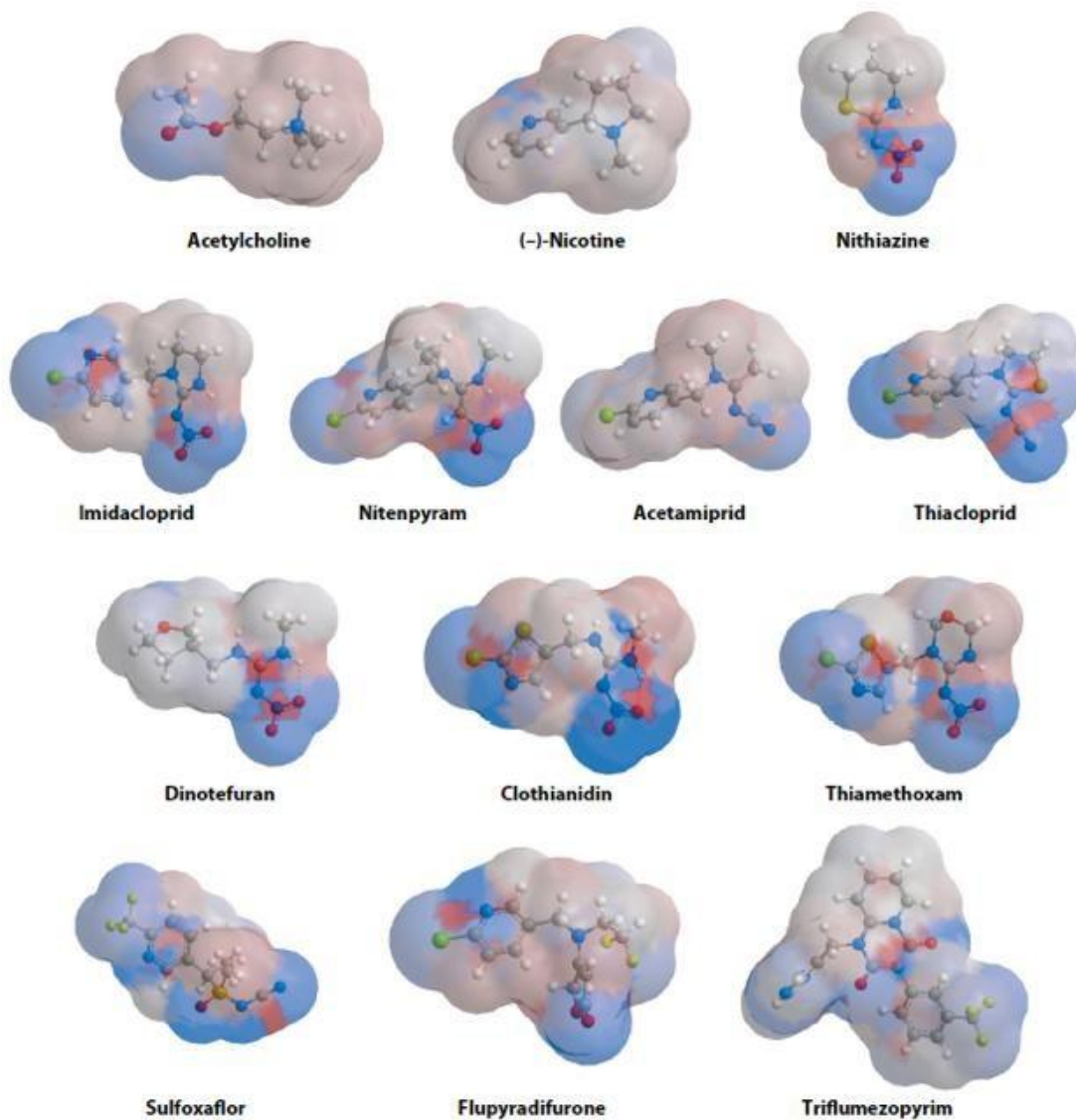


Figura 1. Estructura de la acetilcolina, la nicotina y los neonicotinoides. Nueva clase de insecticidas muy específicos para los receptores nicotínicos de acetilcolina de insectos. Estructuras en formato mapas de potencial electrostático (ESP) (negativo, azul; positivo, rojo).

La afinidad de los receptores nicotínicos entre mamíferos e insectos, por los neonicotinoides es muy distinta, ya que una de la subunidad del receptor presentes en el sistema nervioso central de los vertebrados es distinta a la que se encuentra en el SNC de los insectos, el subtipo nAChR (Tomizawa & Casida, 2005).

1.1.4 Modo de acción de los neonicotinoides

Los neonicotinoides actúan uniéndose al receptor nicotínico de la acetilcolina. Estos son canales iónicos de la familia de receptores cys-loop (Le Novère et al., 2002) y están formados por 5 subunidades que atraviesan la membrana y forman un canal iónico central, la unión de los neonicotinoides en un par de subunidades del receptor promueven un cambio conformacional que resulta en un movimiento rotacional de las subunidades y facilita la permeación iónica, pero ya que la apertura del canal fue provocada por un agonista, el canal se cierra y entra en un estado desensibilizado (Miyazawa et al., 2003). La afinidad de los neonicotinoides por los receptores nicotínicos de vertebrados es mucho menor que por los de los invertebrados (Tabla 2); en los insectos, en presencia de un neonicotinoide, la unión del ligando natural (acetilcolina) al receptor queda bloqueada permanentemente. La unión irreversible de los neonicotinoides produce sobreestimulación de los receptores nicotínicos que dan como resultado movimientos deficientes, parálisis y la muerte.

Tabla 2. Comparación de receptor nicotínico de la Acetilcolina entre Mamíferos e Insectos

Característica	Mamíferos	Insectos
Ubicación principal	SNC, SNP y unión neuromuscular	Sólo SNC
Subunidades	α ($\alpha 1$ – $\alpha 10$), β ($\beta 1$ – $\beta 4$), δ , γ , ϵ	Subunidades α y β específicas de insectos
Sensibilidad a nicotina	Alta	Alta
Sensibilidad a neonicotinoides	Baja (baja afinidad)	Muy alta (alta afinidad)
Rol farmacológico	Blanco de drogas neuromoduladoras y anestésicos	Blanco primario de pesticidas neurotóxicos
Evolución	Más conservados	Mayor variabilidad evolutiva

1.1.5 Clotianidina

Es un neonicotinoide ampliamente usado para el tratamiento de granos como el maíz, trigo, frijol, avena, girasol por mencionar algunos. Existen varias marcas a la venta (Tabla 3) con distintas formulaciones, las características que comparten son las siguientes: Ingrediente activo la clotianidina, grupo químico es nicotínico clorado y la fórmula mínima es $C_6H_8ClN_5O_2S$, acción herbicida e insecticida.

Algunas de las indicaciones que comparten las marcas más utilizadas que venden este insecticida son:

- Evitar el contacto con cuerpos de agua, ya que es muy tóxico para peces y algas marinas.
- La toxicidad hacia las abejas y a otros polinizadores es grande
- No es perjudicial para la reproducción
- No es mutagénico ni carcinogénico
- Usarlo al menos 1 a 2 veces por semana para lograr un efecto exitoso.

El Codex Alimentarius (normas internacionales para los alimentos) en conjunto con la FAO y la OMS, publicó los límites máximos permitidos de clotianidina en varios cultivos, entre ellos granos de importancia comercial en México, con la finalidad de proteger la salud de los consumidores y promover prácticas leales en el comercio alimentario (Tabla 4) (FAO, 2010 ; SIAP, 2022).

La absorción, la distribución y la eliminación de la clotianidina se examinó en estudios de dosis únicas vía oral en ratas, se observó que son excretadas principalmente a través de la orina y las heces fecales (Tabla 5) (Harty, 2017). Los órganos asociados con los sistemas de absorción y eliminación (vejiga, riñón, hígado) mostraron niveles elevados al inicio, pero después de 24 horas de administrada la dosis, ninguno de los tejidos examinados contenía residuos (valores menores al 1%). Con los datos obtenidos se reporta que no hay bioacumulación en el organismo (Harty, 2017). Otros estudios han reportado que la clotianidina (E)-1-(2-cloro-1,3-tiazol-5-ilmetil)-3-metil-nitroguanidina) se excreta sin sufrir alteraciones metabólicas en un 55 a un 73% directamente en la orina. El resto sufre reacciones metabólicas, como la desmetilación oxidativa, que transforma la clotianidina en N-(2-clorotiazol-5-ilmetil)-N-nitroguanidina y produce la escisión del enlace carbono-nitrógeno entre el grupo tiazolimetilo y el grupo nitroguanidina. La parte de la

molécula que contiene nitroguanidina se transforma principalmente en N-metil-N'-nitroguanidina, mientras que el tiazol se metaboliza adicionalmente en ácido 2-(metilito) tiazol-5-carboxílico. Los estudios sobre biocinética, excreción, distribución y metabolismo de la clotianidina destacan que no influye el nivel de dosis y ni el sexo de las ratas (Ford & Casida, 2006; Yokota et al., 2003).

Tabla 3. Lista de algunos productos comerciales que tienen como ingrediente activo clotianidina.

Nombre comercial	Concentración clotianidina (g)	Presentación	Cultivos
Clutch	257	Suspensión concentrada	Chile, Chile Bell, Tomate, Papa, Tomate de cascara, Berenjena, Calabacita, Calabaza, Melón, Pepino, Sandía, Manzano, Peral, Rosal y Vid
Dantotsu 50	500	Gránulos Dispersables	Rosas, arroz, tomate, clavel, pastos, algodón, café
Ysor	500	Gránulos dispersables	Arroz, espárrago, mandarina, papa, pimienta, tomate, vid
Dunkan flex	400	Suspensión concentrada	Arroz
Keyrole	500	Gránulos dispersables	Tomate riñón, brócoli, rosas

Tabla 4. Resumen de la producción de granos en México en el Año 2021. Los valores reales de clotianidina en México no han sido reportados. Nc: no conocido.

Tipo de cultivo	Estado productor principal	10 ⁶ toneladas	Meses Producción	MLR (nivel máximo aceptado clotianidina en semilla) (mg/kg)	Uso clotianidina en México (mg/kg)
Maíz	Sinaloa	27.5	Febrero- diciembre	0.02	nc
Trigo	Sonora	3.2	Marzo- diciembre	0.02	nc
Frijol	Zacatecas	1.2	Enero- diciembre	nc	nc
Arroz	Campeche	0.257	Enero, febrero; mayo, diciembre	0.05	nc

Tabla 5. Excreción entre ratas hembra y macho después de la administración en dos dosis.

Dosis (mg/kg)	Ratas macho		Ratas hembra	
	Excreción (%)	Excreción (h)	Excreción (%)	Excreción (h)
2.5	90	24	95	24
250	90	24	95	48

h, horas

1.1.6 Receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR)

EL sistema colinérgico está compuesto por acetilcolina, receptores, transportadores y enzimas sintetizadoras. En el sistema neuronal, la acetilcolina se transporta a través de vesículas sinápticas mediante su transportador, en respuesta a un estímulo previo. Luego, la acetilcolina llega a su receptor para estimular a la célula blanco (Schirmer et al., 2011). Los receptores de acetilcolina pueden ser de dos tipos: muscarínicos (receptores acoplados a proteínas G) o receptores nicotínicos (receptores ionotrópicos). En los receptores nicotínicos para acetilcolina se han identificado 13 subunidades: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$ y $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$.

El sistema colinérgico está asociado comúnmente con la neurotransmisión; sin embargo, ahora existe evidencia que es esencial para otras células, órganos y tejidos. Once de las trece subunidades del receptor se encuentran en el tejido testicular de rata. Entre ellas, la subunidad $\alpha 7$ parece estar asociada con la movilidad espermática, ya que se ha demostrado que se encuentra, predominantemente en la pieza media. Además, su eliminación afecta la hiperactivación del espermatozoide. Se ha propuesto que, tanto los receptores como las subunidades, podrían estar siendo afectados, si se exponen de manera prolongada a tóxicos, como los neonicotinoides u otros agentes químicos que presentan una afinidad baja por los receptores nicotínicos. Se ha demostrado que la unión de agonistas a las subunidades del receptor provoca una desensibilización, es decir puede haber una pérdida o reducción de la capacidad del receptor para

responder a una señal o ligando, provocando la pérdida de la respuesta celular. Por ejemplo, se ha observado que en los espermatozoides es esencial que el nAChR esté en condiciones óptimas para que su movilidad no se afecte. Aunque el mecanismo aún no está bien establecido, se ha demostrado, in vitro, que la eliminación de la subunidad $\alpha 7$ afecta la hiperactivación de los espermatozoides (La importancia de la formulación en los productos biocidas, 2011; Schirmer et al., 2011).

1.2. Espermatozoide

Es una célula haploide especializada que tiene como objetivo fertilizar el ovocito. La cabeza contiene el acrosoma y el núcleo, el flagelo está conformado por tres regiones (pieza media, principal, terminal) y la vaina mitocondrial que se encuentra en la pieza media (Fig. 2). De manera general, podemos decir que el espermatozoide lleva a cabo su desarrollo, maduración, capacitación y reacción acrosomal favorecido por diferentes microambientes que son vitales para que la fertilización del ovocito sea exitosa (Bray et al., 2005).

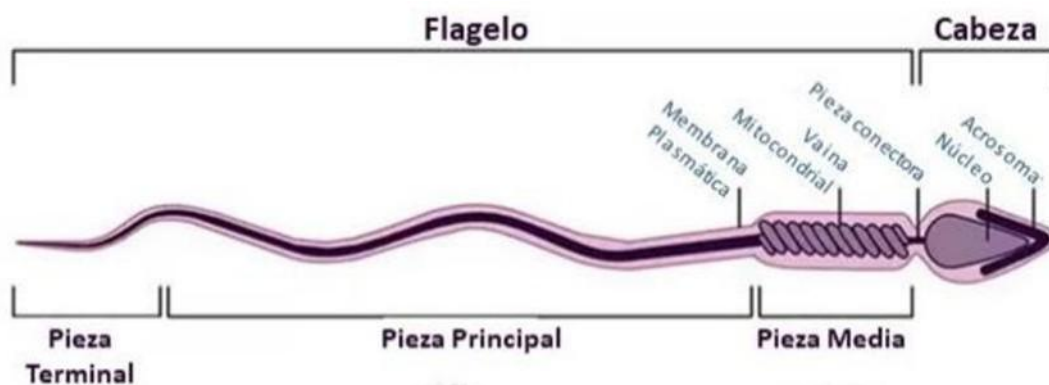


Figura 2. Esquema de las estructuras principales del espermatozoide (Sansegundo Hernando & Ester).

Los espermatozoides se desarrollan en el testículo a través de un proceso llamado espermatogénesis. Este comienza a partir de las células que se encuentran en la lámina basal del túbulo seminífero, llamadas espermatogonias. Son células somáticas que se dividen por mitosis en dos tipos celulares, espermatogonias tipo A, que originan más espermatogonias, y tipo B, a espermatocitos primarios. Una vez que las espermatogonias tipo B se vuelven a dividir por mitosis, darán origen a los espermatocitos primarios, hasta aquí las células son diploide ($2n$). Esta etapa

es conocida dentro de la espermatogénesis como la fase proliferativa, al término de esta fase, comienza la fase meiótica en donde los espermatocitos primarios se dividen por meiosis dando lugar a los espermatocitos secundarios y después a las espermatídas; durante la meiosis ocurren eventos esenciales como el entrecruzamiento y la reducción del material genético. Los espermatocitos primarios darán origen a los espermatocitos secundarios, y éstos a las espermatídas (Weinbauer et al., 2010).

Las espermatídas son células haploides y redondas que sufren cambios para transformarse en espermatozoides con forma alargada, a este proceso se le conoce como espermiogénesis. En esta fase ocurre una eliminación casi completa del citoplasma; el acrosoma se forma a partir del aparato de Golgi y el flagelo a partir de los centriolos; también sucede la compactación del material genético y el acomodo de las mitocondrias en la pieza media del espermatozoide (Fig. 3) (Weinbauer et al., 2010).

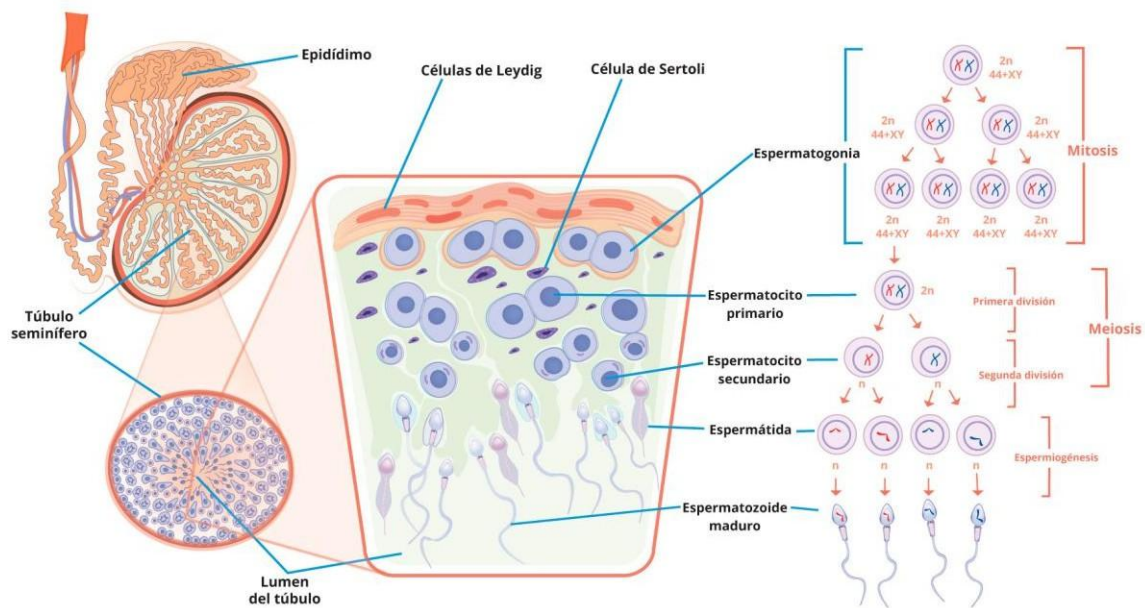


Figura 3. Esquema representativo de la espermatogénesis con cada una de sus fases: La proliferativa (mitosis), la meiótica y la espermiogénesis. Tomado de(Calcáneo & de la Cueva, 2021).

1.3 Maduración epididimaria

Una vez que los espermatozoides se formaron, son liberados al lumen del túbulo seminífero para favorecer su transporte hasta la cabeza del epidídimo. El epidídimo

es un conducto situado en la parte posterior de la gónada masculina y pueden distinguirse tres regiones que son: el caput (cabeza); el corpus (cuerpo); y la cauda (cola). Aquí, varios tipos celulares van a crear un microambiente luminal que promueve la maduración de los espermatozoides. El epitelio epididimario está formado por las células basales, apicales, principales, estrechas, halo, dendríticas, inmunológicas y claras. Éstas favorecen el desarrollo de un microambiente único para la maduración, el almacenamiento y la concentración espermática. Por ejemplo, las células principales son el tipo celular más abundante en el epitelio epididimario y participan en procesos como el transporte de agua, solutos iones y la secreción de proteínas. Las células claras, por su parte, son las responsables de la acidificación luminal y la endocitosis (Barrachina et al., 2022).

La comunicación intercelular y la maduración de los espermatozoides se lleva a cabo a través de vesículas extracelulares (epididimosomas) y microRNAs. Dentro del espacio luminal epididimario hay una gran población de epididimosomas que juegan un rol esencial en la maduración espermática. Es de vital importancia tener presente que cada segmento del epidídimo tiene su propio sello proteómico (Barrachina et al., 2022; Sullivan & Mieusset, 2016).

El fluido luminal está enriquecido en proteínas como la clusterina, la prostaglandina-D sintasa, la enzima glutatión S-transferasa, la lipocalina 5 y la albúmina; esta última representa cerca de un 50 % del total de proteínas del fluido epididimario; además cuenta con factores descapacitantes, que serán útiles para evitar que el espermatozoide adelante procesos que aún no le corresponden (Sullivan & Mieusset, 2016). Los eventos más significativos en la maduración epididimaria son: la salida del colesterol, favorecida por la albúmina y el HDLs, la adquisición de la movilidad progresiva, la modificación de las proteínas y glicoproteínas que se encuentran en la membrana plasmática, una mayor compactación de la cromatina y la eliminación de la gota citoplasmática (Robaire et al., 2006).

1.4 Perfil proteómico en espermatozoides

Los estudios de toxicidad han ido evolucionando hasta utilizar técnicas “ómicas” como la metabolómica, la genómica y la proteómica. La proteómica tiene el potencial de aportar para conocer mejor al espermatozoide y también de adquirir nuevos biomarcadores de infertilidad masculina (Aitken & Baker, 2008; Johnston et al., 2005). En este sentido, se ha estudiado la capacitación de los espermatozoides

humanos mediante electroforesis 2D, espectrometría de masas. y cromatografía líquida (Barrachina et al., 2022; Bray et al., 2005).

