



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
METROPOLITANA

---

UNIDAD IZTAPALAPA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**  
**POSGRADO EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**“EFECTO DEL TIAMETOXAM EN EL TESTÍCULO Y  
ESPERMATOZOIDES DE EPIDÍDIMO DE RATA.”**

**Tesis para obtener el grado de Maestra en Biología de la  
Reproducción Animal**

Presenta

Vanessa Guadalupe Solís Vidal

Matricula: 2223802017

Correo electrónico: vane.bioxp@hotmail.com

**Director:** Dr. Humberto González Márquez

**Asesor:** Dra. María del Carmen Martínez Valenzuela

**Asesor:** Dra. Paola Berenice Ortiz Sánchez

**Jurado**

**Presidente:** Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

**Secretario:** Dra. Paola Berenice Ortiz Sánchez

**Vocal:** Dra. María del Carmen Martínez Valenzuela

**Vocal:** Dra. Irma Jiménez Morales

Iztapalapa, Ciudad de México a 26 de junio 2025

## **Comité Tutorial**

### **Director**

Dr. Humberto González Márquez.  
Profesor-Investigador. Titular "C" T.C.  
Laboratorio de Expresión Génica  
Departamento de Ciencias de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa.  
[hgm@xanum.uam.mx](mailto:hgm@xanum.uam.mx)

### **Asesora**

Dra. Paola Berenice Ortiz Sánchez  
Laboratorio de Andrología  
Departamento de Ciencias de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa.  
[paolaortiz@xanum.uam.mx](mailto:paolaortiz@xanum.uam.mx)

### **Asesora**

Dra. María del Carmen Martínez Valenzuela  
Laboratorio de Genotoxicología  
Universidad Autónoma de Occidente  
[maría.martinezv@uadeo.mx](mailto:maría.martinezv@uadeo.mx)

## **Jurado de Examen**

**Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana**

**Laboratorio de Andrología**

Departamento de Ciencias de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa

[reyna@xanum.uam.mx](mailto:reyna@xanum.uam.mx)

**Dra. Paola Berenice Ortiz Sánchez**

**Laboratorio de Andrología**

Departamento de Ciencias de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa

[paolaortiz@xanum.uam.mx](mailto:paolaortiz@xanum.uam.mx)

**Dra. María del Carmen Martínez Valenzuela**

**Laboratorio de Genotoxicología**

Departamento de Ciencias Naturales y Exactas, Unidad Regional los Mochis

Universidad Autónoma de Occidente

[maría.martinezv@uadeo.mx](mailto:maría.martinezv@uadeo.mx)

**Dra. Irma Jiménez Morales**

Departamento de Ciencias de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa

[jimi@xanum.uam.mx](mailto:jimi@xanum.uam.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 "EFECTO DEL TIAMETOXAM EN EL TESTÍCULO Y ESPERMATOZOIDES DE EPIDÍDIMO DE RATA" con fecha 26 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. Paola Berenice Ortiz Sánchez**  
Departamento de Ciencias de la Salud. DCBS. UAM-Iztapalapa  
Correo electrónico: paolaortiz@xanum.uam.mx



**Vocal**

**Dra. María del Carmen Martínez Valenzuela**  
Laboratorio de Genotoxicología. Universidad Autónoma de Occidente  
Correo electrónico: maria.martinezv@uadeo.mx



**Vocal**

**Dra. Irma Jiménez Morales**  
Departamento de Ciencias de la Salud. DCBS. UAM-Iztapalapa  
Correo electrónico: jimi@xanum.uam.mx

## Declaración de Originalidad

La que suscribe, **VANESSA GUADALUPE SOLÍS VIDAL** 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: **“EFECTO DEL TIAMETOXAM EN EL TESTÍCULO Y 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 a 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 25 de junio de 2025.

Atentamente,



**VANESSA GUADALUPE SOLÍS VIDAL**

## **Agradecimientos Institucionales**

Al programa de Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana que pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad de CONAHCyT registro 003797 y cuenta con apoyo del mismo Consejo.

Este proyecto fue parcialmente financiado por subsidio del CONAHCYT a los convenios 52877-Z/66953 a Miguel Betancourt, y 0105961 a Reyna Fierro Pastrana

Se agradece a CONAHCyT la beca otorgada (CVU/Becario): 1252348

Extiendo un agradecimiento, a la Maestría en Biología de la Reproducción Animal, y a la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, por el financiamiento otorgado para la realización del presente proyecto y durante la participación en los congresos.