El espermatozoide, a lo largo de su desarrollo, pasa por eventos que le van a permitir adquirir la capacidad de fertilizar al óvulo. Las proteínas que se encuentran en cada evento pueden variar, ya que la cantidad y función de cada una difiere en cada evento, ya sea durante el desarrollo en el testículo, la maduración epididimaria, la capacitación en el istmo oviductal o en la reacción acrosomal, previa a la unión con la membrana del ovocito. Por ejemplo, una de las proteínas básicas para el super-empaquetamiento del material genético espermático son las protaminas y se ha demostrado que su contenido total se relaciona con alteraciones del ADN, lo que correlaciona positivamente con problemas de infertilidad.

Estos resultados han sido obtenidos gracias a la construcción de catálogos proteómicos espermáticos que permiten identificar, de manera objetiva, cambios en el perfil proteómico y, de esa manera, poner atención en aquellas proteínas que sufren cambios notables en su proporción, para así identificarlas y analizarlas de manera individual (Virgili, 2010); una proteína cuya ausencia perjudica la capacidad fertilizante espermática es la fertilina (Blobel, 2000).

Por lo anterior, esta investigación pretende construir una base de datos de proteínas espermáticas con el fin de aportar un catálogo con las proteínas totales de espermatozoides, específicamente tomados del epidídimo de rata. Sería valioso recopilar esta información ya que podemos identificar objetivamente proteínas que no se encuentren en la lista, ya sea en su abundancia relativa, o su ausencia total.

Es primordial entender que algunas de estas herramientas nos proporcionan el primer paso, es decir un panorama amplio de lo que está pasando en general con las proteínas totales; resolviendo el primer paso, se puede llegar a identificar la o las proteínas que se modifican en algún proceso y que pueden ser blanco de estudio farmacológico (Secciani et al., 2009).

En la tabla 6 se presenta la media de proteínas en dos eventos diferentes, la eyaculación y la capacitación, demostrando que el número de proteínas presentes en los espermatozoides se modifica dependiendo del momento fisiológico en que se encuentran.

Tabla 6. Diferencia entre proteínas en el eyaculado fresco y el eyaculado capacitado in vitro.

Nombre de la proteína	Descripción	Media de proteínas en el eyaculado	Media del eyaculado capacitado
HSP72	Proteína de choque térmico	2295	1134
G3PT	gliceraldehido-3-fosfato	2184	248
ENOA	Alfa-enolasa	4273	1727
ASGL1	L-asparaginasa	438	1133
TBA3C	Tubulina alfa-3C/D	3318	668
PIP	Prolactina-inducible protein	1980	9016

1.5 Modelo animal experimental

El modelo experimental utilizado en este trabajo fue la rata Wistar (*Rattus norvegicus*) que es una de las cepas más utilizadas para la investigación en el laboratorio. Nuestros modelos experimentales fueron proporcionados por el bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, fueron 18 ratas macho de 8 semanas de edad (adultos) con un peso inicial aproximado de 250-280 gr por unidad.

La rata es una herramienta de investigación esencial, ha servido como modelo para estudios biomédicos, toxicológicos, de nutrición enteral y parenteral; inclusive es considerado como herramienta primordial para la investigación de las condiciones que afectan a los seres humanos y que pueden ser simuladas en ratas. La investigación de laboratorio en el modelo animal logra el control estricto de ciertas variables, lo que permite conseguir resultados reproducibles. Estas variables son edad, sexo y peso corporal, con lo cual, se caracteriza a los grupos de trabajo y se garantiza una reproducibilidad de los resultados para postular hipótesis de trabajo para el humano (Agarwal et al., 2020; Cossio-Bolaños et al., 2013; Robaire et al., 2006).

Capítulo 2 Antecedentes

Los órganos y células reproductoras tienen receptores colinérgicos nicotínicos, tanto en rata como en ratón. Once de las 13 subunidades de este receptor se detectaron en el testículo, particularmente en células germinales, células de Sertoli, células de Leydig, peritubulares, espermatogonias, espermatoцитos y en el espermatozoide. Se propone que este receptor puede mediar efectos sobre la división celular, el metabolismo y la movilidad espermática y se demuestra que el sistema colinérgico no es exclusivamente neuronal. Se ha propuesto que la subunidad $\alpha 7$ podría tener un papel esencial en la movilidad, ya que se observó que se encuentra en el flagelo y su ausencia afecta la movilidad (Schirmer et al., 2011).

En ratas macho de 7 días de edad expuestas a 8 y 32 mg/kg/día de clotianidina por 90 días se encontró que la clotianidina afectó el desarrollo en el tejido testicular, además disminuyó la concentración de testosterona en sangre, la concentración espermática, y del glutatión, indicando un posible desequilibrio entre las especies reactivas de oxígeno (ROS), las anomalías aumentaron y se observó fragmentación en el ADN espermático con la dosis de 32 mg/kg/día (Bal et al., 2012).

En ratas macho de 8-9 semanas de edad expuestas a clotianidina durante 90 días se reportó que, a dosis por debajo de Noael (dosis máxima en la que la rata puede estar expuesta al tóxico sin algún síntoma reportado, actualmente es de 9.8 mg/kg/día), no hubo disminución del peso total de la rata ni de órganos como el epidídimo y el testículo. Sin embargo, se demostró que la clotianidina a dosis menores que la Noael, disminuyeron el tamaño de las glándulas seminales, se fragmentó el ADN espermático, hubo vacuolización de los túbulos seminíferos y aumentaron las células apoptóticas en los túbulos seminíferos; no se observó diferencia en los niveles séricos de testosterona (Bal et al., 2013).

La agencia de protección ambiental de USA, en el 2017, realizó varios estudios de la toxicidad de la clotianidina en rata con una exposición crónica (exposición sostenida de al menos 4 semanas hasta años) de la dosis Noael oral (9.8 mg/kg), y encontró disminución de peso en las ratas y retraso en la maduración sexual (Harty, 2017).

Soler et al. (2020) construyeron por primera vez una base de datos a partir de proteínas espermáticas de gallos a partir de la técnica “células completas” en espectrometría de masas MALDI-TOF, con la finalidad de tratar de asociar su perfil proteómico con fertilidad, subfertilidad e infertilidad de gallos para la producción de carne y para la reproducción. Determinaron cada condición a partir de modelos matemáticos predictivos y demostraron que se puede tener un mejor diagnóstico que con las pruebas tradicionales; para determinar la calidad espermática identificaron proteínas cuya abundancia relativa podría estar relacionada con la fertilidad.

2.1 MALDI-TOF

La proteómica es el estudio de la estructura y la función de las proteínas, incluso de la manera en que trabajan e interactúan en el interior de las células. El interés de la proteómica se centra en el conocimiento del conjunto de las interacciones entre proteínas para constituir la red de interacciones, que caracteriza el funcionamiento de los organismos vivos. En otras palabras, la proteómica es el estudio del proteoma (Torrades, 2004). Es una herramienta bioquímica poderosa que añadió una nueva dimensión al campo de investigación biomédica en todas sus áreas por ejemplo en hígado, enfermedades cardíacas, cáncer, eventos fisiológicos y patológicos relacionados con la biología reproductiva, ya que se estudia globalmente la producción de proteínas como respuesta celular (Upadhyay et al., 2013). Existen varias herramientas proteómicas, entre ellas se encuentran dos de nuestro entero interés: la electroforesis bidimensional y la espectrometría de masas. La electroforesis bidimensional es un tipo de electroforesis en gel comúnmente utilizada para analizar proteínas, las mezclas de proteínas son separadas por diferentes propiedades como lo es su punto isoeléctrico (PI) y su masa molecular (MM) mediante una doble separación en un gel 2D-PAGE.

La espectrometría de masas, especialmente la que utiliza desorción/ionización con láser asistida por matriz (MALDI), se ha utilizado para analizar proteínas aisladas, pero también mezclas complejas, sobre todo con muestras celulares sin fraccionar (Soler et al., 2020). Es una técnica que utiliza una matriz de absorción de energía láser que crea iones a partir de moléculas grandes con una fragmentación mínima en biomoléculas como ADN, proteínas, péptidos y carbohidratos. Así es como la espectrometría de masas con MALDI se puede utilizar para perfilar proteínas,

identificar vías moleculares defectuosas, o por ejemplo, proteínas espermáticas faltantes o en exceso en hombres infértiles o con tratamientos farmacológicos y tóxicos (Agarwal et al., 2020; Upadhyay et al., 2013). Uno de los enfoques de esta espectrometría de masas MALDI-TOF es la de células intactas, un método que se basa en la identificación de huellas dactilares en espectrometría de masas de péptidos/proteínas específicas de células. En este contexto, "célula intacta" significa que las células enteras se someten directamente al análisis de espectrometría de masas sin ningún paso preparatorio, lo cual es muy conveniente en el diagnóstico (Soler et al., 2020).

Se han identificado proteínas en muchas especies de las cuales se propone que su ausencia pudiera afectar la fisiología espermática, por lo tanto, podrían considerarse como marcadores moleculares para la fertilidad en el macho. (Barrachina et al., 2022; Schirmer et al., 2011; Sullivan & Mieusset, 2016; Wang et al., 2022).

Capítulo 3 Planteamiento del problema

3.1 Pregunta de investigación

¿Qué efecto produce la exposición crónica a clotianidina sobre el perfil proteómico, la calidad espermática y la morfología de los espermatozoides, testículos y epidídimos en ratas macho adultas?

3.2 Hipótesis

La clotianidina en dosis crónicas provocará daños morfológicos en espermatozoides de epidídimo de rata y modificará su perfil proteómico.

Capítulo 4 Objetivos

4.1 Objetivo general

- Determinar el efecto de la clotianidina en el perfil proteómico de espermatozoides de rata macho adultas (8 semanas).

4.2 Objetivos específicos

- Identificar la calidad espermática.
- Identificar los cambios morfológicos que se observen en los espermatozoides, testículo y epidídimo de rata.
- Evaluar los cambios en el patrón proteómico y en la cantidad de proteínas en espermatozoides expuestos a clotianidina.

Capítulo 5 Materiales y Métodos

5.1 Diseño experimental

Se hicieron 3 grupos de 6 ratas Wistar macho de 8 semanas de edad. Los grupos se dividieron en: grupo control y 2 grupos experimentales que se les administró vía ingesta forzada clotianidina por 6 semanas a diferentes dosis, al Grupo 1: 10 mg/kg/día, Grupo 2: 2 mg/kg/día y al grupo 3: únicamente agua potable. Las ratas se mantuvieron con agua y alimento ad libitum, bajo un ciclo de luz-obscuridad controlado (12:12) en el Bioterio de la UAM-Iztapalapa. Se manejaron de acuerdo con los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (SAGARPA 2001), en conjunto con los lineamientos de la conducción ética de la investigación, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM-Iztapalapa.

5.2 Medidas de seguridad para el uso de clotianidina

Se evitó el contacto directo con el producto, se conservó en el recipiente de origen, en un lugar seco, fresco y ventilado. Se hizo el uso de gafas protectoras para productos químicos, guantes, bata y pantalones largos.

5.3 Obtención de muestras

Pasadas las 6 semanas se realizó la eutanasia a los 3 grupos en cámara de CO₂. Una vez sacrificadas se extrajeron el epidídimo y los testículos, cada órgano se limpió de residuos de grasa u otro tejido ajeno al órgano, posterior a esta limpieza se pesaron en balanza analítica y se registró el peso de cada órgano para los análisis posteriores.

5.4 Análisis microscópico

Se obtuvieron los espermatozoides de la cauda del epidídimo mediante perfusión. Se evaluó la calidad espermática observando en un microscopio óptico los siguientes parámetros: concentración, viabilidad, anormalidades y movilidad.

5.5 Concentración

Se separó la región de la cauda del epidídimo para asegurar que los espermatozoides obtenidos fueran únicamente de este segmento, así mismo se realizaron cortes transversales. Se perfundió el conducto deferente con PBS para facilitar la salida de los espermatozoides que se encontraban en él, así como en la cauda del epidídimo, se incubaron por 40 minutos, se contaron los espermatozoides

en una dilución 1:100 y en una cámara de Neubauer, se calculó la concentración de espermatozoides obtenidos del epidídimo izquierdo de cada rata de todos los grupos.

5.6 Viabilidad

La viabilidad espermática se determinó con la tinción de eosina-nigrosina en proporción 1:1. Se consideran espermatozoides muertos aquellos que presentan una tinción morada/rosa (Fig.4). y como células vivas a las transparentes. Se realizaron los conteos por duplicado para cada muestra obtenida para cada grupo.

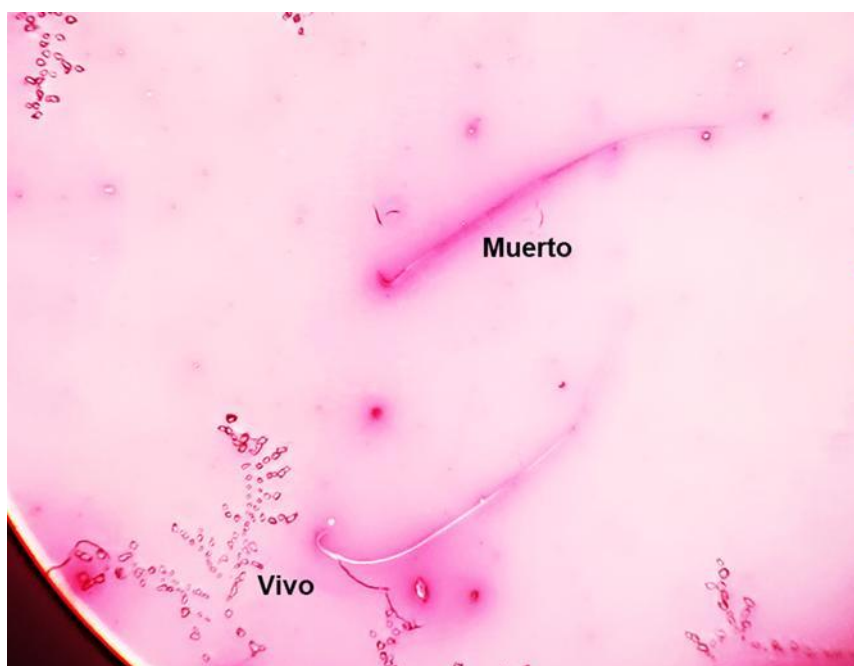


Figura 4. Tinción con eosina nigrosina en espermatozoides de rata.

5.7 Anormalidades morfológicas

Se observaron al microscopio óptico a 400x con los mismos frotis teñidos con eosina nigrosina, se contó el número de espermatozoides con anomalías, clasificándolas según lo establecido por la OMS, ya sea si presentaban alguna anomalía en la cabeza, en el flagelo o si presentaban residuos citoplasmáticos de un tamaño considerable (un tercio de la cabeza del espermatozoide) (World Health Organization, 2021).

5.8 Movilidad

Las células se obtuvieron únicamente de la cauda epididimaria y se mantuvieron en solución salina de fosfatos (PBS) durante la evaluación de la movilidad. Se

observaron al microscopio a un aumento de 400x. Se realizó una estimación de la movilidad y se clasificó de acuerdo al manual de la OMS como A) progresiva rápida; B) progresiva lenta; C) no progresiva; y D) espermatozoides inmóviles (World Health Organization, 2021).

5.9 Análisis del perfil proteómico de proteínas de espermatozoides mediante el programa Biotyper y espectrometría de masas

Para el análisis de la comparación de espectros entre la base de datos y los espectros de los grupos tratados con clotianidina, se realizó el mismo método que se siguió con los del grupo control.

5.9.1 Obtención de la muestra

Una vez que se realizó la evaluación básica de cada muestra espermática de las ratas del grupo control y de los grupos experimentales (2 y 10 mg/kg/día), los espermatozoides obtenidos se centrifugaron a 500g; se colocaron aproximadamente 15×10^6 células por criotubo y se congelaron a -80°C , para conservar las proteínas espermáticas en buenas condiciones para la construcción de la base de datos y para el análisis comparativo con los grupos experimentales.

5.9.2 Extracción proteica

Aproximadamente 30 minutos antes del análisis, los tubos con los espermatozoides se colocaron en hielo para evitar un cambio brusco de temperatura y favorecer que se descongelaran lentamente. De acuerdo con la cantidad de espermatozoides (15×10^6) se realizó un lavado con una mezcla de 300 μL de agua Mili-Q y 900 μL de etanol al 100%, se centrifugaron, se retiró el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez secos, se colocó FA en cada tubo tomando en cuenta el número de espermatozoides por tubo (por ejemplo, para un tubo de 25.75×10^6 se colocaron 60 μL), se martajó el botón con un micropistilo para asegurarse de romper por completo las células. Se colocó la misma cantidad de ACM al 50% y se centrifugaron a 3000 rpm durante 2 minutos. Con el sobrenadante se realizó una siembra conocida como “semi-sándwich” en placa para MALDI-TOF, esto quiere decir que se colocó la muestra en la placa, se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se colocó la matriz y se dejó secar de igual manera en cada pozo; después se procedió a hacer el análisis en el equipo de espectrometría de masas Bruker MALDI-TOF en modo lineal.

El análisis de las muestras se llevó a cabo en Biotyper, como primer paso se calibró el equipo usando una solución de proteínas BTS (*Bruker bacterial test standard*) contiene un extracto cuidadosamente elaborado de *Escherichia coli* DH5 alfa, que muestra un perfil peptídico característico para los espectros y el rango de masas cubierto es de 3.6 a 17 kDa; se colocó también matriz siguiendo la siembra “semi-sándwich”; para el grupo control se sembraron 10 pozos.

Se abrió la ventana de adquisición Flex control en Biotyper, se calibró el equipo asignando las masas teóricas con las masas experimentales utilizando la solución calibrante Protein Test Standard (BTS), con un intervalo de 2000–16000 masa carga (m/z), la adquisición fue de manera automática.

5.9.3 Construcción de la nueva entrada de la base de datos en Biotyper

Se procedió a hacer la adquisición manual de los espectros de las proteínas extraídas de las muestras espermáticas del grupo control para obtener la nueva “especie” de la base de datos. Se necesita un mínimo de 20 espectros, el método que se siguió fue hacer 3 repeticiones de 3000 disparos cada uno por pozo con muestra; el criterio que se siguió para agregar a la sumatoria el espectro obtenido; se tomó como referencia que saliera el mayor número de picos en el rango establecido y que la intensidad fuera alta.

A partir de los espectros se realizó la extracción de la línea base y el suavizado de los picos. Después se llevó a cabo una selección de cada espectro, revisando que los mismos cumplieran con la tolerancia de las 500 ppm 2.5 daltones (Da) (Fig.5), y que los picos obtenidos no fueran espectros planos o picos atípicos de los demás obtenidos (Fig.6). Todos aquellos que no cumplieron con esos criterios fueron eliminados. Los espectros seleccionados se abrieron en una nueva ventana en Biotyper, “MSP-Creation” donde se añadió el archivo y se creó la nueva entrada de la base de datos anotando el tipo de organismo, la fecha de creación y se guardó como proyecto nuevo.

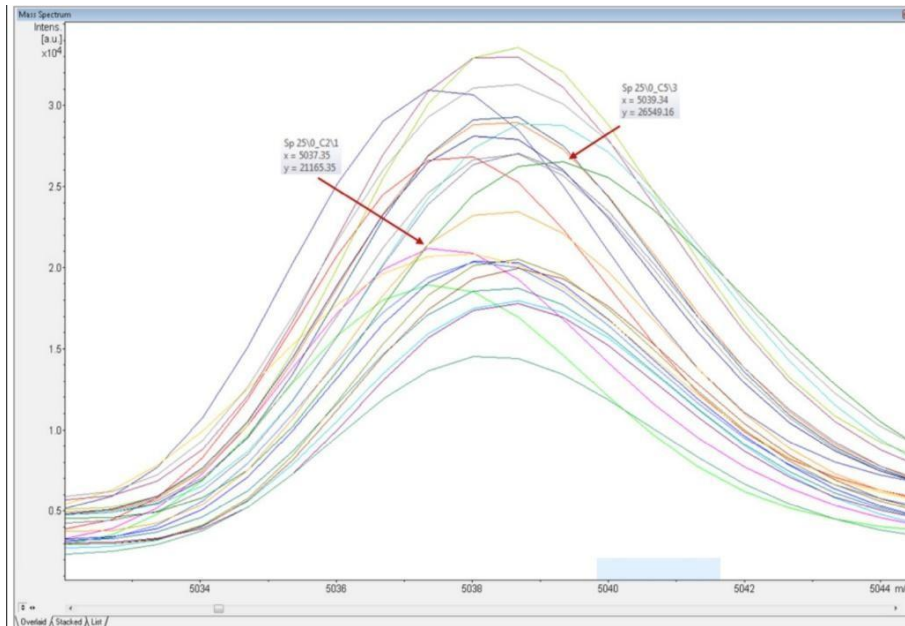


Figura 5. Ejemplo de la selección de picos para evaluación de las 500 ppm (2.5 Da), la imagen muestra el criterio de selección de los picos que se consideran para realizar el cálculo de las 500 ppm.

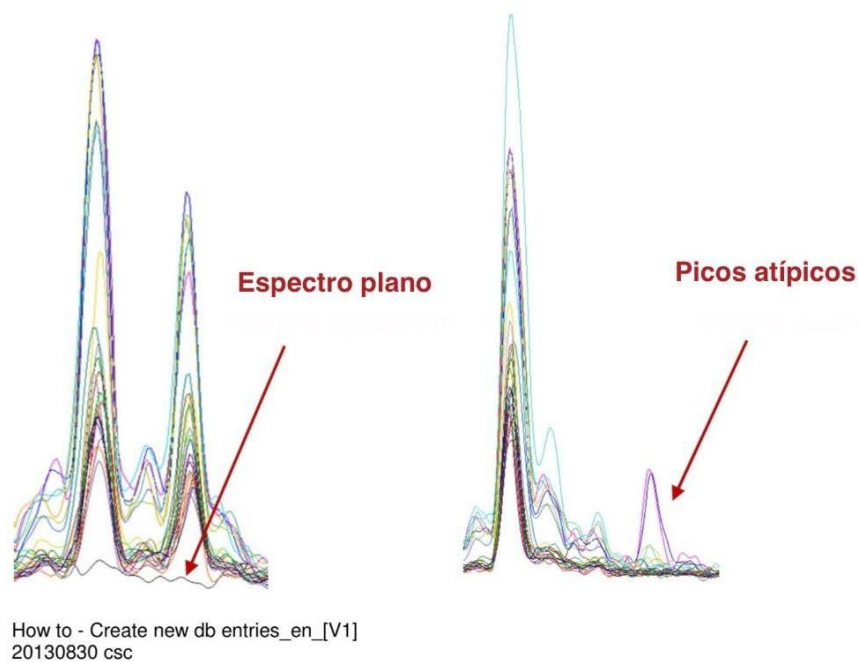


Figura 6. Ejemplo de exclusión de los espectros planos y los picos atípicos, se observa el criterio que se utilizó para eliminar los espectros con aspecto similar al mostrado en la imagen.

MSPs es una ventana donde se realiza el análisis de todas las muestras proteicas que formarán la base de datos de nueva creación. En nuestro caso es donde se realizó la comparación entre la base ya creada y los espectros de los grupos experimentales (2 y 10 mg/kg/día).

5.9.4 Comparación de la base de datos bacteriana con la nueva entrada construida

Una vez que se construyó la base de datos, se comparó con las bases de datos con las que cuenta el equipo para análisis de especies de bacterias y hongos, esto se llevó a cabo en MSPs. Esto, con la finalidad de descartar similitud con las aproximadamente 500 entradas que ya se encontraban en el equipo y poder aseverar que la nueva entrada estaba bien construida.

Para la comparación de los grupos experimentales, se realizó el mismo protocolo descrito anteriormente, para cada grupo experimental (2 y 10 mg/kg/día) se realizó el análisis por duplicado, es decir, la muestra obtenida de cada rata se sembró en dos pozos diferentes; el análisis de todas las muestras se llevó a cabo en MSPs el mismo día para mantener las condiciones idénticas y disminuir la variabilidad en la obtención de los espectros.

5.10 Electroforesis en Gel SDS-Page de proteínas solubles espermáticas

Es una herramienta útil para conocer la MM de proteínas de acuerdo con su movilidad electroforética relativa, comparando con la de proteínas estándar de MM conocida. La solución de proteínas que se van a analizar se mezcla con SDS, un detergente aniónico que desnatura las proteínas, eliminando sus estructuras secundaria y terciaria, pero sin alterar los enlaces disulfuro y además confiere una carga negativa a cada proteína en proporción a su masa (Laemmli, 1970; Shapiro Al Fau - Viñuela et al., 1967; Weber K Fau - Osborn & Osborn, 1967).

5.11 Preparación de la muestra

Las proteínas que se extrajeron para cada grupo (control, 2 y 10 mg/kg/día) para el análisis en espectrometría de masas MALDI-TOF, también se utilizaron para un análisis complementario en un gel SDS-Page, el protocolo que se siguió fue el siguiente.

Se realizó una cuantificación de la proteína extraída por muestra para luego colocarla en un concentrador a temperatura ambiente durante una hora aproximadamente, esto con la finalidad de evaporar el FA 70% y el ACN 50%.

Una vez que cada muestra estaba completamente seca, se procedió a colocar la misma cantidad de solución amortiguadora según la cantidad de proteína extraída;

si las muestras mostraban una coloración amarilla se procedía a colocar gota por gota Tris-HCL pH 8.8 al 1.5 M hasta que las muestras viraran a una coloración azul intenso. Posterior a eso, las muestras se calentaron durante 5 minutos a 100°C.

Se preparó el gel de separación de 12% y el de compactación al 4% por duplicado, se esperó el tiempo de polimerización y se procedió a cargar las muestras en carriles diferentes para su análisis individual. Como marcador de MM se utilizó dual color de Bio-Rad, con un intervalo de 10 a 250 kDa. Las muestras se corrieron en 1 hora.

Una vez que el gel terminó de correr, las muestras se fijaron durante una hora en solución fijadora para posteriormente teñirlas con azul de Coomassie R-250 al 0.1%, en ácido acético al 10%, etanol al 40% y 50% de agua, para después desteñir el exceso y poder visualizar las proteínas. Se procedió a tomar las fotografías para el análisis de los geles.

5.12 Análisis estadístico

Para analizar todos los datos relacionados con el peso de los animales y de los órganos, y los datos de la calidad espermática (viabilidad, movilidad, anomalías morfológicas) se llevó a cabo un ANOVA con una prueba post-hoc de Tukey. Para los resultados relacionados con la concentración espermática se llevó a cabo la prueba "t" de Student. Para cada grupo se realizó una prueba de Homogeneidad de varianzas y distribución normal.

Los resultados del espectrómetro de masas son el resultado de varias mediciones que se suman, el aparato hace un promedio de las relaciones m/z y los presenta como medias, con un coeficiente de variación y con un valor de P. Los valores se consideraron con diferencia estadísticamente significativa con un valor de $p < 0.05$.

Capítulo 6 Resultados

6.1 Seguimiento del peso de los animales de experimentación

Durante el tiempo de administración de clotianidina, se realizó un registro del peso cada semana (Fig.7), esto con el fin de llevar un control a la hora de hacer los cálculos de la dosis de clotianidina para que estuvieran de acuerdo con el peso de cada rata y para llevar un registro de los posibles cambios que llegarán a ocurrir en cada grupo (Control, 2 y 10mg/kg). No se observó cambio en el peso de las ratas tratadas con respecto a los controles, tuvieron un crecimiento normal muy similar al del grupo control durante la administración del tóxico.

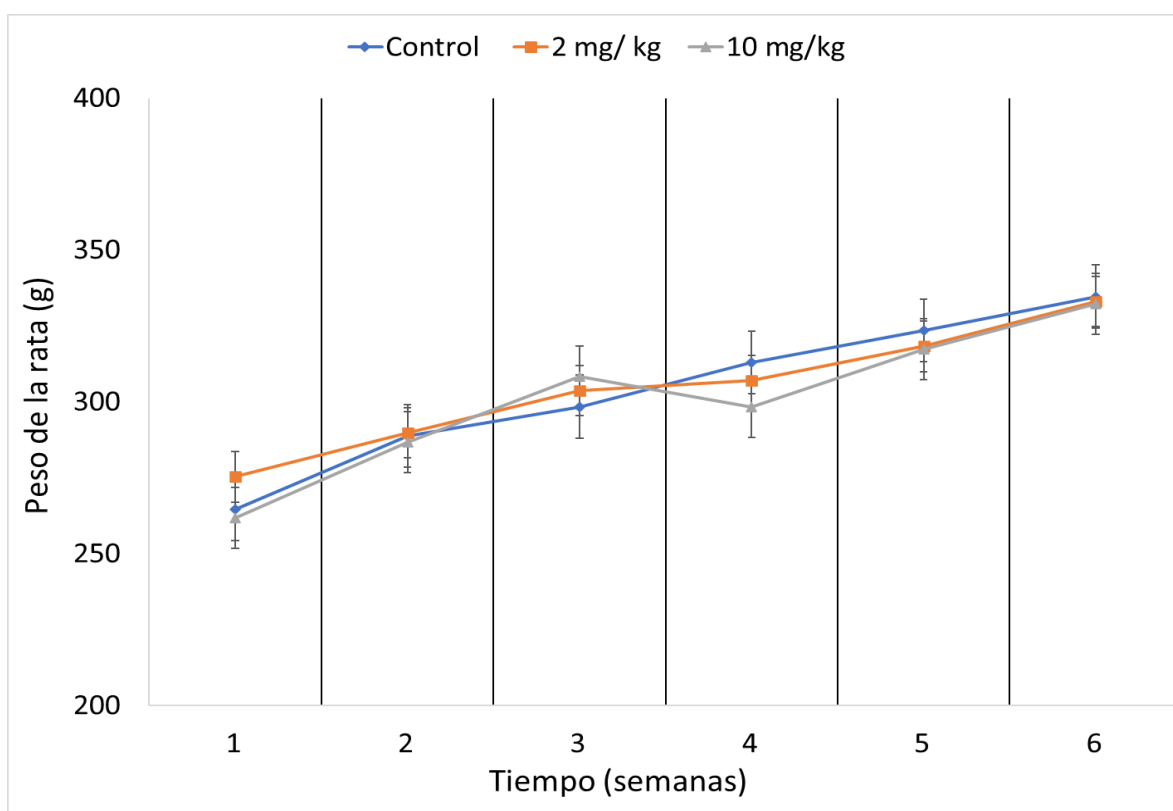


Figura 7. Peso de la rata de acuerdo con el tratamiento durante las 6 semanas, en azul se muestra el grupo control (administración únicamente con agua), en naranja el grupo de 2mg/kg/día y en gris el grupo de 10 mg/kg. Media \pm error estándar; $n=6$. Análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una $p<0.05$.

Antes de que cada grupo se sometiera a eutanasia en cámara de CO₂, se realizó el último registro del peso de cada rata (Fig.8). Los resultados no mostraron diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y los grupos de ratas tratados con las diferentes dosis (2 y 10 mg/kg/día), el tóxico no tuvo efecto en el crecimiento de los animales, desde el inicio hasta el término de la administración.

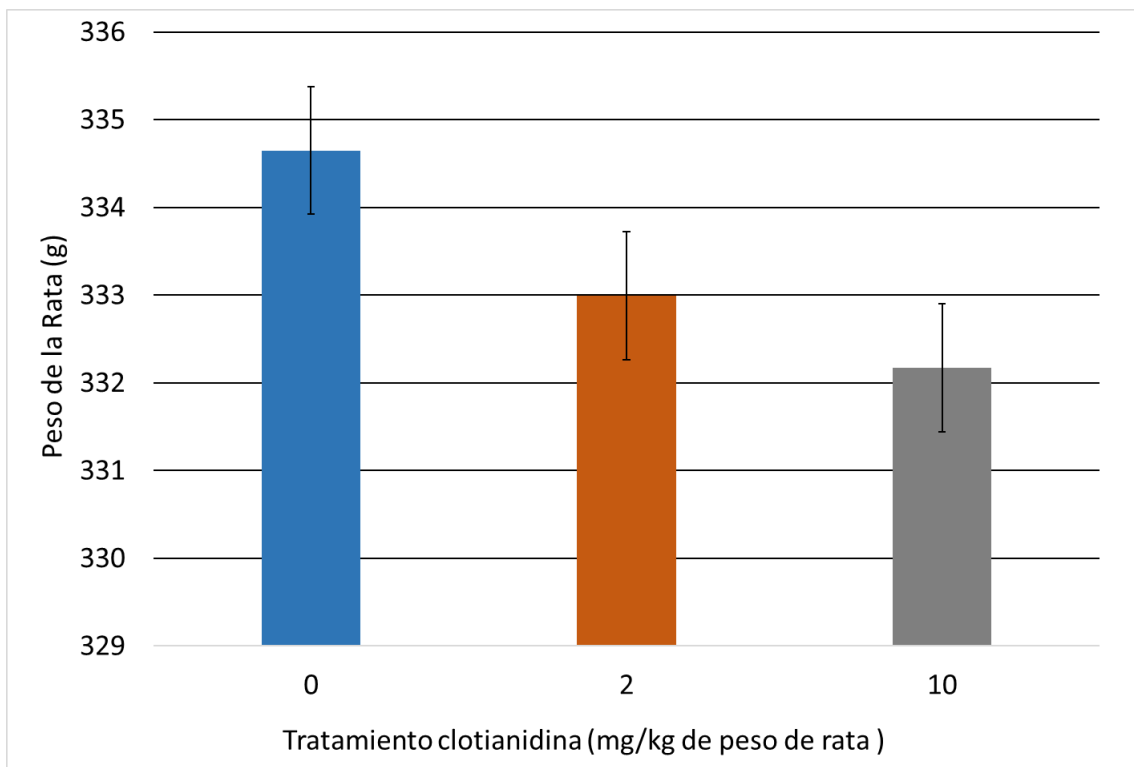


Figura 8. Último registro del peso de las ratas tratadas con clotianidina durante 6 semanas consecutivas, en azul se encuentra el promedio de los pesos de las ratas del grupo control (tratados únicamente con agua potable), en naranja el promedio de las ratas del grupo de 2 mg/kg/día y en gris el grupo de 10 mg/kg. Media \pm error estándar; n=6. Análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una $p < 0.05$.

6.2 Disección del testículo y epidídimo

Se obtuvieron los testículos de lado izquierdo como el derecho, no se observó diferencia estadísticamente significativa entre el peso de los testículos izquierdos como derechos, así como entre cada tratamiento (control, 2 y 10 mg/kg/día). (Fig.9). El tratamiento con clotianidina no alteró el peso de los testículos.

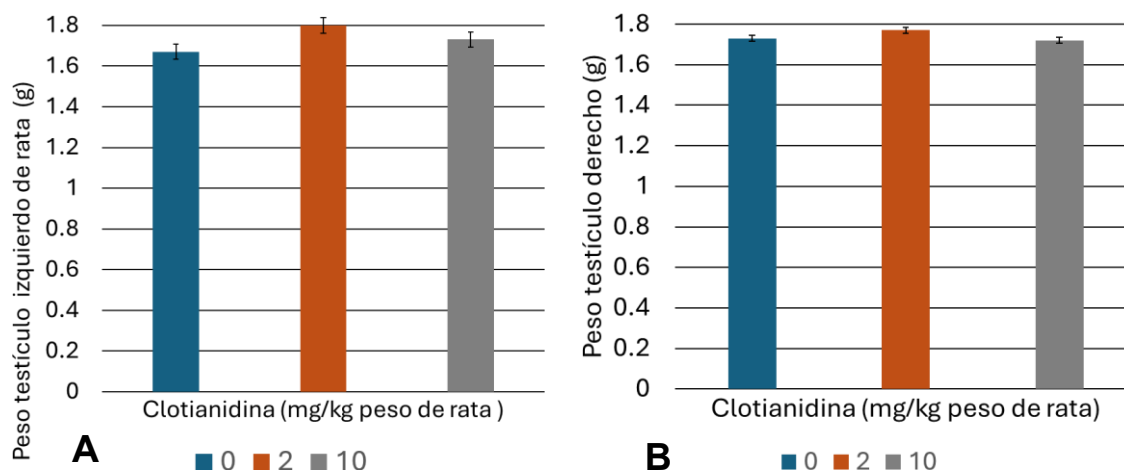


Figura 9. Pesos de los testículos. A) Testículos izquierdos del grupo control, 2 y 10 mg/kg/día respectivamente. B) Testículos de lado derecho del grupo control, 2 y 10 mg/kg/día respectivamente. Media \pm error estándar; n=6 Análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una $P < 0.05$. Valores de P (Testículo Derecho $p = 0.392$ y Testículo izquierdo $p = 0.876$).

Se realizó el índice gonadosomático dividiendo el peso de los órganos entre el peso total de la rata y se observó que la clotianidina no afectó el índice gonadosomático en las ratas macho adultas (Tabla 7).

Tabla 7. Índice gonadosomático.

Dosis mg/kg/día	Testículo (g)	
	Izquierdo	Derecho
0	0.5	0.52
2	0.54	0.53
10	0.52	0.51

Se calculó el promedio del peso de los testículos en relación con el peso total de cada rata. No se observó una diferencia significativa de los testículos izquierdos, ni de los derechos. Media \pm error estándar; n=6. Análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una $P < 0.05$.

6.2.1 Análisis morfológico testicular

Se analizaron morfológicamente los testículos de cada tratamiento y observamos testículos hemorrágicos a medida que se incrementaba la dosis del tóxico (Fig. 10), no se observaron cambios en el grosor ni en el color de la túnica albugínea; tampoco en el tamaño, ni la forma de cada testículo.

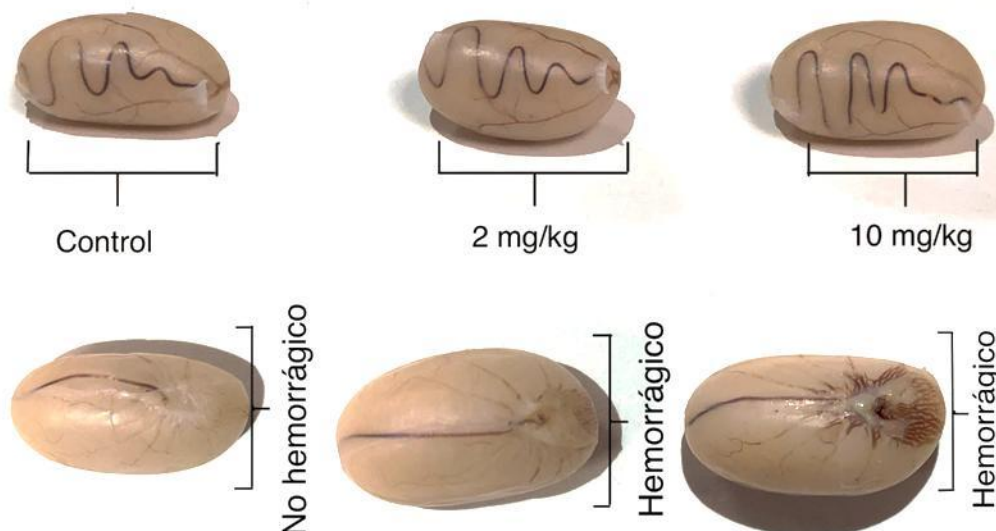


Figura 10. Testículos de rata macho tratados con diferentes dosis de clotianidina.

Se realizó una sola medición en ImageJ (Tabla 8) para analizar la medida exacta de los testículos en cada tratamiento, al ser una sola medición, no se aplicó ningún tratamiento de datos, ya que estos datos sirvieron para complementar los posibles cambios observados al comparar los órganos (Fig.10).

Tabla 8. Mediciones de los testículos de rata tratada con clotianidina.

Tratamiento (mg/kg)	Longitud (cm)		Área (cm ²)
	Ancho	Largo	
Control	2.16	4.1	8.8
2	2.2	3.8	8.3
10	2.2	3.9	8.6

6.2.2 Epidídimo

El peso en cada uno no presentó diferencia significativa entre los epidídimos izquierdos y derechos (Fig.11). El tratamiento con Clotianidina a dosis Noael (10 mg/kg) y dosis por debajo de la Noael (2 mg/kg) de acuerdo con lo observado con el grupo control, no disminuyó el peso del epidídimo.

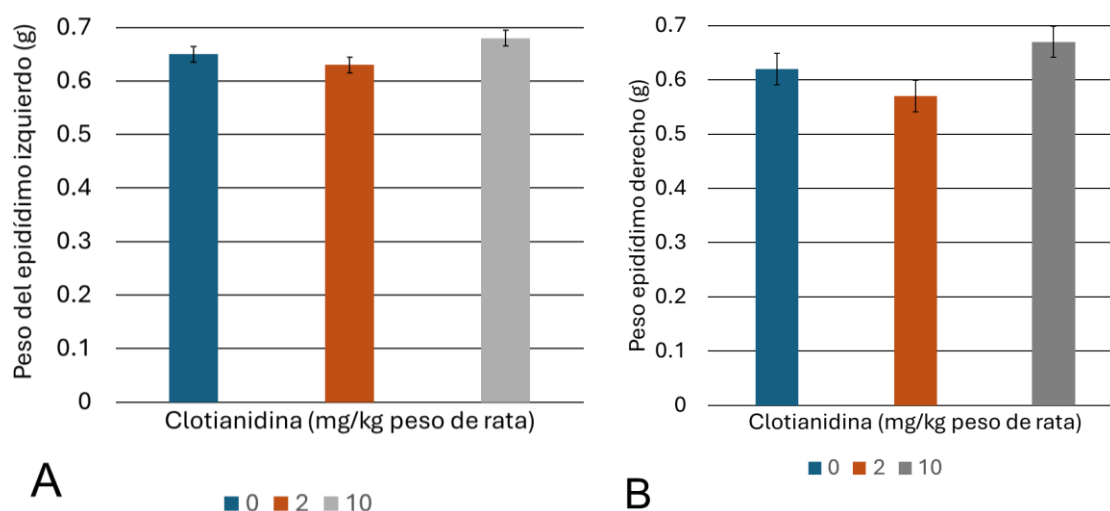


Figura 11. Peso del epidídimo de ratas tratadas con Clotianidina. A) pesos del epidídimo izquierdo del grupo control, 2 y 10 mg/kg/día respectivamente. B) pesos del epidídimo derecho del grupo control, 2 y 10 mg/kg). Media \pm error estándar; n=6 Análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una $P < 0.05$. (Epidídimo derecho valor $p = 0.616$ y epidídimo izquierdo valor $p = 0.176$).