## **Dedicatorias**

*A mi Padrino Juan† que ya no pudo acompañarme en mi examen de grado y siempre estuvo al pendiente de mí.*

*A mi familia; mi mamá y mi hermano por ser un sostén durante estos dos años de maestría. Quienes me alentaron a seguir esforzándome cada día para lograr mis objetivos.*

*Esta meta se las dedico por el apoyo que siempre recibí.*

*Sin su ayuda no hubiera sido posible.*

*Los Amo.*

## Agradecimientos

Quiero agradecer a mi director de tesis, el Doctor Humberto, por abrirme las puertas de su laboratorio, estar conmigo a lo largo de este proyecto desde el proceso de ingreso al posgrado hasta la obtención del grado, también agradezco por su disposición para siempre enseñarnos y compartir conocimiento con todos sus alumnos, haciendo los seminarios más interesantes y dinámicos.

A la Doctora Reyna por permitirme trabajar en su laboratorio, por su interés y disposición para llevar a cabo este proyecto y apoyarnos siempre ante cualquier imprevisto.

A mis amigas de la licenciatura Abi, Juanita, y Meno por ser mis roomies y compartir casi una década de amistad, quienes han estado conmigo en cada logro de mi vida académica y personal y quienes fueron un sostén durante la maestría, por aconsejarme y darme ánimos en esta etapa más.

A mis amigas de la maestría Jessy, Rocío, Gaby y Mariel que me acompañaron en este camino y quienes fueron mis confidentes y soporte durante los momentos de exigencias y demandas a las que nos enfrentamos en la Universidad y por los momentos de diversión fuera de ella.

A mi amiga de laboratorio Jessy por su valiosa colaboración durante el trabajo experimental y por su apoyo al ensayar nuestras presentaciones.

A mi equipo de laboratorio, las doctoras Paola y Leslye y al Maestro Óscar por sus enseñanzas y apoyo durante el trabajo experimental, también por sus observaciones durante la escritura de la tesis que me fueron de mucha ayuda para construir poco a poco este trabajo.

A la Doctora. Irma por su apoyo, por ser mi confidente y alentarme a seguir investigando.

A mi amiguito de cuatro patas, Dulcineo, por su paciencia y su amor incondicional, quien me acompañó en cada noche de trabajo y desvelo.

## Abreviaturas

**nAChR** receptores nicotínicos de la acetilcolina

**TMX** Tiametoxam

**TMX-25** 25 mg/kg/día de TMX

**TMX-50** 50 mg/kg/día de TMX

**ACh** acetilcolina

**MRL** niveles de residuo máximo de plaguicida permitido

**CODEX** Código Alimentario de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

**FAO** Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

**OMS** Organización Mundial de la Salud

**ACE** acetamiprid

**AChe** acetilcolinesterasa

**AChRe** subunidad  $\epsilon$  del receptor de acetilcolina

**CTD** clotianidina

**DL50** dosis letal media

**mAChR** receptores nicotínicos de la acetilcolina

**Ca<sup>2+</sup>** Calcio

**Na<sup>+</sup>** Sodio

**LC-MS/MS** espectrometría de masas en tándem

**SOD** superóxido dismutasa

**CAT** catalasa

**Lb** La lámina basal

**Eg** espermatogonias

**Ed** espermátidas

**L** lumen

**EI** espacio Intersticial

**CL** Células de Leydig

**vs** vaso sanguíneo

**EI** Espacio Intersticial

**VS** vaso sanguíneo

**V** vacuolización

**NOAEL** dosis máxima sin efecto adverso observado

**EPA** Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos

**BTB** barrera hematotesticular

# Índice

<b>Comité Tutorial</b> .....	<b>i</b>
<b>Jurado de Examen</b> .....	<b>ii</b>
<b>Miembros del Jurado</b> .....	<b>iii</b>
<b>Declaración de Originalidad</b> .....	<b>iv</b>
<b>Agradecimientos Institucionales</b> .....	<b>v</b>
<b>Dedicatorias</b> .....	<b>vi</b>
<b>Agradecimientos</b> .....	<b>vii</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>viii</b>
<b>Índice</b> .....	<b>ix</b>
<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Índice de Tablas</b> .....	<b>xvi</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>xvii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xix</b>
<b>1 Introducción</b> .....	<b>1</b>
1.1 Neonicotinoides .....	<b>2</b>
1.2 Mecanismo de Acción .....	<b>3</b>
1.3 Los neonicotinoides en la contaminación ambiental.....	<b>5</b>
1.4 Uso de TMX en cultivos agrícolas.....	<b>5</b>