Se calculó el índice gonadosomático indicando el peso de los órganos en relación con el peso total de la rata y se observó que clotianidina no afectó el índice gonadosomático epididimario en las ratas macho adultas (Tabla 9).

Tabla 9. Índice gonadosomático de epidídimos de ratas con respecto al peso final de las ratas tratadas con clotianidina.

Dosis mg/kg/día	Epidídimo (g)	
	Izquierdo	Derecho
0	0.18	0.19
2	0.17	0.19
10	0.2	0.2

Se calculó el promedio de la relación peso de los epidídimos (6 por grupo) entre el peso de cada rata. No se observó una diferencia significativa de los epidídimos izquierdos, ni de los derechos. Media \pm error estándar; n=6 Análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una $P < 0.05$.

6.3 Análisis Morfológico

Comparamos visualmente los epidídimos de cada rata para ver si había alguna diferencia en su estructura, en el caso de los epidídimos de la dosis de 10mg/kg/día el conducto deferente más delgado en un epidídimo por tratamiento epidídimos del mismo grupo.

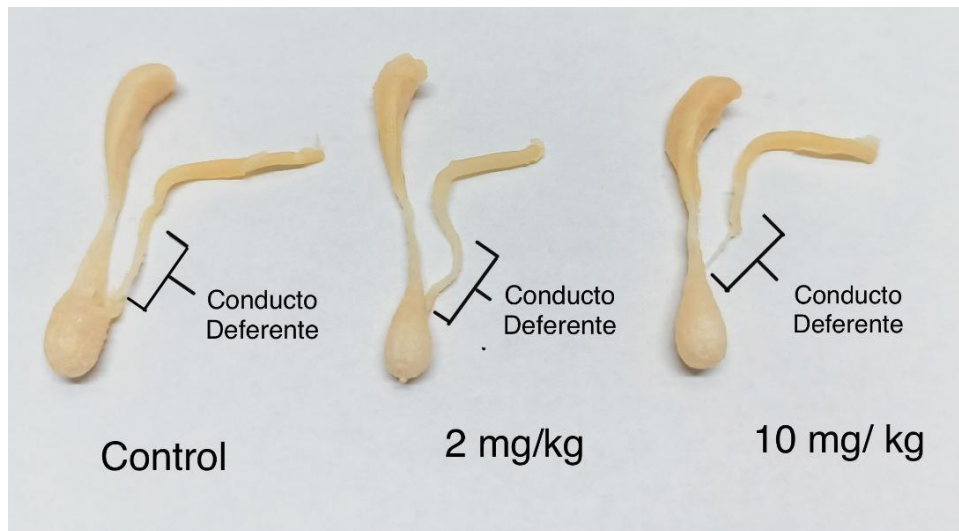


Figura 12. Epidídimos de rata tratados con diferentes dosis (0,2 y 10 mg/kg/día) de clotianidina, se observa que a mayor dosis hay una modificación del grosor del conducto deferente y del corpus en los grupos tratados con 2 y 10 mg/kg/día, no se observó diferencia en la cabeza, ni en la cauda epididimaria.

Se midieron los epidídimos una sola vez, en ImageJ para cada tratamiento, al ser una sola medición no se aplicó ningún tratamiento de datos, esta medición nos sirvió para complementar las diferencias observadas en la imagen comparativa (Fig.12) (Tabla 10).

Tabla 10. Mediciones realizadas en ImageJ de epidídimos para cada tratamiento.

Tratamiento (mg/kg)	Área (mm)		
	Caput	Corpus	Cauda
Control	111.99	40.94	101.42
2	83.95	17.46	76.13
10	100.54	20.02	86.065

La unidad de medida fue en píxeles, px y se convirtieron a mm en proporción con una regla en ImageJ.

6.4 Evaluación espermática (Análisis microscópico)

6.4.1 Concentración espermática

De acuerdo con los datos obtenidos no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Se demuestra así que el tratamiento con clotianidina a dosis Noael (10 mg/kg/día) y dosis por debajo de la Noael (2 mg/kg/día) no disminuye la concentración espermática en comparación con nuestro grupo control (Fig.13). Sin embargo, se observa una tendencia al incrementar la concentración en los grupos con tratamiento. $1 \times 10^6/\text{mL}$.

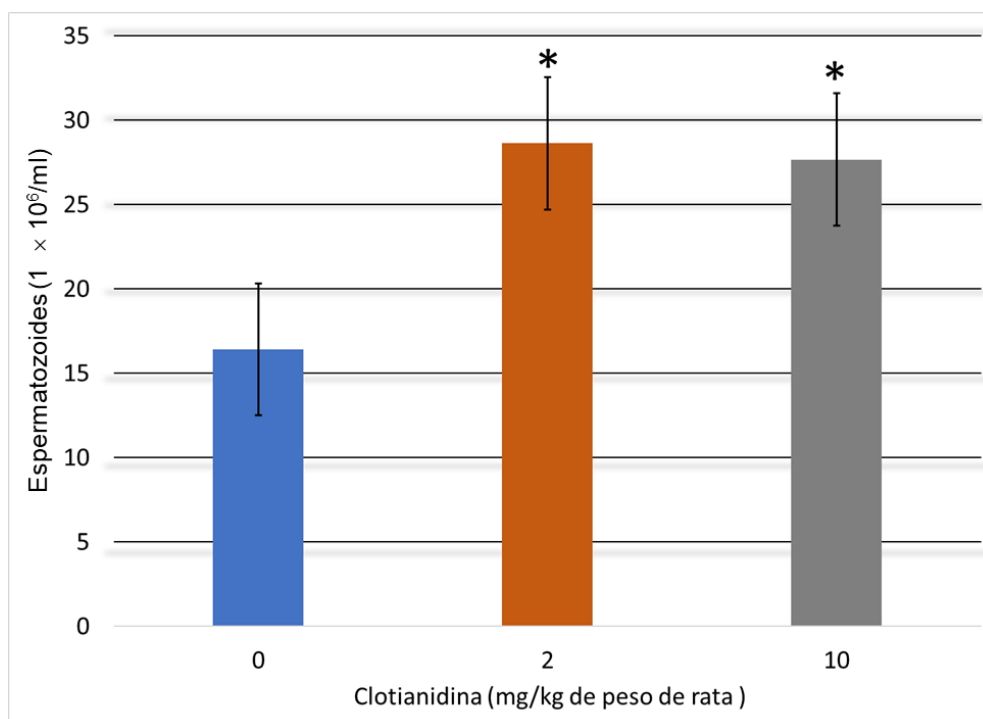


Figura 13. Concentración espermática por mililitro de cada grupo, en azul se encuentra el grupo control, en naranja el grupo 2mg/kg/día y en gris el grupo de 10 mg/kg/día. Media \pm error estándar; n=6 Análisis por T-Student con una $p < 0.05$.

6.4.2 Viabilidad

Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y las dos dosis evaluadas (Fig. 14) la administración del tóxico a 2 y 10 mg/kg/día reduce la viabilidad espermática (44 %,45% respectivamente) comparado con el control que fue de 66%, lo que sugiere que la clotianidina afecta la viabilidad espermática a dosis Noael y por debajo de la misma (2 mg/kg/día) cuando son administradas de manera crónica.

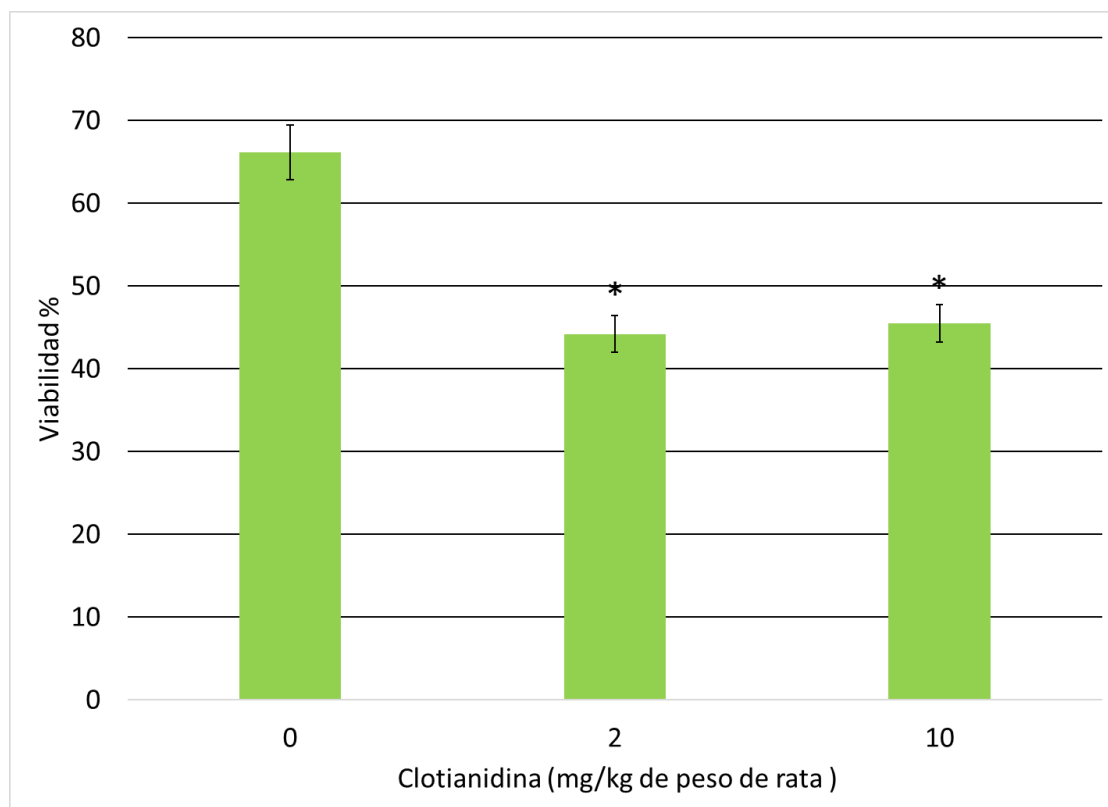


Figura 14. Viabilidad espermática de ratas tratadas con clotianidina en dosis diferentes (0, 2, 10 mg/kg/día), se muestra que al incrementar la dosis del tóxico disminuye la viabilidad. * Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con las dosis y el grupo control. Media \pm error estándar; n=6. Análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una $p < 0.05$ (valor p.0.000).

6.4.3 Anormalidades

Después de la recopilación de los datos los resultados fueron los siguientes (Fig.15), se observó que el grupo a la concentración de 2 mg/kg/día presentó un mayor porcentaje de anormalidades en comparación con el control y con el grupo 10 mg/kg/día. Las anormalidades observadas se clasificaron de acuerdo con sus características (Tabla 11).

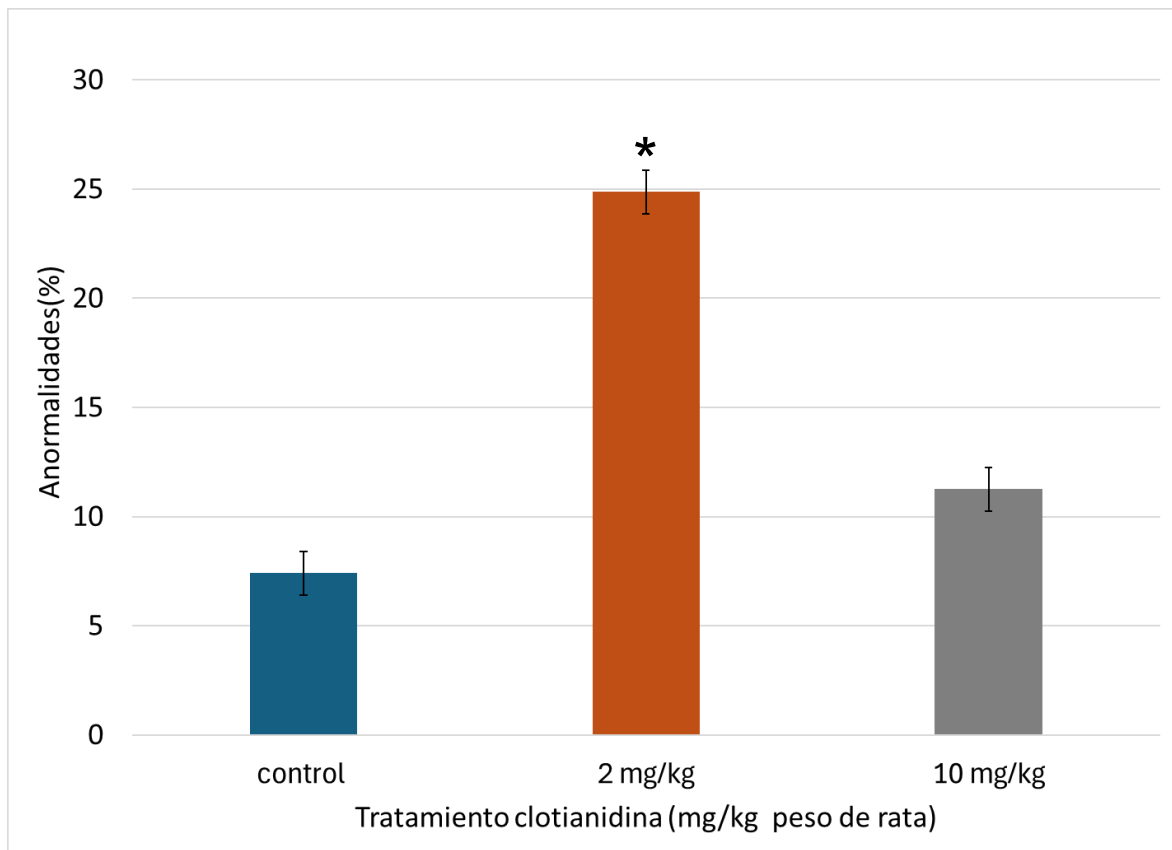


Figura 15. Anormalidades producidas por la clotianidina en espermatozoides de rata. En azul se muestra el porcentaje del grupo control, en naranja el porcentaje de anomalías del grupo de 2 mg/kg/día y en gris el porcentaje del grupo de 10 mg/kg/día. Media \pm error estándar; n=6. * Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo control. Análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una $p < 0.05$. (valor $p = 0.001$).

Tabla 11. Anormalidades espermáticas en cada grupo.

Tratamiento (mg/kg/día)	Cabeza (%)	Pieza media (%)	Flagelo (%)	Residuo citoplasmático (%)	Exceso citoplasma residual (%)
Control	0	0	0.4	6.96	0
2	0.33	0	0.5	16.17*	8.29*
10	0	0	0.1	10.71	0.46

Porcentaje de cada anomalía encontrada. Media \pm error estándar; n=6. Análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una $p < 0.05$. * Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo control.

Los residuos citoplasmáticos fueron una de las anormalidades más encontradas en el análisis morfológico de los espermatozoides tomados de la cauda y el conducto deferente del epidídimo de rata fueron los residuos citoplasmáticos (Fig. 17), los espermatozoides del tratamiento de 2 mg/kg/día presentaron una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo control.

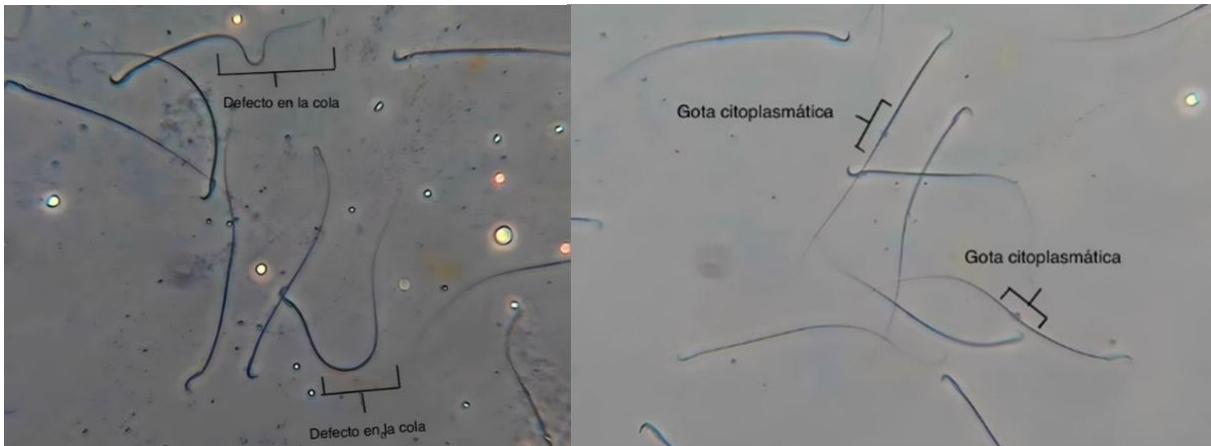


Figura 16. Anormalidades encontradas, espermatozoides de rata observados en el microscopio de contraste de fase a 400x, estas muestras no tienen ninguna tinción.

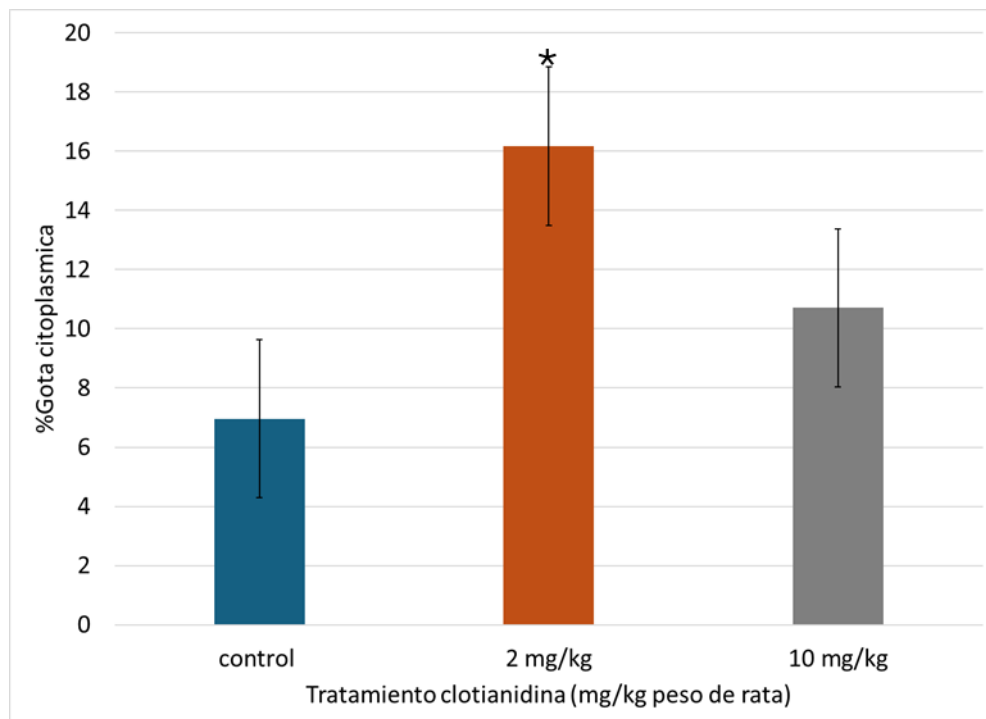


Figura 17. Residuos citoplasmáticos encontrados en la pieza principal del flagelo. En azul se muestra el porcentaje del grupo control, en naranja el porcentaje de anormalidades del grupo de 2 mg/kg/día y en gris el porcentaje del grupo de 10 mg/kg/día. Media \pm error estándar; n=6. * Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo control. Análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una $p < 0.05$. (valor $p = 0.034$).