1.5	Toxicidad en mamíferos.....	6
1.6	Farmacocinética del TMX .....	7
1.7	Acetilcolina.....	9
1.7.1	Receptores de ACh.....	10
1.8	Estructura y función del testículo .....	12
<b>2</b>	<b>Antecedentes .....</b>	<b>15</b>
2.1	Toxicidad del TMX en la reproducción de mamíferos.....	16
<b>3</b>	<b>Pregunta de investigación.....</b>	<b>20</b>
<b>4</b>	<b>Hipótesis.....</b>	<b>20</b>
<b>5</b>	<b>Objetivos .....</b>	<b>20</b>
5.1	General.....	20
5.2	Específicos .....	20
<b>6</b>	<b>Diseño experimental .....</b>	<b>21</b>
<b>7</b>	<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>23</b>
7.1	Dosis y vía de administración.....	23
7.2	Obtención de órganos.....	23
7.3	Testículo y epidídimo .....	24
7.4	Índice gonado-somático .....	24
7.5	Técnica histológica .....	25
7.6	Evaluación histológica .....	25

7.7	Obtención de los espermatozoides de epidídimo .....	26
7.8	Movilidad espermática epididimaria .....	26
7.9	Concentración espermática epididimaria .....	27
7.10	Anormalidades morfológicas .....	27
7.11	Mediciones de área de túbulo seminífero y área luminal .....	29
7.12	Análisis Estadístico .....	29
<b>8</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>30</b>
8.1	Peso de ratas Wistar tratadas con Tiametoxam .....	30
8.2	Pesos de órganos reproductores .....	32
8.3	Índice gonado-somático de testículo .....	34
8.4	Índice gonado-somático de epidídimo .....	35
8.5	Concentración espermática .....	37
8.6	Viabilidad espermática epididimaria .....	38
8.7	Anormalidades morfológicas .....	39
8.8	Movilidad espermática epididimaria .....	43
8.9	Histología testicular .....	46
8.10	Índice de maduración del epitelio seminífero .....	51
8.11	Índice de diferenciación .....	53
8.12	Número de espermatogonias .....	54
8.13	Número de espermatoцитos .....	55

8.14	Área de túbulos seminíferos y lumen .....	56
<b>9</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>58</b>
9.1	Efectos generales del TMX sobre el peso corporal y los órganos reproductivos .....	58
9.2	Efectos del TMX sobre la espermatogénesis y calidad espermática .....	59
9.3	El TMX aumentó las anomalías morfológicas espermáticas .....	61
9.4	Daño tisular y alteraciones histológicas en túbulos seminíferos .....	63
9.5	Índices de diferenciación y maduración: espermatogénesis alterada .....	64
9.6	Efectos del TMX en la espermiogénesis y espermiación .....	65
<b>10</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>66</b>
<b>11</b>	<b>Perspectivas.....</b>	<b>67</b>
<b>12</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>68</b>
<b>13</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>80</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1. Estructura química de la nicotina.</b> .....	<b>2</b>
<b>Figura 2. Estructura química de los neonicotinoides</b> .....	<b>3</b>
<b>Figura 3. Mecanismo de acción propuesto para la regulación del nAChR en presencia de acetilcolina (A) o neonicotinoides (B)</b> .....	<b>4</b>
<b>Figura 4 Estructura del testículo y epidídimo.</b> .....	<b>13</b>
<b>Figura 5 Estructura del epitelio seminífero</b> .....	<b>14</b>
<b>Figura 6. Diseño experimental del tratamiento con Tiametoxam (TMX) en rata Wistar.</b> .....	<b>21</b>
<b>Figura 7. Diagrama de la técnica histológica de testículos de rata Wistar.</b> .....	<b>22</b>
<b>Figura 8. Testículo y epidídimo de rata Wistar.</b> .....	<b>24</b>
<b>Figura 9. Fotomicrografía de morfológica espermática.</b> .....	<b>28</b>
<b>Figura 10. Corte transversal de testículo de rata Wistar.</b> .....	<b>29</b>
<b>Figura 11. Efecto del Tiametoxam sobre el peso corporal de ratas macho Wistar.</b> .....	<b>31</b>
<b>Figura 12. Efecto de Tiametoxam (TMX) en la morfología de testículo y epidídimo de ratas Wistar</b> .....	<b>33</b>
<b>Figura 13. Efecto del Tiametoxam sobre el peso de los testículos y epidídimos de ratas macho Wistar.</b> .....	<b>34</b>
<b>Figura 14. Efecto del Tiametoxam (TMX) sobre el índice gonado-somático de ratas Wistar.</b> .....	<b>35</b>
<b>Figura 15. Efecto de Tiametoxam (TMX) sobre el índice somático de epidídimo de ratas Wistar</b> .....	<b>36</b>

<b>Figura 16. Concentración espermática de ratas tratadas con Tiametoxam (TMX).</b>	37
.....	
<b>Figura 17. Viabilidad espermática de ratas tratadas con Tiametoxam (TMX).</b> .....	38
<b>Figura 18. Morfología de la cabeza de espermatozoides de ratas tratadas con Tiametoxam (TMX).</b> .....	39
<b>Figura 19. Morfología del flagelo de espermatozoides de ratas tratadas con Tiametoxam (TMX).</b> .....	40
<b>Figura 20. Gota citoplasmática en espermatozoides de ratas tratadas con Tiametoxam (TMX).</b> .....	41
<b>Figura 21. Exceso de citoplasma residual en espermatozoides de ratas tratadas con TMX.</b> .....	42
<b>Figura 22. Fotomicrografía de viabilidad espermática de ratas tratadas con TMX.</b>	
.....	43
<b>Figura 23. Movilidad espermática de ratas tratadas con TMX.</b> .....	45
<b>Figura 24. Tejido testicular de ratas Wistar de grupo control.</b> .....	46
<b>Figura 25. Tejido testicular de ratas Wistar tratadas con TMX-25.</b> .....	47
<b>Figura 26. Tejido testicular de ratas Wistar tratadas con TMX-50.</b> .....	48
<b>Figura 27. Tejido testicular de ratas Wistar de grupo control, TMX-25 y TMX-50.</b>	
.....	49
<b>Figura 28. Índice de Jonhsen en los túbulos seminíferos de las ratas Wistar tratadas con TMX.</b> .....	53
<b>Figura 29. Índice de diferenciación en los túbulos seminíferos de las ratas Wistar tratadas con TMX.</b> .....	54

**Figura 30.** Número de espermatogonias en los túbulos seminíferos de ratas Wistar tratadas con TMX.....55

**Figura 31.** Número de espermatocitos en los túbulos seminíferos de ratas Wistar tratadas con TMX.....56

**Figura 32.** Área y lumen de los túbulos seminíferos de ratas Wistar tratadas con TMX.....57

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Nivel máximo de residuo de TMX permitido.....	6
<b>Tabla 2.</b> Clasificación Toxicológica de Plaguicidas de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud.....	9
<b>Tabla 3.</b> Efecto del Tiametoxam en el peso de ratas Wistar macho.....	31
<b>Tabla 4.</b> Efecto de Tiametoxam en el índice gonado-somático de testículo y de epidídimo de ratas Wistar.....	36
<b>Tabla 5.</b> Cambios histológicos en testículo de ratas tratadas con Tiametoxam.....	50
<b>Tabla 6.</b> Clasificación de los túbulos seminíferos del grupo control y grupos tratados de acuerdo con los criterios de Johnsen (1970).....	52
<b>Tabla 7.</b> Área y lumen de los túbulos seminíferos en ratas Wistar tratadas con Tiametoxam (TMX) durante 6 semanas.....	57