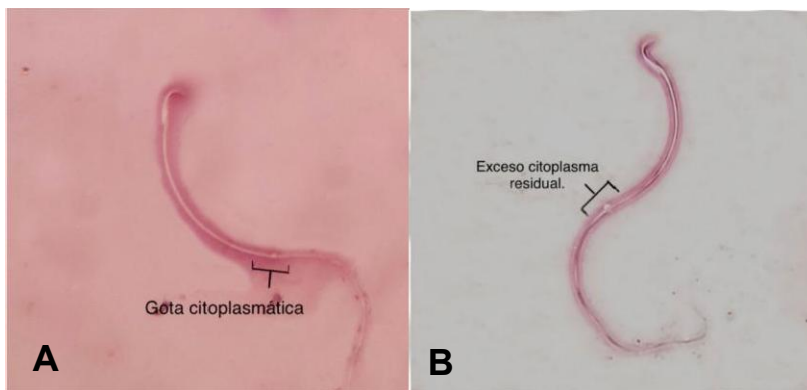


Figura 18. Espermatozoide de rata teñido con eosina-nigrosina visto a un aumento de 400x en microscopio óptico A) Espermatozoide con gota citoplasmática en la pieza principal del flagelo; B) Espermatozoide con exceso de citoplasma residual en la pieza principal del flagelo.

6.4.4 Movilidad

Se observaron las células al microscopio de contraste de fases, sin ninguna tinción a un aumento de 400x.

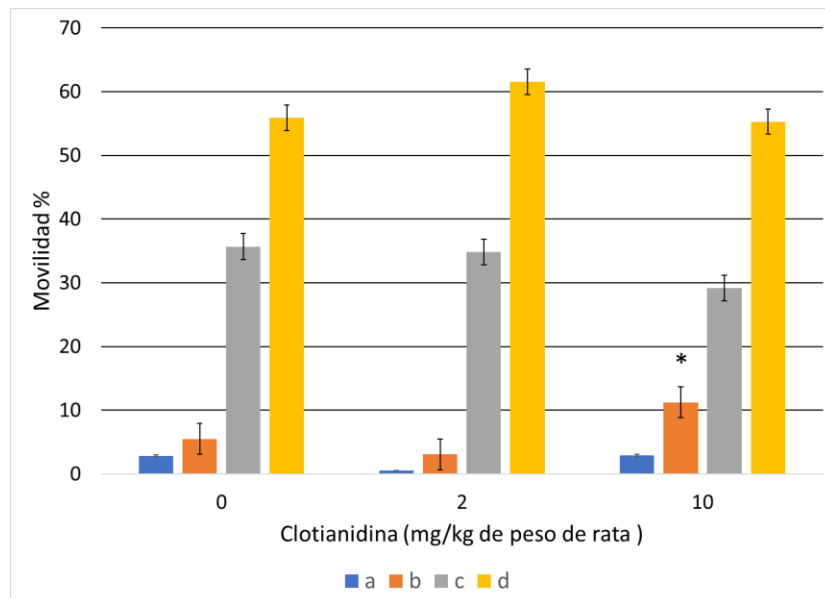


Figura 19. Porcentaje de movilidad espermática de rata tratadas con clotianidina, a) progresiva rápida, b) progresiva lenta; c) no progresiva y d) inmovilidad. En azul se encuentran los porcentajes del grupo control, en naranja los del grupo 2mg/kg/día y en gris los del grupo 10mg/kg. Media \pm error estándar; n=6. Análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una $p < 0.05$.

6.5 Perfil proteómico espermático

6.5.1 Nueva entrada en la base de datos

Se creó una nueva entrada para la base de datos en el equipo de espectrometría de masas MALDI-TOF a partir de muestras espermáticas del grupo control, se obtuvo un total de 32 espectros de los cuales se seleccionaron 21 de ellos ya que cumplían la tolerancia de 500 ppm, es decir que la diferencia de valores fuera menor a 2.5 Da por unidad de área en cada pozo sembrado, los picos seleccionados no salían ni por arriba ni por debajo del promedio visualizado de los picos obtenidos en su totalidad. Se cumplió con el mínimo de espectros obtenidos para la creación de la nueva entrada en la base de datos, que fue de un total de 21.

Se obtuvo un espectro que corresponde al promedio de la selección de los 21 espectros (Fig. 20) en donde se observan varios picos, cada uno de ellos representa una proteína diferente; el eje de las "Y" corresponde a la abundancia relativa de cada una de ellas y el eje de la "X" a la relación m/z.

Se obtuvo una lista de un total de 120 proteínas de las muestras espermáticas del grupo control con el que se construyó la nueva entrada, estas proteínas estaban en un intervalo de 2 a 16 kDa. En la tabla 12 se muestra una lista con datos como son la abundancia relativa, la intensidad de los picos y su área. De las 120 proteínas, 26 de ellas tuvieron mayor resolución, es decir que fueron picos bien separados en el espectro; además tuvieron mayor intensidad.

Es esencial tomar en cuenta la resolución de estos picos, ya que el equipo los toma para las múltiples comparaciones realizadas con los espectros de otras muestras o para la comparación con otras entradas en la base de datos.

Tabla 12. Masas asignadas en el espectro de la Fig.20. Se ejemplifican los picos que tienen mayor resolución entre las 120 proteínas totales obtenidas.

m/z	Intensidad	Intensidad relativa	Área
2421.16	1157	6.27	9789
2716.84	2031	11	15449
3120.49	4474	24.3	38215
3429.47	18447	100	176178
4332.6	9636	52.2	138660
4925.03	8741	47.4	159642
5195.02	1387	7.52	14900
5637	13264	71.9	172159
6297.36	11356	61.6	243355
6651.01	1237	6.71	16315
6666.06	1392	7.55	20021
6681.53	838	4.54	5195
7000.01			
7507.49	798	4.33	10998
7989.15	1256	6.81	19635
8666.14	13993	75.9	325868
8927.51	2106	11.4	56909
8969.98	2701	14.6	72612
9564.49			
9850.41	9729	52.7	317667
10919.11			
11910.77			
12268.87	5536	30	161353
13410.78			
15199.78			
15820.94			

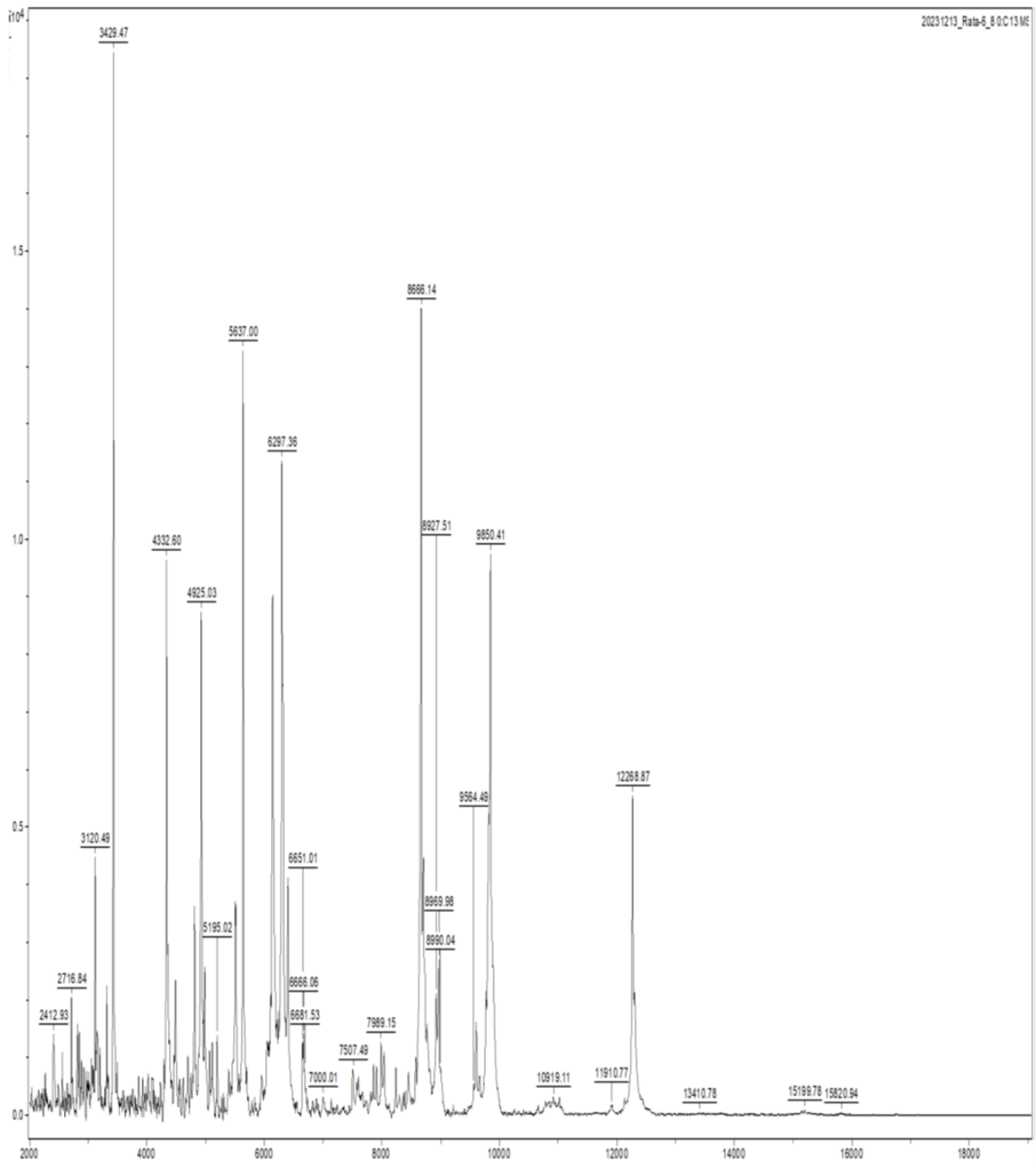


Figura 20. Espectro de proteínas espermáticas del grupo control en un rango de 2 a 16 kDa.

Se comparó la base de datos con el grupo control con aproximadamente 300 entradas de las bases de datos de bacterias y de hongos que se encontraban en el equipo. Con la finalidad de verificar que no existía similitud entre ellas y que la nueva entrada de la base de datos estuviera bien construida. El equipo emplea criterios para la comparación que son: el valor m/z, la intensidad y la resolución de los picos que son componentes que se toman en cuenta al momento de la comparación de los espectros; el equipo además asigna intervalos con color que facilitan la lectura de los resultados (Tabla 13) y la superposición de las comparaciones entre espectros (Fig. 21).

Tabla 13. Intervalos asignados para determinar si existe similitud entre los espectros comparados, el intervalo va de 0 a 3.

Intervalo	Descripción
2.000-3.000	Identificación de especies altamente probable
1.700 - 1.999	Probable identificación del género
0.0 - 1.699	identificación no confiable

El equipo también nos proporcionó una superposición del espectro de la base de datos de rata control contra la base de datos comparada del equipo (Fig. 21) de esta manera podemos visualizar más claramente la diferencia entre cada espectro por colores, verde, rojo y amarillo (Tabla 14) que corresponden al intervalo asignado según la similitud entre los espectros, es decir que los picos con mayor resolución, intensidad y valor m/z sean constantes en cada espectro comparado.

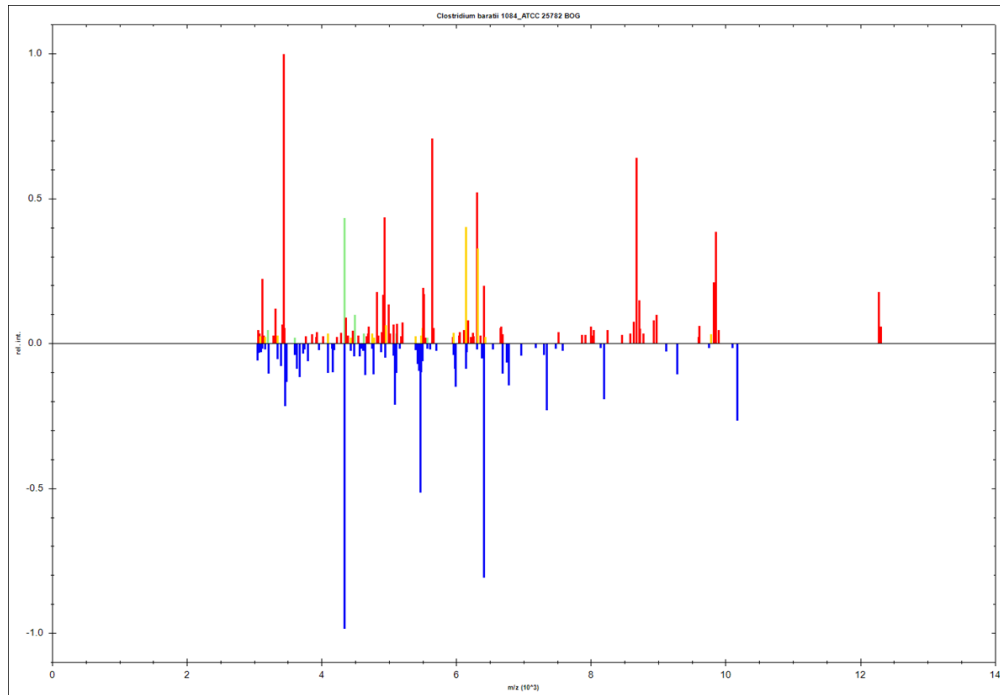


Figura 21. Superposición entre espectros Ejemplo de una de las comparaciones de la base de datos de rata control y base de datos Bruker - *Clostridium baratii* bacteria anaeróbica. En la parte superior se observa el espectro de la bacteria *Clostridium baratii* y en la parte inferior la nueva entrada para la base de datos de muestras espermáticas del grupo control. Se observa que los picos mayoritariamente están en color rojo, lo que indica que no hay similitud en ambos espectros; intervalo= 1.25.

Cada una de las comparaciones realizadas estuvieron en un intervalo por debajo de 1.669, lo que quiere decir que no existe similitud con los espectros de las 300 entradas de la base de datos existente de bacterias y hongos; en la tabla 14 se ejemplifican 10 comparaciones diferentes con el rango asignado respectivamente y el nombre de la especie comparada.

Tabla 14. Comparación base de datos de rata control y 10 bases de datos diferentes Bruker.

Patrón comparado	Intervalo	NCBI
<i>Clostridium baratii</i> 1084_ATCC 25782 BOG	1.25	1561
<i>Paeniglutamibacter sulfureus</i> B571 UFL	1.2	43666
<i>Agrobacterium radiobacter</i> B177 UFL	1.18	358
<i>Staphylococcus epidermidis</i> DSM 1798 DSM	1.14	1282
<i>Ligilactobacillus salivarius</i> DSM 20492 DSM	1.14	1624
<i>Aeromonas molluscorum</i> 848T DSM	1.12	271417
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 49226 THL	1.11	485
<i>Amylolactobacillus amylophilus</i> DSM 20534T DSM	1.1	376807
<i>Streptomyces</i> sp HKI 48 HKJ	1.1	1883
<i>Fusarium proliferatum</i> 11204740 MVD	1.1	42674

6.5.2 Análisis comparativos con los grupos experimentales

Comparación entre grupo control y 2 mg/kg/día

En la Fig. 22 se muestra el espectro de los espermatozoides del grupo de ratas tratadas con 2 mg/kg/día, se observan picos con masa asignada, cada uno de estos representa una proteína diferente, en el eje de las "Y" corresponde a la abundancia relativa de cada una de ellas y en eje de la "X" la relación m/z.

Se obtuvo una lista de masas para el grupo 2 mg/kg/día en el intervalo de 2 a 16 kDa, en promedio de 72 proteínas, de las cuales 20 de ellas fueron con mayor resolución e intensidad y se tomaron en cuenta para la comparación con la base de datos del grupo control (Tabla 15).

Tabla 15. Lista de masas asignadas al espectro del grupo de 2 mg/kg/día (Fig. 22).

m/z	Intensidad	Área
2413.10	589	
2848.3	798	6600
3122.89	2330	20408
3431.74	9698	92595
4334.29	4057	57198
4925.12	2485	55504
5637.26	3876	50761
6298.20	4892	96852
6665.95	888	18791
7509.65	309	
8036.70	611	10950
8664.46	5496	116879
8923.59	336	7033
8950.24	282	3377
8968.29	530	9484
9847.47	2473	68750
10920.61	91.9	
11914.85	70.7	
13366.57	17.4	
15198.54	20.1	

Se muestran los picos tomados en cuenta para la comparación entre espectros. En la tabla se muestra el valor masa carga (m/z), la intensidad de los picos y su área.

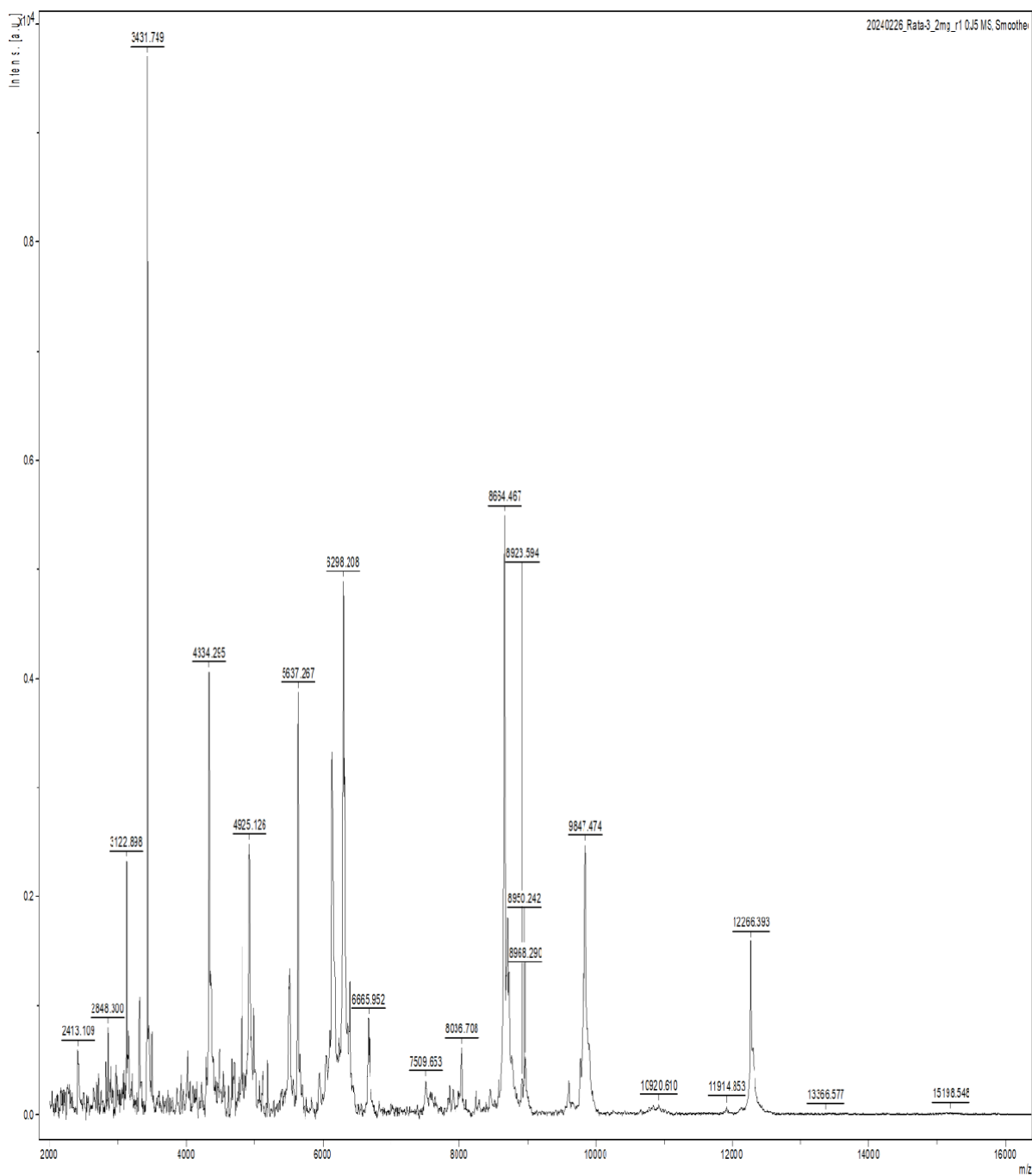


Figura 22. Espectro que muestra proteínas en un rango de 2 a 16 kDa de espermatozoides del grupo 2 mg/kg/día, los picos con mayor resolución e intensidad fueron tomados en cuenta para la comparación entre espectros.

Se realizó la comparación entre las muestras de espermatozoides tratados con 2 mg/kg/día de clotianidina y la nueva entrada en la base de datos creada con espermatozoides del grupo control; esto se realizó en MSP Creation (entradas de bases de datos personalizadas). Una ventana de adquisición en Biotyper en donde se guardan aquellos espectros adquiridos en el equipo. El programa tomó criterios diferentes para la comparación y asignó intervalos que facilitaron la lectura de los resultados como se explicó anteriormente (Tabla 12); el valor m/z, la intensidad y la resolución de los picos son criterios que nos indican si existe homología entre las muestras comparadas para realizar identificaciones especie específicas entre las muestras.