## Resumen

Los insecticidas neonicotinoides actúan sobre los receptores nicotínicos de la acetilcolina (nAChR). Su uso se incrementó debido a su baja toxicidad aguda en humanos. Estudios en mamíferos indican que la exposición crónica a estos compuestos causa daños en el sistema reproductor masculino, alterando la espermatogénesis y la calidad espermática. El neonicotinoide Tiametoxam (TMX) ha demostrado disminuir las enzimas antioxidantes y alterar la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de enzimas esteroides. El objetivo de este estudio fue determinar los efectos de la exposición crónica al TMX en los testículos y espermatozoides del epidídimo de ratas macho Wistar. Se formaron tres grupos de seis ratas de ocho semanas de edad. Al grupo control se le administró agua potable, mientras que a los dos grupos experimentales se les administraron 25 y 50 mg/kg/día de TMX (TMX-25 y TMX-50, respectivamente). No se observó efecto significativo en el peso de los testículos y epidídimos. El TMX disminuyó significativamente la viabilidad de los espermatozoides del 95% al 90% con TMX-25 y al 80% con TMX-50. La concentración espermática disminuyó de  $20 \times 10^6$  espermatozoides/mL en el grupo control, a  $5 \times 10^6$ /mL con TMX-25, y a  $11 \times 10^6$ /mL con TMX-50. El TMX-25 no tuvo efecto en las anormalidades morfológicas en el flagelo, sorpresivamente disminuyeron significativamente con TMX-50; la presencia de gotas citoplasmáticas fue mayor en el grupo de TMX-50 que en el grupo control y hubo una tendencia a incrementarse también con TMX-25, pero no fue significativa. El citoplasma residual mostró tendencia a incrementarse con la concentración, pero no fue significativa la diferencia. El tejido testicular mostró daños en la arquitectura con ambas dosis, la lámina basal fue más

delgada y los túbulos seminíferos perdieron la forma redondeada. Algunas espermatogonias se desprendieron de la lámina basal y algunos túbulos no contenían espermatozoides en el lumen. Por otra parte, el índice de maduración disminuyó en ambas dosis, con respecto al control. En la dosis más alta observamos un número mayor de espermatogonias, por lo que el índice de diferenciación fue menor en el grupo de TMX-50 con respecto al control y con las dosis TMX-25, por lo que concluimos que la diferenciación a espermatoцитos se está afectando. Además, el área de los túbulos y área luminal se redujo de una manera dependiente de la dosis. En conclusión, la administración crónica de TMX en ratas adultas afectó la viabilidad de los espermatozoides de manera dependiente de la dosis, ocasionó daño durante el proceso de la espermatogénesis, hubo mayor número de espermatozoides con anomalías morfológicas, la presencia de gota citoplasmática en los espermatozoides sugirió daño durante la maduración epididimaria. Asimismo, se afectó negativamente la maduración de espermatogonias y su diferenciación a espermatoцитos, además se encontraron lesiones en el tejido testicular.

**Palabras clave:** Tiametoxam, neonicotinoides, testículo, epidídimo, maduración espermática epididimaria, histología testicular.

## Abstract

Neonicotinoid insecticides act on nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). Their use has increased due to their low acute toxicity in humans. Studies in mammals indicate that chronic exposure to these compounds causes damage to the male reproductive system, altering spermatogenesis and sperm quality. The neonicotinoid Thiamethoxam (TMX) has been shown to reduce antioxidant enzyme activity and alter the expression of genes involved in the biosynthesis of steroidogenic enzymes. The aim of this study was to determine the effects of chronic exposure to TMX on the testicular tissue and epididymal sperm of adult male Wistar rats. Three groups of six 8-week-old Wistar rats were formed. The control group received drinking water, while the two experimental groups were administered 25 and 50 mg/kg/day of TMX (TMX-25 and TMX-50, respectively). No significant effect was observed on testis and epididymis weight. TMX significantly reduced sperm viability from 95% in the control group to 90% with TMX-25 and 80% with TMX-50. Sperm concentration decreased from  $20 \times 10^6$  sperm/mL in the control group to  $5 \times 10^6$ /mL with TMX-25 and  $11 \times 10^6$ /mL with TMX-50. TMX-25 did not affect flagellar morphological abnormalities, which unexpectedly decreased significantly in the TMX-50 group. Cytoplasmic droplets were higher in the TMX-50 group than in the control, and there was a non-significant trend toward an increase in the TMX-25 group. Residual cytoplasm also showed a dose-dependent increase, although the difference was not statistically significant. Testicular tissue exhibited structural damage at both doses: the basal lamina was thinner, and the seminiferous tubules lost their round shape. Some spermatogonia detached from the basal lamina; some tubules showed no spermatozoa in the lumen. Furthermore, the maturation index

decreased at both doses compared to the control. At the higher dose, more spermatogonia were observed, resulting in a lower differentiation index in the TMX-50 group than the control and TMX-25 groups, suggesting impaired differentiation into spermatocytes. In addition, tubular and luminal areas reduced in a dose-dependent manner. In conclusion, chronic TMX administration in adult rats negatively affected sperm viability in a dose-dependent manner, caused damage during spermatogenesis, increased the number of sperm with morphological abnormalities, and the presence of cytoplasmic droplets suggested damage during epididymal maturation. Moreover, spermatogonial maturation and differentiation into spermatocytes were negatively affected, and histological damage was observed in testicular tissue.

**Keywords:** Thiamethoxam, neonicotinoids, testicle, epididymis, epididymal sperm maturation, testicular histology

# 1 Introducción

La reproducción es un proceso biológico sensible a factores ambientales y químicos. Dentro de este contexto, la toxicología reproductiva estudia los efectos adversos que los xenobióticos provocan en el sistema reproductor, incluyendo alteraciones hormonales, daño celular en las gónadas, y disminución de la funcionalidad de los gametos. La toxicología reproductiva se ha vuelto decisiva ante el incremento del uso de sustancias químicas de síntesis reciente, de las que muchas no se han evaluado suficientemente sus efectos tóxicos en la reproducción (Rodríguez Mercado, 2022).

Este trabajo tiene como objetivo evaluar los efectos del insecticida neonicotinoide Tiametoxam (TMX) sobre el testículo y los espermatozoides del epidídimo de ratas. Nuestro interés radica en su creciente aplicación para la protección agrícola. Esto incrementa la posibilidad de exposición ambiental y ocupacional, tanto en humanos como en organismos no objetivo.

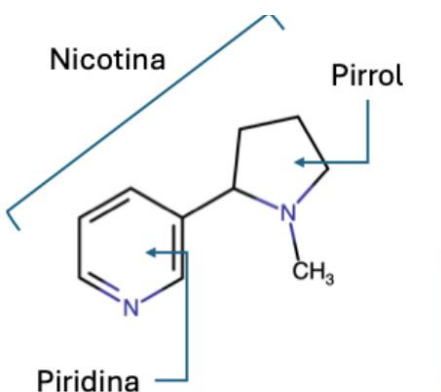
Estudios previos han demostrado que muchos insecticidas, además de su efecto agudo, afectan la salud reproductiva en modelos animales, generando alteraciones en la morfología testicular, estrés oxidante, y reducción en la calidad espermática (Bal et al., 2012; Habotta et al., 2021). Estos hallazgos sustentan la necesidad de investigar al TMX, cuyas consecuencias sobre la reproducción masculina aún no han sido completamente caracterizadas.

Este trabajo busca aportar evidencia experimental al campo de la toxicología reproductiva mediante la observación de cambios histológicos en el testículo y parámetros espermáticos del epidídimo de ratas expuestas al TMX. Esta aproximación

permitirá valorar el riesgo potencial de este compuesto y contribuir al desarrollo de estrategias preventivas y normativas en salud ambiental y ocupacional.