El programa también nos proporcionó una superposición del espectro de la base de datos de rata contra la muestra espermática analizada (Fig. 23), de esta manera podemos visualizar más claramente la diferencia entre cada espectro por colores: en Verde aquellos picos o proteínas que son iguales en los tres criterios evaluados (m/z, intensidad y resolución de los picos); en amarillo los que podrían tener similitud en alguno de estos criterios y en rojo aquellos que no tienen similitud alguna, los valores asignados son de acuerdo con el intervalo obtenido (Tabla 16).

Tabla 16. Comparación de la base de datos creada con muestras espermáticas de grupos tratados con 2 mg/kg/día.

Ratas tratamiento 2 mg/kg/día	Grupo comparado	Score
1	control	2.38
2	control	2.4
3	control	2.61
4	control	2.5
5	control	2.37
6	control	2.34

Score obtenido en cada comparación fue mayor a 2.00, nos indica las muestras provienen de organismos de la misma especie.

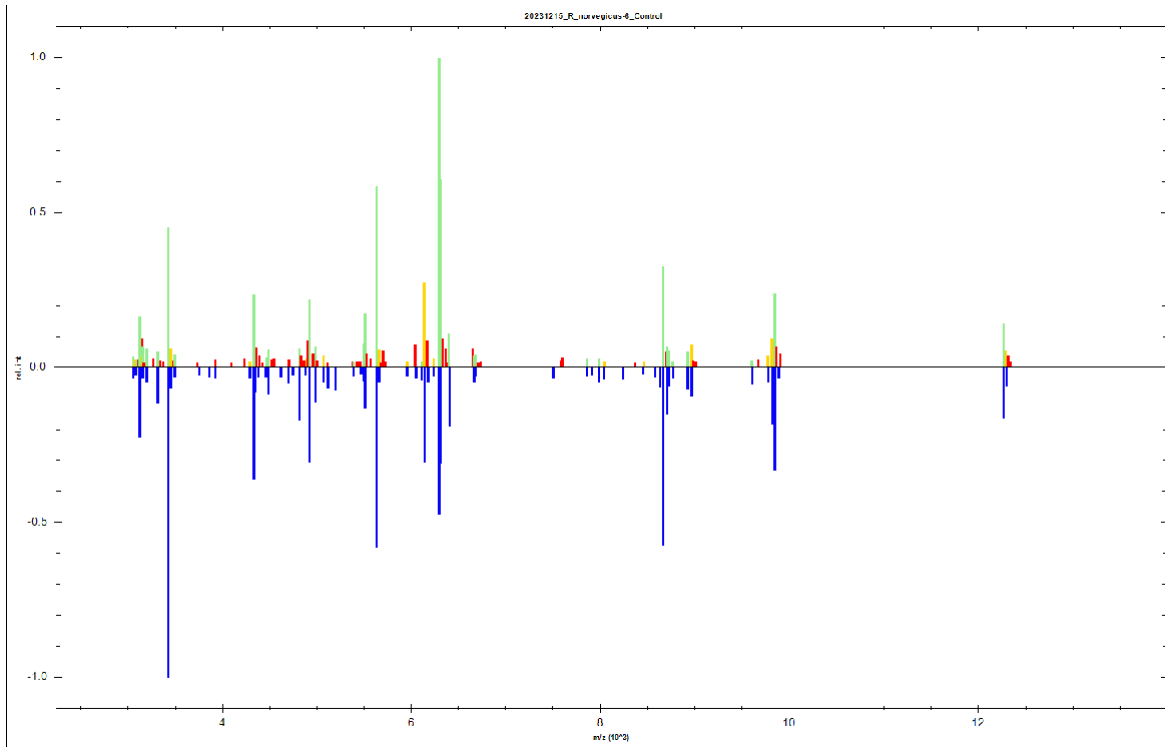


Figura 23. Superposición entre espectros. Ejemplo de una de las comparaciones de las proteínas espermáticas del grupo 2 mg/kg/día y la base de datos creada a partir de proteínas espermáticas del grupo control. Se obtuvo un intervalo mayor a 2.30, en azul se observa los espectros del grupo control y de colores (verde, amarillo y rojo) el grupo tratado con 2 mg/kg/día.

Comparación entre grupo control y 10 mg/kg

Se obtuvo el espectro de la figura 24 de los espermatozoides del grupo de ratas tratadas con 10 mg/kg/día en el cual se muestran los picos con mayor resolución, que el equipo toma en cuenta para la comparación con la base de datos creada con espermatozoides de las ratas del grupo control, se observan varios picos y cada uno de ellos representa una proteína diferente; el eje de las “Y” corresponde a la abundancia relativa de cada una de ellas y el eje de la “X” a la relación m/z.

Se obtuvo un total de 66 proteínas en el intervalo de 2 a 16 kDa de las cuales 19 de ellas tuvieron mayor resolución e intensidad y se tomaron en cuenta para la comparación con la base de datos del grupo control (Tabla 17).

Tabla 17. Lista de masas asignadas en el espectro del grupo 10 mg/kg/día (Fig.23).

m/z	Intensidad	Área
2542.06	1163	8505
3123.72	2526	26990
3431.53	5364	54534
3763.12	1037	12068
4334.11	1861	26825
4541.78	571	
4925.73	2599	72906
5637.84	3520	49783
6143.89	6550	142387
6464.46	481	
6651.45	736	11976
6999.42	204	
7514.65	223	
8035.71	652	13096
8665.52	2706	63597
9848.39	3066	110108
10917.59	110	
12267.67	1099	24966
15234.21	29.1	

Se muestran los picos tomados en cuenta para la comparación entre espectros. En la tabla se muestra el valor masa carga (m/z), la intensidad de los picos y su área.

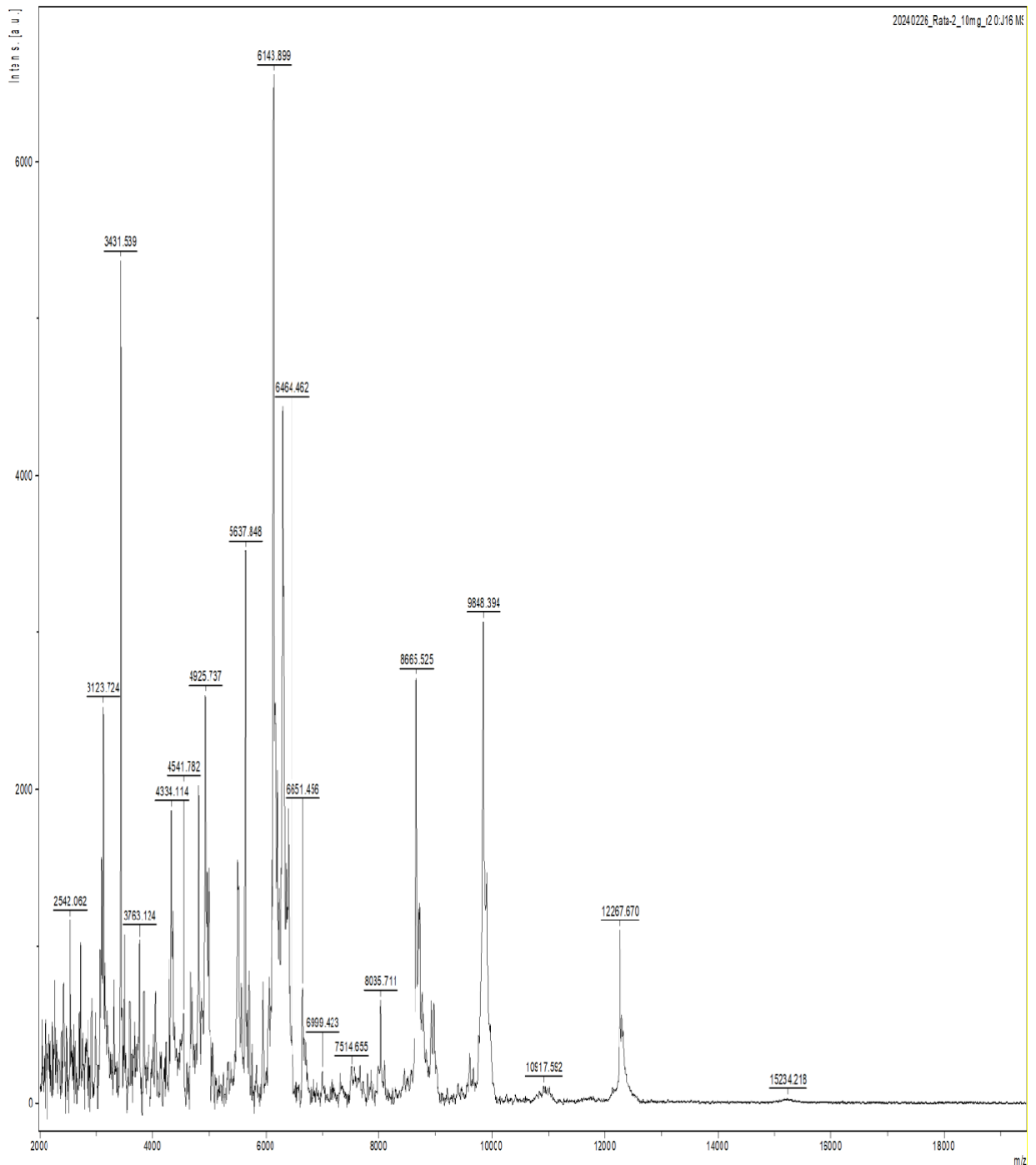


Figura 24. Espectro que muestra proteínas en un rango de 2 a 16 kDa de espermatozoides del grupo 10 mg/kg/día; de los picos con mayor resolución e intensidad fueron tomados en cuenta para la comparación entre espectros.

Se realizó la comparación entre muestras de espermatozoides tratados con 10 mg/kg/día de clotianidina y la nueva entrada en la base de datos creada con espermatozoides del grupo control, de la manera antes explicada (Tabla 12). El valor m/z, la intensidad y la resolución de los picos son criterios que nos indican si existe homología entre las muestras comparadas para realizar identificaciones especie específicas entre las muestras.

El programa también nos proporcionó una superposición del espectro de la base de datos de rata del grupo control contra la muestra espermática del grupo 10 mg/kg/día (Fig.25) de esta manera se logró visualizar más claramente la diferencia entre cada espectro por colores; en verde los picos o proteínas que son iguales en los tres criterios (m/z, intensidad y resolución de los picos), en amarillo los que podrían tener similitud en alguno de estos criterios y en rojo los que no tienen similitud alguna, los valores se asignaron según el intervalo obtenido en la comparación (Tabla 18).

Tabla 18. Comparación de la base de datos creada con muestras espermáticas de grupos tratados con 10 mg/kg.

tratamiento		
Rata 10 mg/kg	Grupo comparado	Score
1	control	2.46
2	control	2.24
3	control	2.19
4	control	2.61
5	control	2.43
6	control	2.22

El score obtenido en cada comparación fue mayor a 2.00, nos indica que las muestras son iguales.

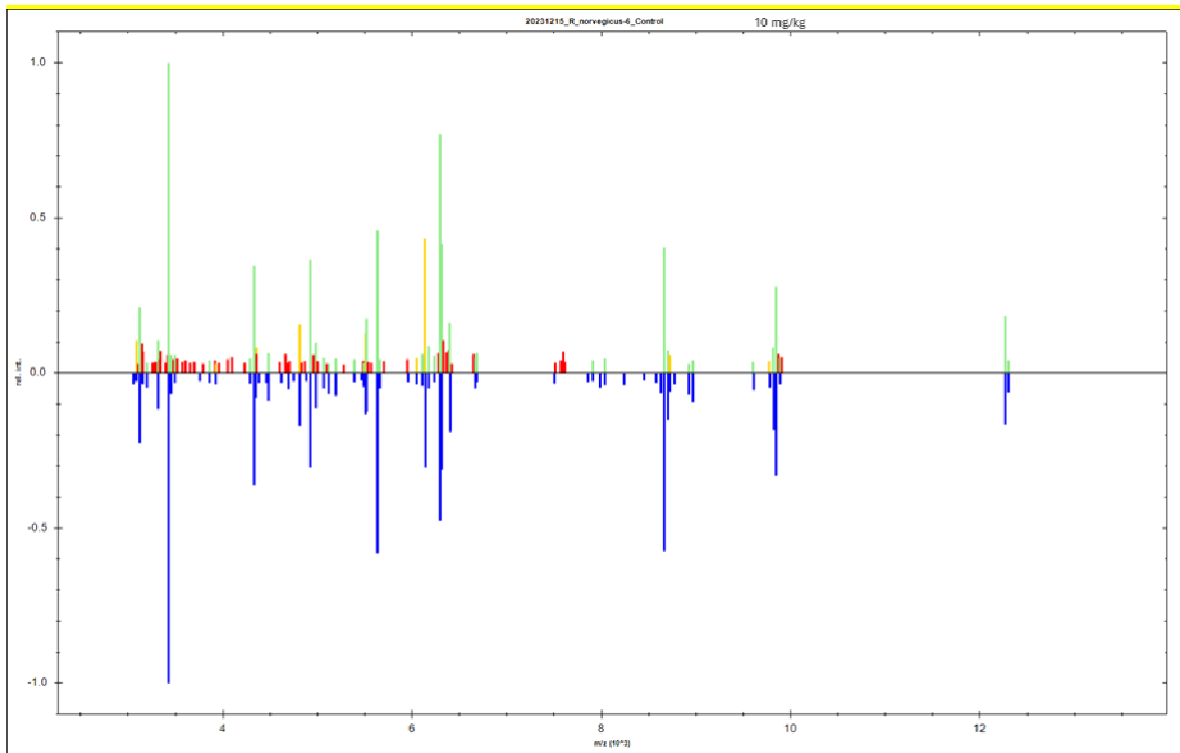


Figura 25. Superposición entre espectros. Ejemplo de una de las comparaciones de las proteínas espermáticas del grupo 10 mg/kg/día y la base de datos creada a partir de proteínas espermáticas del grupo control. Se obtuvo un intervalo mayor a 2.00; en azul se observan los espectros del grupo control y en verde, amarillo y rojo se observa el grupo tratado con 10 mg/kg/día.

Número total de proteínas.

El equipo proporciona la lista de masas de cada grupo tratado con 2 y 10 mg/kg/día comparado con la base de datos creada a partir del grupo control, de las cuales se obtuvo un promedio para cada tratamiento (Tabla 19); se observó una disminución en el número de proteínas en el intervalo de 2 a 16 kDa en los grupos experimentales.

Tabla 19. Promedio del número de proteínas proporcionado por el equipo para cada grupo: control, 2mg/kg/día y 10 mg/kg.

Tratamiento mg/kg	Número Promedio de Proteínas
0	120
2	72.4*
10	66*

Se observó una disminución considerable entre los grupos experimentales tratados con clotianidina. Media \pm error estándar; n=6. Análisis por ANOVA seguido de una prueba de TUKEY con una $p < 0.05$. *los asteriscos representan diferencia significativa con respecto al grupo control.

A continuación, se presenta el porcentaje de las proteínas según la MM para cada uno de los grupos analizados, en donde se observó una disminución de 60% de proteínas aproximadamente a lo largo del intervalo entre 2 a 15 kDa (Tabla 20).

Tabla 20. Número total de proteínas por masa molecular en el intervalo 2 a 15 kDa.

Intervalo kDa	0	2	10
2	6	1	1
3	13	4	5
4	18	6	7
5	12	3	3
6	25	16	16
7	6	1	1
8	16	8	7
9	11	5	5
10	3	1	0
11	2	0	0
12	3	2	1
13	1	0	0
15	4	0	0
Total # proteínas	120	46	46

Se observó una disminución en el número. En la primera columna se indica el intervalo de kDa de 2 a 2.999, 3 a 3.999, y así sucesivamente., 0 corresponde al grupo control, 2 al grupo 2mg/kg/día y 10 al grupo 10 mg/kg.

6.5.3 Electroforesis de proteínas de espermatozoides de rata tratadas con Clotianidina

Las proteínas espermáticas se corrieron en un gel de poliacrilamida al 12% para separar las proteínas totales para cada grupo, en un intervalo que va de 10 a 150 kDa. Después de analizar la movilidad electroforética relativa en el gel midiendo la distancia entre las bandas para el carril 0, 2 y 10 mg/kg/día de clotianidina, para determinar la masa molecular relativa para cada banda con respecto al estándar de masa molecular conocido y la movilidad electroforética. Las bandas indicadas en color rojo son las que no se encuentran en todos los carriles y las indicadas en amarillo, se observaron con mayor densidad óptica.

Se observó una disminución de las bandas en los grupos tratados con clotianidina (2 y 10 mg/kg/día), lo que nos indica que clotianidina disminuye el número total de proteínas (Fig. 26).

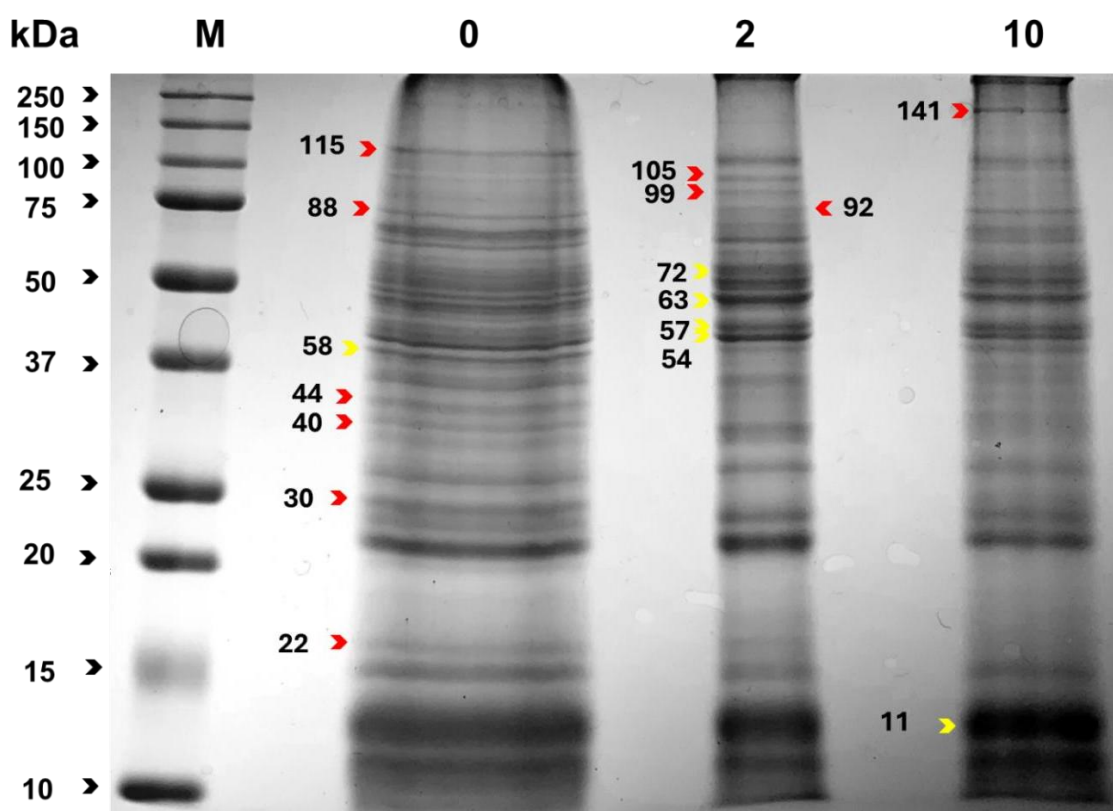


Figura 26. SDS-PAGE de proteínas solubles totales de espermatozoides de rata tratados con clotianidina. Tres muestras independientes en un intervalo de 10 a 150 kDa, en el primer carril se observa el marcador de masa molecular (M); el segundo se muestra el grupo control (0), en el tercero el grupo 2 mg/kg/día (2), y en el cuarto carril el grupo 10 mg/kg/día (10). En color rojo se indican las proteínas que no se encuentran en todos los carriles y en amarillo las proteínas con mayor densidad óptica. El análisis se realizó en ImageJ.

6.5.4 Posibles marcadores moleculares

Se realizó una búsqueda de proteínas en diferentes investigaciones y en UNIPROT, una base de datos de secuenciación in silico de proteínas; con la finalidad de recopilar información y proponer posibles marcadores moleculares para su futura identificación con respecto al daño visualizado con clotianidina.

Los criterios que se tomaron en cuenta para la selección de estas fueron la MM dentro del intervalo trabajado en MALDI-TOF, en el gel SDS-Page y proteínas de MM específico, que observamos que disminuyeron de manera significativa en los grupos tratados con clotianidina.

En la tabla 21 se observan las proteínas en un intervalo de 10 a 250 kDa que corresponde a ambas técnicas y en la tabla 22 los péptidos identificados de proteínas implicadas en funciones relacionadas con la estructura y el movimiento celular, actividades relacionadas con el ATP.

Tabla 21. Proteínas con masas moleculares diferentes.