## 1.1 Neonicotinoides

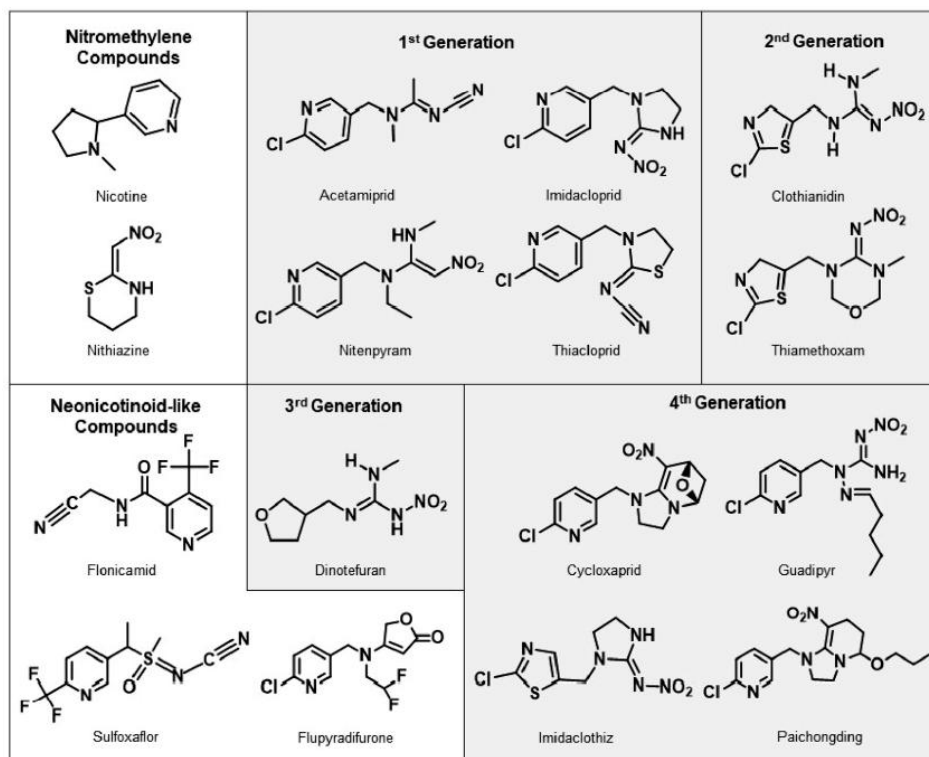
Los neonicotinoides, son insecticidas con estructura química similar a la de la nicotina (Figura 1), se utilizan en el sector agrícola para resguardar cultivos y aumentar rendimientos de cosechas, en hogares para eliminar insectos o incluso en mascotas para combatir pulgas y piojos. Pese a su amplio uso, existen pocos informes sobre sus efectos tóxicos en la reproducción humana (Cavieres, 2004).



**Figura 1. Estructura química de la nicotina.**

Tomada de (Ortíz- Sánchez et al., 2024).

El TMX, introducido recientemente en el mercado, es un insecticida perteneciente a los neonicotinoides de segunda generación (Figura 2). Los neonicotinoides representan más del 25% del total de plaguicidas utilizados mundialmente (Bass et al., 2015; Zhao et al., 2020).



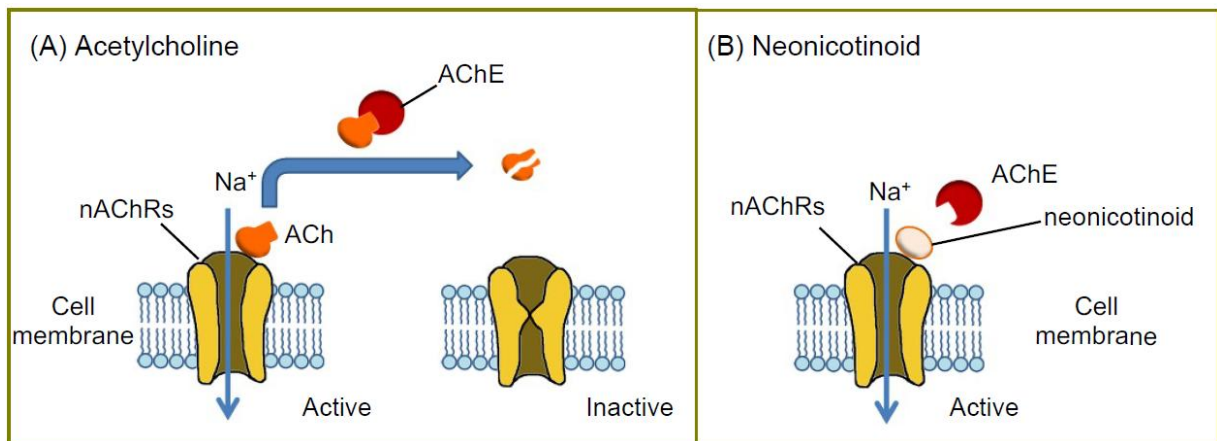
**Figura 2. Estructura química de los neonicotinoides**

(Tomada de Thompson et al., (2020).