Nombre proteína	kDa	Función/localización	Especie	Cita
nAChR 7	63	Pieza media espermatozoide	Ratón/rata	UNIPROT (Bal et al., 2013)
Isoenzima adenilato cinasa 1	22	Interacción espermatozoide ovocito/movilidad	Bovino	(Sullivan & Miesusset, 2016)
ADAM7	89	Fertilización	Rata	(Barrachina et al., 2022)
Sintetina	30	Interacción espermatozoide ovocito	Bovino	(Sullivan & Miesusset, 2016)
WFDC8	31	Pieza media espermatozoide	Ratón/humano	(Barrachina et al., 2022)
Protamina	6.9	Condensan ADN espermático.	Humano	
P18	15	Interacción espermatozoide ovocito	Humano	UNIPROT
SPINK2	9	Unión a zona pelúcida, y ensamblaje del acrosoma	Rata	UNIPROT
SPINK3	8	Reacción Acrosomal	Rata	UNIPROT
SPAG11B	12	Maduración espermática	Rata	Barrachina et al. (2022)
Actina	42	Movilidad, forma, función dinámica en la membrana espermática	Rata, ratón, humano, cobayo	(Flaherty Sp Fau - Winfrey et al., 1986)

En rosa se marcan aquellas proteínas adquiridas durante la maduración espermática.

Tabla 22. Proteínas espermáticas de gallo identificadas por medio de sus péptidos específicos por espectrometría de masas MALDI-TOF.

Nombre proteína	MM* (kDa)	Función/localización	Especie
Tubulina, alfa 3e	6.5	Pieza media espermatozoide	Gallo
Ubiquitina conjugada con la variante de la enzima E2	4.7	Espermatogénesis	Gallo
Tektina	2.5	Movilidad flagelar.	Gallo
HSP90AA	6.6	Chaperona proteínas clave	Gallo
SPAG6	4.5	Integridad celular y movilidad flagelar.	Gallo
FER1L4	2.4	Activación del espermatozoide	Gallo
VDAC2	6.6	Movilidad, capacitación y fertilización	Gallo
CDK5RAP2	5.2	Organización del centrosoma durante la fertilización	Gallo
Ubiquitina	8.5	Espermatogénesis	Gallo
LRD	7	Movilidad flagelar	Gallo

* Masa molecular del péptido con que se identificó la proteína

Proteínas en color naranja se identificaron en mayor abundancia relativa en gallos subfértiles, aquellas que no presentan color son las proteínas con mayor abundancia relativa en los gallos fértiles (Tomado de: Soler et al., 2020).

Capítulo 7 Discusión

En este trabajo, administrando mediante ingesta forzada de clotianidina en y debajo de la concentración en la que no hay efectos notables (Noael) no se afectó el peso de la rata, en exposición crónica diaria durante 6 semanas (2 y 10 mg/kg/día). Este hallazgo es consistente con los resultados reportados por Bal et al. (2012) quienes aplicaron dosis similares (2, 8 y 32 mg/kg/día) de manera crónica durante 12 semanas y demostraron que la administración de clotianidina no disminuye el peso del testículo ni del epidídimo, solamente de la cauda epididimaria en la dosis alta (32 mg/kg/día) cuando la exposición se lleva a cabo en ratas en etapas de desarrollo. Sin embargo, parece que la administración en edad adulta no modifica el peso de las ratas ni de los testículos, lo que indica que la edad no es un factor determinante en el efecto de clotianidina sobre el peso de la rata o de los testículos.

El peso de los epidídimos tampoco se afectó en ninguno de los tratamientos, pero sí observamos una disminución en el área del corpus en los grupos experimentales tratados con clotianidina. Además de que se observó una disminución en el grosor del conducto deferente del grupo de 10 mg/kg/día. Bal et al. (2013) reportaron la disminución del peso del epidídimo en los grupos experimentales tratados con 2, 8 y 24 mg/kg/día durante 12 semanas en edad adulta. En nuestro estudio, al tratar con clotianidina durante la mitad del tiempo, se comenzaron a observar algunos daños en el epidídimo, lo que muestra relación entre el tiempo de administración y los daños producidos por la clotianidina.

El registro de los parámetros espermáticos en la rata es complejo, sobre todo la obtención de la muestra ya que los métodos utilizados son variados. Entre ellos se encuentra la extracción de espermatozoides del tapón vaginal de la hembra; directamente de la cauda del epidídimo, ya sea por perfusión o extracto del tejido de la cauda del órgano, para luego ser filtrado y obtener las células. La electroeyaculación no es una opción viable para esta especie, ya que el volumen obtenido es muy pequeño y el procedimiento es invasivo (Lucio et al., 2009; Türk et al., 2008). Es esencial mencionar el método de obtención de células, ya que, debido a este, los resultados de la concentración entre un estudio y otro difieren ampliamente. Además, la gran talla del espermatozoide de rata, que es mayor que

la del resto de los mamíferos, hace que su movimiento se dificulte al observarlos en un sistema lamina-laminilla tradicional.

En este trabajo, la obtención fue directamente de la cauda del epidídimo y se observó que en los grupos tratados con 2 y 10 mg/kg/día de clotianidina, la concentración fue mayor a 25×10^6 cel/mL, mientras que en el grupo control que fue de 16×10^6 cel/mL. Nuestros resultados difieren de la investigación anteriores (Bal et al., 2013; Bal et al., 2012) donde la concentración disminuyó de manera dosis dependiente en los grupos tratados con 2, 8 y 24 mg/kg/día y 2, 8 y 32 mg/kg/día y la concentración fue similar a la utilizada en esta investigación. En esos trabajos, el tiempo de exposición fue de 90 días, lo que pudo influir en la variación de los resultados, ya que se ha visto que dosis pequeñas o de corta duración incrementan la sobrevivencia tanto de células como de organismos tratados, lo que refleja una respuesta al estrés causado por el tóxico (Kanno, 2016).

En nuestro estudio, la clotianidina tuvo un efecto paradójico ya que la concentración espermática fue mayor que la del control. Esto podría explicarse considerando que dosis muy bajas podrían estimular la producción de espermatozoides, explicando el resultado paradójico obtenido. Otro punto importante que resaltar es el tipo de formulación de los ingredientes activos de los insecticidas utilizados. Los productos utilizados por (Bal et al., 2013; Bal et al., 2012), fueron diluciones a partir de gránulos dispersables; en esta investigación se utilizaron diluciones a partir de una suspensión concentrada, lo que podría influir en los resultados obtenidos. Esto, porque se ha propuesto que las suspensiones concentradas son más eficientes que los gránulos dispersables, con el mismo ingrediente activo a la misma concentración, ya que su absorción en el aparato digestivo puede ser más lenta en estos últimos.

Con respecto a la viabilidad espermática, Abdel-Razik et al. (2021) encontraron que a una exposición de 5 dosis por semana durante un mes, la viabilidad disminuyó hasta un 45%. Este dato fue similar a los que obtuvimos en nuestros grupos tratados, la viabilidad disminuyó a un 44 y 45% respectivamente de manera estadísticamente significativa con respecto al grupo control que tuvo un valor normal en la rata (Lucio et al., 2009). Bal et al. (2012) midieron los niveles de glutatión y la composición de ácidos grasos en el testículo de ratas tratadas con

clotianidina, observaron disminución de glutatión y alteración de la composición de los ácidos grasos. Un balance entre la producción de ROS y de antioxidantes es esencial. Los resultados reflejan un desequilibrio oxidante, alterando componentes que son vitales para el funcionamiento correcto de la célula o tejido. La disminución de la viabilidad puede deberse a un incremento de ROS en el espermatozoide, producido por un desacoplamiento de la cadena respiratoria. Este incremento provoca la peroxidación lipídica en la membrana plasmática del espermatozoide, afectando considerablemente los eventos posteriores que son esenciales para que se lleve a cabo la fertilización del ovocito de manera exitosa. Esto muestra que clotianidina y otros insecticidas neonicotinoides como imidacloprid disminuyen la viabilidad espermática.

Las anomalías morfológicas espermáticas se pueden clasificar de la siguiente manera: primarias, como espermatozoides con acrosoma hinchado, cabeza estrecha, micro o macrocefalia, que están relacionadas con el proceso de desarrollo en el testículo y anomalías secundarias, como espermatozoides con cabeza desprendida, cola doblada y gota citoplasmática, que están relacionadas con el proceso de maduración en el epidídimo. Bal et al. (2012) reportaron anomalías totales de 10, 14 y 16% cuando las ratas fueron expuestas a dosis de 2, 8 y 32 mg/kg/día durante 90 días. En esta investigación, el porcentaje de anomalías morfológicas totales en los grupos tratados con 10 mg/kg/día de clotianidina fueron del 11% y del 24.9% en el grupo de 2 mg/kg/día, en ambos casos fue mayor que en el grupo control, que fue del 7.42%. Este resultado difiere de las investigaciones anteriores, lo que pudo deberse al tipo de formulación de clotianidina aplicada en cada investigación, como se discutió anteriormente.

A diferencia de las investigaciones anteriores, las anomalías que reportamos se clasificaron de acuerdo con la OMS como anomalías en cabeza, pieza media, flagelo, residuo citoplasmático y exceso de citoplasma residual (World Health Organization, 2021). No se observaron anomalías en la pieza media en ninguno de los grupos; se encontraron algunas anomalías en cabeza y flagelo, pero fueron mínimas. Las anomalías correspondientes a la gota o residuo citoplasmático tuvieron una diferencia significativa, con valores de 10.7 y 16.2% respectivamente, además se contabilizó 8.3% de exceso de citoplasma residual en el grupo de 2 mg/kg/día de clotianidina. La eliminación de la gota o residuo

citoplasmático es uno de los eventos que conforma la maduración epididimaria de los espermatozoides. La falta de reabsorción de citoplasma provoca efectos negativos principalmente en la movilidad, lo que afecta la fertilización, El residuo citoplasmático y el exceso del citoplasma residual sugiere que la clotianidina podría estar afectando a las células claras que se encuentran en el epitelio epididimario, ya que ellas son responsables de endocitar este residuo del espermatozoide a su paso por el epidídimo (Akbarsha et al., 2000). Por lo tanto, la disfunción de estas células podría estar inhibiendo la maduración espermática.

Se ha reportado que el espermatozoide durante la maduración epididimaria adquiere la capacidad de presentar movilidad progresiva que comienza después de la eyaculación, es decir una vez que entra al tracto reproductor femenino. El microambiente en el que ahora se encuentra va a estar compuesto de elementos vitales para activar la movilidad, como lo son Na^+ , K^+ , Ca^{++} (Olivera, 2006). Al realizar estudios para visualizar los tipos de movilidad, es necesario utilizar medios especiales, así como temperatura adecuada para poder visualizarlos y reportar cambios. En esta investigación se realizó una observación del tipo de movilidad en espermatozoides tomados directamente del epidídimo a temperatura ambiente y sin utilizar medios que activaran la movilidad, esto con la finalidad de obtener un dato complementario a la evaluación de la calidad espermática. Diferentes autores reportan la movilidad espermática indicando solo porcentaje de espermatozoides móviles, o como movilidad progresiva y no progresiva (Bal et al., 2013; Bal et al., 2012). En este trabajo la movilidad se reportó de acuerdo con lo que la OMS establece para clasificar la movilidad como: a) progresiva rápida b) progresiva lenta c) no progresiva y d) espermatozoides inmóviles (World Health Organization, 2021). Los espermatozoides de los tres grupos analizados (control, 2 y 10 mg/kg/día) presentaron un porcentaje mayor al 50% de espermatozoides inmóviles (tipo d), seguido de la movilidad no progresiva (tipo c) ´ con un porcentaje mayor al 20% y menos del 10% de movilidad progresiva rápida y progresiva lenta (tipo a y b). En las condiciones de este estudio, se puede sugerir que los espermatozoides de la cauda del epidídimo no presentan movilidad progresiva de ningún tipo, un dato reportado anteriormente por otros autores, y que es necesario activarlos con medios acondicionados y temperatura. Por lo tanto, el efecto que la clotianidina

tiene sobre la movilidad en nuestra investigación, no se pudo analizar cabalmente debido a la metodología utilizada.

La espectrometría de masas, particularmente de MALDI-TOF, es comúnmente utilizado para la identificación de bacterias y hongos, de las cuales existe un extenso catálogo para realizar comparaciones múltiples para su identificación a partir de la huella peptídica para cada especie. Soler et al. (2020) obtuvieron proteínas espermáticas de gallos para la producción de carne y gallos para fertilización; realizando modelos matemáticos predictivos para tratar de correlacionar la fertilidad, infertilidad o subfertilidad de los organismos de cada grupo con el valor m/z de las proteínas obtenidas en MALDI-TOF. En esta investigación, se propuso generar una base de datos a partir de proteínas obtenidas de espermatozoides tomados de la cauda del epidídimo de rata macho Wistar en espectrometría de masas MALDI-TOF, a través de la técnica de “células intactas”. La base de datos para espermatozoides del grupo control se generó con un total de 20 espectros de 3000 disparos cada uno, que fueron seleccionados porque cumplieron con el criterio de las 500 ppm de error, cumpliendo con las especificaciones de fabricante para la generación de nuevas bases de datos. El espectro promedio anterior se comparó con la base de datos del Biotyper observando que no existe similitud con ninguno de los espectros comparados. Para cada comparación, el Score obtenido fue menor a 1.69, indicando una “identificación no confiable” en el valor m/z , en la intensidad y la resolución de los picos entre los espectros comparados. Esta comparación se puede observar más objetivamente en la superposición entre las entradas comparadas, donde se observa mayoritariamente el color rojo, indicando la identificación no confiable en las 300 comparaciones. Este resultado sugiere que la nueva entrada construida es útil para la identificación especie-específica, es decir, si deseamos identificar muestras espermáticas de otras especies, esta herramienta es útil para su identificación práctica y eficiente.

La identificación especie-específica se llevó a cabo de manera exitosa como dato complementario para constatar la correcta construcción de la nueva entrada para la base de datos. Al realizar el análisis comparativo entre la nueva entrada construida con espermatozoides del grupo control y los espectros obtenidos de los grupos experimentales, el equipo no mostró diferencias en la intensidad relativa, el

valor m/z y la resolución de los picos; estos fueron constantes en cada uno de los grupos comparados con respecto al grupo control. El score obtenido fue mayor a 2.00, indicando que la identificación entre las especies es alta; el color predominante para las superposiciones observadas fue verde, indicando que cada espectro comparado entre los grupos experimentales tratados y la entrada de muestras espermáticas del grupo control fue similar entre sí. Esto indica que las proteínas que el equipo toma en cuenta con estas características en el grupo control no son afectadas bajo la exposición crónica de clotianidina a las dosis utilizadas.

El equipo proporcionó una lista de proteínas en el intervalo de 2 a 16 kDa para cada uno de los grupos analizados (0, 2 y 10 mg/kg/día), de las cuales se observó una disminución del número total de proteínas. Para las ratas tratadas con 2 mg/kg/día se contabilizaron 72 proteínas totales y para el grupo de 10 mg/kg/día fueron contabilizadas 66 proteínas totales, en comparación con el grupo control, que tuvo un conteo de 120, lo que representa una disminución de aproximadamente un 45%. Por lo tanto, sugerimos que la clotianidina disminuye el número de proteínas de manera dosis-dependiente. Se contabilizaron aproximadamente 25 proteínas nuevas o masas no presentes en las listas de proteínas totales de los grupos experimentales que no se encontraron en el grupo control.

Por otro lado, se realizó un gel SDS-PAGE y las muestras se corrieron en un intervalo más amplio de 10 a 250 kDa con la finalidad de analizar que sucedía con aquellas proteínas de masas moleculares que no se encontraban en el intervalo observado en espectrometría de masas MALDI-TOF, se observó que las bandas entre los grupos experimentales y el grupo control: la movilidad relativa, las masas moleculares y el número de bandas eran diferentes para cada carril, observando nuevamente que hubieron proteínas en los grupos experimentales que no se observaron en el grupo control y viceversa, proteínas observadas en el grupo control que no se observaron en los grupos experimentales, resultado similar al obtenido en espectrometría de masas MALDI-TOF.

Integrando ambos resultados podemos sugerir que la ausencia o la presencia de proteínas nuevas en las listas de proteínas totales o en el gel SDS-PAGE en los grupos experimentales (2 y 10 mg/kg/día) y el grupo control se observaron en un intervalo de 2 a 250 kDa; la disminución del promedio total de proteínas espermáticas pudo deberse a que clotianidina podría estar afectando su adquisición

a su paso por el epitelio epididimario; sugerimos que la presencia de “nuevas proteínas” o “proteínas no presentes” podría tratarse de biomarcadores moleculares que juegan un papel esencial en la fisiología del espermatozoide, su identificación podría darnos un panorama de cómo actúa la clotianidina sobre algunas funciones en donde participan estas proteínas.

La disminución del número de las proteínas pudo deberse a un conjunto de eventos que comprenden la pérdida de la integridad de membrana y una disfunción en el epitelio epididimario, se ha reportado que la membrana plasmática en el espermatozoide es el sitio donde se reclutan un gran número de proteínas (aproximadamente 6871 reportadas en espermatozoides de humano) durante su paso por el epidídimo (Barrachina et al., 2022) y para ello es necesario que las condiciones en la membrana plasmática sean óptimas para su reclutamiento, manteniendo funciones que requiere el espermatozoide como impedir la capacitación, mejorar la movilidad, mantener la integridad del ADN, favorecer la capacitación y realizar la reacción acrosomal, entre otras (Henkel, 2024). Nuestros resultados indican que la clotianidina disminuye la viabilidad, probablemente asociado con la pérdida de la integridad de membrana debido a un posible desequilibrio en las ROS, que está provocando lipoperoxidación. Esto podría relacionarse con la disminución del número de proteínas espermáticas totales en los grupos experimentales ya que, al no tener una membrana plasmática íntegra, el espermatozoide ya no tiene ninguna función. Es esencial que tanto la membrana como el epitelio epididimario no presente alteraciones, ya que algunos tipos celulares que lo conforman son encargados de la excreción apocrina de epididimosomas, fundamentales para la adquisición de proteínas en el espermatozoide a su paso por el epidídimo (Barrachina et al., 2022; Sullivan & Mieusset, 2016). Las células principales y las células claras son las encargadas de estas funciones, se distribuyen en caput, corpus y la cauda epididimaria. Se ha reportado que transfieren proteínas a través de epididimosomas; las células claras se encargan no solo de transferir proteínas a la membrana del espermatozoide sino también de eliminar residuos citoplasmáticos, un evento esencial en la maduración espermática, ya que la manifestación de este residuo está considerada como una anomalía morfológica que puede interferir en la fisiología espermática (Akbarsha et al., 2000).

Según los datos obtenidos, proponemos que la disminución del número total de las proteínas en los grupos experimentales pudo deberse también a la disfunción del epitelio epididimario, particularmente de las células claras. Proponemos que su manifestación puede ser la causa de la gran cantidad de gota citoplasmática observada en las células espermáticas de los grupos de ratas tratados con 2 y 10 mg/kg/día de clotianidina. Akbarsha et al. (2000) reportaron que la retención de la gota citoplasmática por los espermatozoides en la cauda epididimaria es una manifestación de toxicidad para los espermatozoides de los productos químicos que actúan sobre el testículo y el epidídimo y puede correlacionarse con una función epididimaria alterada y una fertilidad reducida.

Clotianidina podría estar afectando el equilibrio de ROS en células en el epitelio epididimario, provocando que no se esté llevando a cabo de manera óptima la transferencia de proteínas durante la maduración espermática. Se ha reportado que la fertilina, proteína esencial para la fecundación que consta de dos subunidades, comienza el procesamiento de la primera subunidad en el testículo y la segunda se procesa durante su paso por el epidídimo. Al final del procesamiento de ambas subunidades, pasan por un proceso proteolítico para activar la función de la proteína (Blobel, 2000). Debido a que el epidídimo tiene la función de almacenar y madurar los espermatozoides producidos en los testículos, proponemos que las proteínas “nuevas” observadas en las listas obtenidas del análisis de espectrometría de masas y en análisis electroforético de los grupos de 2 y 10 mg/kg/día, fueron proteínas que no completaron su procesamiento a su paso por el epidídimo. Parte de la maduración implica la adición o modificación de proteínas espermáticas, tal es el caso de la fertilina o de glicoproteínas, que modifican su MM después de la maduración epididimaria, ya sea porque pasan por un proceso proteolítico o de la adquisición de azúcares, dándonos así una idea del número de proteínas diferente al del grupo control; además del posible daño al epitelio epididimario (DiBartolomeis et al., 2019).

Los marcadores moleculares son importantes en la biología en general y en la biología de la reproducción, particularmente. Hablando del espermatozoide, los biomarcadores se han encontrado entre las proteínas que están involucradas en funciones membranales, estructurales y metabólicas. Soler et al. (2020) identificó proteínas correlacionadas con la fertilidad, infertilidad y subfertilidad en gallos, con

la finalidad de establecer marcadores moleculares e identificar su condición, es decir, realizar pruebas de fertilidad de manera práctica. Proporcionan una lista de proteínas que van de que 2 a 20 kDa, de las cuales se presentó un resumen en la Tabla 19. Se realizó también una búsqueda en UNIPROT, base de datos de proteínas y con herramientas proteómicas y se resumen en la tabla 18 (Barrachina et al., 2022; Schirmer et al., 2011; Sullivan & Mieusset, 2016; Wang et al., 2022).

Una de las proteínas que tuvieron una disminución significativa en el análisis en espectrometría de masas, fueron las de peso molecular 6-7 kDa, LRD es una proteína que su ausencia podría afectar la movilidad espermática y por lo tanto se consideró como un posible marcador molecular. (Soler et al., 2020) Otro ejemplo es la proteína tiene como MM de 89 kDa aproximadamente y de acuerdo con los resultados obtenidos en el Gel SDS-PAGE, no aparece en la lista de los grupos tratados con Clotianidina. Una proteína con masa molecular similar es ADAM7 que participa en la fertilización, probablemente en la interacción entre el espermatozoide y el ovocito (Barrachina et al., 2022). Se adquiere en la maduración espermática y por lo tanto la consideramos como un posible marcador. Las proteínas de 42-44 kDa que en el gel SDS-page tampoco aparecieron en la lista de los grupos tratados con clotianidina. La actina es una proteína esencial para mantener la forma, la organización celular, movilidad y las funciones dinámicas en la membrana del espermatozoide y, podría ser un marcador molecular que, además, ya se ha utilizado (Flaherty Sp Fau - Winfrey et al., 1986).

Se ha descrito que los neonicotinoides pueden actuar como moduladores alostéricos positivos de la subunidad $\alpha 7$ del receptor, de acetilcolina. Las redes colinérgicas están ampliamente distribuidas en todo el cuerpo, lo que sugiere que los neonicotinoides pueden actuar sobre cualquier receptor nicotínico de acetilcolina en el sistema (Park et al., 2021). Se ha demostrado que clotianidina actúa como agonista en los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR), actúa aumentando el Ca^{+} intracelular, despolarizando la membrana y llevando a la liberación de catecolaminas en las glándulas suprarrenales en rata Wistar, evitando que la secreción natural sea estimulada por la acetilcolina. Proponemos que la clotianidina pudo actuar como agonista en los receptores nicotínicos de acetilcolina en el sistema reproductor masculino. Hablando particularmente del epidídimo y del espermatozoide se observó que a dosis menores los efectos fueron paradójicos

(Park et al., 2021). Al ser considerado un disruptor endocrino se propone que clotianidina en el aparato reproductor masculino pudo interferir en la función endocrina, ya sea imitando la acción de las hormonas naturales; bloqueando receptores; influyendo en la síntesis, el metabolismo y la excreción de proteínas y por lo tanto alterando la concentración natural de las hormonas. (World Health Organization, 2021).

Capítulo 8 Conclusiones

En este trabajo, se estudiaron el daño causado por Clotianidina en la morfología del testículo y el epidídimo de rata Wistar, así como la fisiología básica y la proteómica de los espermatozoides epididimarios.

Los resultados indicaron que la clotianidina no modifica significativamente el peso corporal ni el peso de los órganos reproductores (testículo y epidídimo). Sin embargo, sí se observaron alteraciones en parámetros espermáticos, incluyendo un aumento en la concentración espermática, una disminución en la viabilidad y un incremento en la proporción de células con gotas citoplasmáticas, lo cual sugiere un posible impacto en la maduración espermática.

A nivel proteómico, se generó una nueva entrada en la base de datos Biotyper a partir de espermatozoides del grupo control, identificando un total de 120 proteínas. La exposición a clotianidina resultó en una reducción en la cantidad total de proteínas detectadas en los grupos experimentales, lo que indica alteraciones significativas en el perfil proteómico espermático. Estos hallazgos sugieren que la exposición crónica a clotianidina, incluso en dosis inferiores a la NOAEL, podría comprometer la fisiología del epidídimo y la integridad funcional de los espermatozoides, afectando así la fertilidad masculina.

Capítulo 9 Bibliografía

Abdel-Razik, R. K., Mosallam, E. M., Hamed, N. A., Badawy, M. E. I., & Abo-El- Saad, M. M. (2021). Testicular deficiency associated with exposure to cypermethrin, imidacloprid, and chlorpyrifos in adult rats. *Environ Toxicol Pharmacol*(1872-7077). <https://doi.org/10.1016/j.etap.2021.103724>.

Agarwal, A., Panner Selvam, M. K., & Baskaran, S. (2020). Proteomic analyses of human sperm cells: understanding the role of proteins and molecular pathways affecting male reproductive health. *Int J Mol Sci*, 21(5), 1621. <https://doi.org/10.3390/ijms21051621>

Aitken, R. J., & Baker, M. A. (2008). The role of proteomics in understanding sperm cell biology. *Int J Androl*, 31(3), 295-302. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2007.00851.x>

Akbarsha, M. A., Latha Pn Fau - Murugaian, P., & Murugaian, P. (2000). Retention of cytoplasmic droplet by rat cauda epididymal spermatozoa after treatment with cytotoxic and xenobiotic agents. *Reproduction* (0022-4251 (Print)). <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1200385>

Bal, R., Türk G Fau - Tuzcu, M., Tuzcu M Fau - Yılmaz, Ö., Yılmaz Ö Fau - Kuloğlu, T., Kuloğlu T Fau - Baydaş, G., Baydaş G Fau - Naziroğlu, M., Naziroğlu M Fau - Yener, Z., Yener Z Fau - Etem, E., Etem E Fau - Tuzcu, Z., & Tuzcu, Z. (2013). Effects of the neonicotinoid insecticide, clothianidin, on the reproductive organ system in adult male rats. *Drug Chem Toxicol*(1525-6014 (Electronic)). <https://doi.org/10.3109/01480545.2013.776575>

Bal, R., Türk G Fau - Yılmaz, Ö., Yılmaz Ö Fau - Etem, E., Etem E Fau - Kuloğlu, T., Kuloğlu T Fau - Baydaş, G., Baydaş G Fau - Naziroğlu, M., & Naziroğlu, M. (2012). Effects of clothianidin exposure on sperm quality, testicular apoptosis and fatty acid composition in developing male rats. *Cell Biol Toxicol*(1573-6822 (Electronic)). <https://doi.org/10.1007/s10565-012-9215-0>

Barrachina, F., Battistone, M. A., Castillo, J., Mallofre, C., Jodar, M., Breton, S., & Oliva, R. (2022). Sperm acquire epididymis-derived proteins through epididymosomes. *Humanreproduction*, 37(4), 651-668. <https://doi.org/10.1093/humrep/deac015>

Blobel, C. (2000). Functional processing of fertilin: evidence for a critical role of proteolysis in sperm maturation and activation. *Rev Reprod*, 5(2), 75-83. <https://doi.org/10.1530/ror.0.0050075>

Bray, C., Son Jh Fau - Kumar, P., Kumar P Fau - Meizel, S., & Meizel, S. (2005). Mice deficient in CHRNA7, a subunit of the nicotinic acetylcholine receptor, produce sperm with impaired motility. *Biol Reprod*(0006-3363 (Print)). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.042184>

Calcáneo, M. G. I., & de la Cueva, B. L. (2021). *Gametogénesis*. Portal Académico del CCH, UNAM. <https://portalacademico.cch.unam.mx/biologia1/gametogenesis>

Cossio-Bolaños, M., Gómez Campos, R., Vargas Vitoria, R., Hochmuller Fogaça, R. T., & Arruda, M. d. (2013). Curvas de referencia para valorar el crecimiento físico de ratas machos Wistar. *Nutr hosp*, 28, 2151-2156. <https://doi.org/10.3305/nh.2013.28.6.6659>

DiBartolomeis, M., Kegley, S., Mineau, P., Radford, R., & Klein, K. (2019). An assessment of acute insecticide toxicity loading (AITL) of chemical pesticides used on agricultural land in the United States. *PLoS One*, 14(8), e0220029. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220029>

Fang, L., Zhang, S., Chen, Z., Du, H., Zhu, Q., Dong, Z., & Li, H. (2015). Risk assessment of pesticide residues in dietary intake of celery in China. *Regul Toxicol Pharmacol*, 73(2), 578-586. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.08.009>

FAO. (2010). *Búsqueda en la base de datos de plaguicidas clotianidina*
https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticide-detail/es/?p_id=238

Flaherty Sp Fau - Winfrey, V. P., Winfrey Vp Fau - Olson, G. E., & Olson, G. E. (1986). Localization of actin in mammalian spermatozoa: a comparison of eight species. *Anat Rec*(0003-276X (Print)). <https://doi.org/10.1002/ar.1092160407>

Ford, K. A., & Casida, J. E. (2006). Unique and common metabolites of thiamethoxam, clothianidin, and dinotefuran in mice. *Chem Res Toxicol*, 19(11), 1549-1556.
<https://doi.org/10.1021/tx0601859>

Gawel, M., Kiljanek, T., Niewiadowska, A., Semeniuk, S., Goliszek, M., Burek, O., & Posyniak, A. (2019). Determination of neonicotinoids and 199 other pesticide residues in honey by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Food Chem*, 282, 36-47.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.003>

Goulson, D. (2013). REVIEW: An Overview of the Environmental Risks Posed by Neonicotinoid Insecticides. *J Appl Ecol*, 50(4), 977-987. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12111>

Hallmann, C. A., Foppen, R. P., van Turnhout, C. A., de Kroon, H., & Jongejans, E. (2014). Declines in insectivorous birds are associated with high neonicotinoid concentrations. *Nature*, 511(7509), 341-343.
<https://doi.org/10.1038/nature13531>

Han, W., Tian, Y., & Shen, X. (2018). Human exposure to neonicotinoid insecticides and the evaluation of their potential toxicity: An overview. *Chemosphere*, 192, 59-65.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.149>

Clothianidin Summary Document Registration Review: Initial Docket, (2017).
<https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://downloads.regulations.gov/EPA-HQ-OPP-2011-0865->

[0002/content.pdf&ved=2ahUKEwjRnfKpmOWNAxWgO0QIHfExOo4QFnoE
CBwQAQ&usq=AOvVaw1sobFSzygBriqGZE6sVS6F](#)

Henkel. (2024). Role of mitochondria and redox state in sperm and oocyte health. *GREM Gynecological and Reproductive Endocrinology & Metabolism*
<https://doi.org/10.53260/grem.2450105>

Houchat, J.-N., Cartereau, A., Le Mauff, A., Taillebois, E., & Thany, S. H. (2020). An Overview on the Effect of Neonicotinoid Insecticides on Mammalian Cholinergic Functions through the Activation of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Int J Environ Res Public Health*, 17(9), 3222. <https://doi.org/10.3390/ijerph17093222>

Johnston, D. S., Wooters J Fau - Kopf, G. S., Kopf Gs Fau - Qiu, Y., Qiu Y Fau - Roberts, K. P., & Roberts, K. P. (2005). Analysis of the human sperm proteome. *Ann N Y Acad Sci*(0077-8923 (Print)).

Kanno, J. (2016). Introduction to the concept of signal toxicity. *J Toxicol Sci*, 41(1880-3989 (Electronic)). <https://doi.org/10.2131/jts.41.SP105>

La importancia de la formulación en los productos biocidas. (2011). Higiene ambiental Retrieved 30 de mayo from <https://higieneambiental.com/productos-biocidas-y-equipos/la-importancia-de-la-formulacion-en-los-productos-biocidas>

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*(0028-0836 (Print)). <https://doi.org/10.1038/227680a0>.

Le Novère, N., Corringer, P. J., & Changeux, J. P. (2002). The diversity of subunit composition in nAChRs: Evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J Neurobiol*, 53(4), 447-456.
<https://doi.org/10.1002/neu.10153>

Lucio, R., JL, I., & AA, L. (2009). Análisis de los parámetros del eyaculado en la rata Wistar de laboratorio: descripción de la técnica. *Vet Mex*, 40, 405-415.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-50922009000400007&lng=es&nrm=iso

Matsuda, K., Ihara, M., & Sattelle, D. B. (2020). Neonicotinoid insecticides: molecular targets, resistance, and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 60(1), 241-255.
<https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021747>

Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., & Unwin, N. (2003). Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature*, 423(6943), 949-955. <https://doi.org/10.1038/nature01748>

Montiel-Leon, J. M., Munoz, G., Vo Duy, S., Do, D. T., Vaudreuil, M. A., Goeury, K., Guillemette, F., Amyot, M., & Sauve, S. (2019). Widespread occurrence and spatial distribution of glyphosate, atrazine, and neonicotinoids pesticides in the St. Lawrence and tributary rivers. *Environ Pollut*, 250, 29-39. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.125>

Olivera, M., Ruiz, Tatiana, Tarazona, Ariel, Giraldo, Carlos. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev Colomb Cienc Pecu*, 19.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902006000400008&lng=en&tlng=es.

Pang, S., Lin, Z., Zhang, W., Mishra, S., Bhatt, P., & Chen, S. (2020). Insights into the microbial degradation and biochemical mechanisms of neonicotinoids. *Front Microbiol*, 11, 868.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00868>

Park, J. A.-O., Taly, A. A.-O., Bourreau, J., De Nardi, F., Legendre, C. A.-O., Henrion, D. A.-O., Guérineau, N. A.-O., Legros, C. A.-O., Mattei, C. A.-O., & Tricoire-Leignel, H. A.-O. (2021). Partial Agonist Activity of Neonicotinoids on Rat Nicotinic Receptors: Consequences over Epinephrine Secretion and In

Vivo Blood Pressure. LID - 10.3390/ijms22105106 [doi] LID - 5106. *Mol Sci*(1422-0067 (Electronic)). <https://doi.org/10.3390/ijms22105106>.

Robaire, B., Hinton, B. T., & Orgebin-Crist, M.-C. (2006). CHAPTER 22 - The Epididymis. In J. D. Neill (Ed.), *Knobil and Neill's physiology of reproduction* (pp. 1071-1148). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012515400-0/50027-0>

Sansegundo Hernando, & Ester. (2020). *Efecto de la competición espermática en los mecanismos que preparan al espermatozoide para la fecundación* Universidad Autónoma de Madrid. CSIC - Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN)]. https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/692159/sansegundo_hernando_ester.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Schirmer, S. U., Eckhardt, I., Lau, H., Klein, J., Degraaf, Y. C., Lips, K. S., Pineau, C., Gibbins, I. L., Kummer, W., Meinhardt, A., & Haberberger, R. V. (2011). The cholinergic system in rat testis is of non-neuronal origin. *Reproduction*, 142(1), 157-166. <https://doi.org/10.1530/rep-10-0302>

Secciani, F., Bianchi, L., Ermini, L., Cianti, R., Armini, A., La Sala, G. B., Focarelli, R., Bini, L., & Rosati, F. (2009). Protein profile of capacitated versus ejaculated human sperm. *J Proteome Res*, 8(7), 3377-3389. <https://doi.org/10.1021/pr900031r>

Sgolastra, F., Medrzycki, P., Bortolotti, L., Renzi, M. T., Tosi, S., Bogo, G., Teper, D., Porrini, C., Molowny-Horas, R., & Bosch, J. (2017). Synergistic mortality between a neonicotinoid insecticide and an ergosterol-biosynthesis-inhibiting fungicide in three bee species. *Pest Manag Sci*, 73(6), 1236-1243. <https://doi.org/10.1002/ps.4449>

Shapiro Al Fau - Viñuela, E., Viñuela E Fau - Maizel, J. V., Jr., & Maizel, J. V., Jr. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis

in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem biophys res commun*(0006-291X (Print)).
[https://doi.org/10.1016/0006-291x\(67\)90391-9](https://doi.org/10.1016/0006-291x(67)90391-9).

SIAP. (2022). *Maíz, frijol, arroz y trigo, los granos básicos de México*.
<https://www.gob.mx/agricultura/articulos/maiz-frijol-arroz-y-trigo-los-granos-basicos-de-mexico>

Soler, L., Labas, V. A.-O., Thélie, A. A.-O., Grasseau, I., Teixeira-Gomes, A. P., & Blesbois, E. (2020). Intact Cell MALDI-TOF MS on Sperm: A Molecular Test For Male Fertility Diagnosis. (1535-9484 (Electronic)).

Sullivan, R., & Mieusset, R. (2016). The human epididymis: its function in sperm maturation. *Hum Reprod Update*, 22(5), 574-587.
<https://doi.org/10.1093/humupd/dmw015>

Sultana, T., Murray, C., Kleywegt, S., & Metcalfe, C. D. (2018). Neonicotinoid pesticides in drinking water in agricultural regions of southern Ontario, Canada. *Chemosphere*, 202, 506-513.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.108>

Taillebois, E., Cartereau, A., Jones, A. K., & Thany, S. H. (2018). Neonicotinoid insecticides mode of action on insect nicotinic acetylcholine receptors using binding studies. *Pestic Biochem Physiol*, 151, 59-66.
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.04.007>

Thompson, H., Fryday, S., Harkin, S., & Milner, S. (2014). Potential impacts of synergism in honeybees (*Apis mellifera*) of exposure to neonicotinoids and sprayed fungicides in crops. *Apidologie*, 45, 545–553.

Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2003). Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu Rev Entomol*, 48, 339-364.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ento.48.091801.112731>

Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2005). Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 45, 247-268. <https://doi.org/doi:10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095930>. PMID: 15822177.

Torrades, O. S. (2004). Proteómica el diseño molecular de la vida. *OFFARM*, 23, 126-130. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5325128>

Türk, G., Ateşşahin A Fau - Sönmez, M., Sönmez M Fau - Ceribaşı, A. O., Ceribaşı Ao Fau - Yüce, A., & Yüce, A. (2008). Improvement of cisplatin-induced injuries to sperm quality, the oxidant-antioxidant system, and the histologic structure of the rat testis by ellagic acid. (1556-5653 (Electronic)).

Upadhyay, R. D., Balasinor Nh Fau - Kumar, A. V., Kumar Av Fau - Sachdeva, G., Sachdeva G Fau - Parte, P., Parte P Fau - Dumasia, K., & Dumasia, K. (2013). Proteomics in reproductive biology: beacon for unraveling the molecular complexities. (0006-3002 (Print)).

USA Department of Agriculture. (2018). *Pesticide data program—Annual summary, calendar year 2017* <https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/q2017PDPAnnualSummary.pdf>

Virgili, R. O. (2010). PROTEÓMICA DEL ESPERMATOZOIDE HUMANO. *ASEBIR* 15, 5-7.

Wang, A., Wan, Y., Zhou, L., Xia, W., Guo, Y., Mahai, G., Yang, Z., Xu, S., & Zhang, R. (2022). Neonicotinoid insecticide metabolites in seminal plasma: Associations with semen quality. *Sci Total Environ*(1879-1026 (Electronic)). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151407>

Weber K Fau - Osborn, M., & Osborn, M. (1967). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J biol chem*(0021-9258 (Print)).

Weinbauer, G. F., Luetjens, C. M., Simoni, M., & Nieschlag, E. (2010). Physiology of Testicular Function. In E. Nieschlag, H. M. Behre, & S. Nieschlag (Eds.), *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction* (pp. 11-59). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-78355-8_2

Wood, T. J., & Goulson, D. (2017). The Environmental Risks of Neonicotinoid Pesticides: A Review of the Evidence Post-2013. <https://doi.org/10.1101/098897>

World Health Organization. (2021). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen* (sixth edition. ed.). Geneva: World Health Organization.

Yokota, T., Mikata, K., Nagasaki, H., & Ohta, K. (2003). Absorption, tissue distribution, excretion, and metabolism of clothianidin in rats. *J Agric Food Chem*, 51(24), 7066-7072. <https://doi.org/10.1021/jf034760f>

Zhao, G. P., Yang, F. W., Li, J. W., Xing, H. Z., Ren, F. Z., Pang, G. F., & Li, Y. X. (2020). Toxicities of Neonicotinoid-Containing Pesticide Mixtures on Nontarget Organisms. *Environ Toxicol Chem*, 39(10), 1884-1893. <https://doi.org/10.1002/etc.4842>



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00133

Matricula: 2223802026

ANÁLISIS DEL EFECTO DE CLOTIANIDINA SOBRE EL PERFIL PROTEÓMICO DE LOS ESPERMATOZOIDES DE EPIDÍDIMO DE RATA.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 20 del mes de junio del año 2025 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA
DR. ENRIQUE OTHON HERNANDEZ GONZALEZ
DRA. IRMA JIMENEZ MORALES
DRA. ANA LILIA ROA ESPITIA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

DE: JESSICA ARREDONDO ESCALANTE

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:


Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



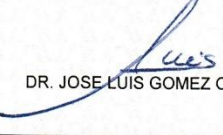
JESSICA ARREDONDO ESCALANTE
ALUMNA

REVISÓ




MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS




DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA




DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA

VOCAL



DR. ENRIQUE OTHON HERNANDEZ GONZALEZ

VOCAL



DRA. IRMA JIMENEZ MORALES

SECRETARIA



DRA. ANA LILIA ROA ESPITIA