## 1.2 Mecanismo de Acción

Los neonicotinoides se consideran insecticidas sistémicos, es decir, son absorbidos por las hojas o raíces tratadas y se distribuyen al resto de la planta a través del sistema vascular, lo que la vuelve tóxica para que los insectos considerados una plaga en el cultivo sean eliminados (Kahl, 2022; Suwannarin et al., 2021). Los neonicotinoides tienen afinidad por los receptores nicotínicos de la acetilcolina, (nAChR), receptor excitador principal del sistema nervioso central de los insectos; se unen a ellos y no son degradados por la acetilcolinesterasa, causando una unión localizada del neonicotinoide en el receptor (Figura 3). La acetilcolina (ACh) regula la apertura y cierre de los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , el neonicotinoide actúa como agonista de la ACh en

el nAChR y no es degradado por la acetilcolinesterasa lo que conlleva a una sobreestimulación irreversible y continua del receptor, con una entrada sostenida de iones, que en exceso conduce a muerte del insecto (Seifert, 2014). En humanos y otros mamíferos también se encuentran estos receptores en algunos tipos celulares como se explicará con detalle más adelante, es por ello por lo que el TMX puede tener efecto sobre organismos no objetivo que también presentan receptores para ACh. El neonicotinoide no es degradado por la acetilcolinesterasa, probablemente porque también se une al sitio activo de la enzima y forma enlaces no covalentes fuertes con residuos que normalmente hidrolizan ésteres de colina, lo que sugiere una inhibición temporal de la acetilcolinesterasa (Terali, 2018).



**Figura 3. Mecanismo de acción propuesto para la regulación del nAChR en presencia de acetilcolina (A) o neonicotinoides (B)**

(Chang et al., 2013).

### **1.3 Los neonicotinoides en la contaminación ambiental**

Los neonicotinoides están presentes en el ambiente, no solo contaminan el terreno agrícola, sino que también, fuentes de agua (Montiel-León et al., 2019), vegetación y fauna no objetivo. Al descomponerse, sus metabolitos pueden llegar a acumularse por varios años en las superficies tratadas (Bonmatin et al., 2015; Thompson et al., 2020). En general, los agricultores mexicanos desconocen el riesgo y la forma adecuada de utilizar insecticidas, al no utilizar la protección adecuada, por lo que se exponen por inhalación y absorción percutánea mediante el rociado. La exposición a los neonicotinoides se ha relacionado con alteraciones de hormonas sexuales en trabajadores agrícolas (Suwannarin et al., 2021), cuando se combina con otros plaguicidas, puede potenciar su toxicidad, los agricultores suelen combinar los insecticidas para mejorar la protección de sus cultivos afectando no solo a humanos, también a otros mamíferos como, cerdos, bovinos o vacas que pueden afectar su reproducción (Ortíz- Sánchez et al., 2024; Zhao et al., 2020). Uno de los insecticidas neonicotinoides utilizado actualmente en el campo mexicano es el TMX.

### **1.4 Uso de TMX en cultivos agrícolas**

En México algunos cultivos que se tratan con TMX incluyen el limón, jitomate, caña de azúcar, algodón y chile (Syngenta, 2017). Las cantidades de TMX que se usan en los cultivos y los residuos que quedan en el ambiente se describen en la Tabla 1. De acuerdo con las normas internacionales de los alimentos, establecidos por el Codex Alimentarius (CODEX) de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se han establecido los niveles de residuo máximo de plaguicida permitido (MRL) que pueden

tener un valor de 0.01 a 0.15 mg/kg/día (CODEX, 2021) mientras que las dosis utilizadas de TMX en gramos por hectárea de cultivo son grandes en comparación con los MRL, pues se usan en un rango de 200 a 600 g/ha de cultivo (Syngenta, 2017). Lo que produce cantidades grandes de residuos de pesticida en los alimentos agrícolas.

**Tabla 1.** Nivel máximo de residuo de TMX permitido.

Cultivo	MRL (mg/kg/día)	Dosis (g/Ha)	Residuo (mg/kg)
Caña de azúcar	0.01	200-250	0.02
Algodón	0.02	200-400	0.05
Jitomate	0.2	600	0.02
Frutillas	0.5	300-400	0.11
Chile	0.7	300-400	0.24

La dosis representa los (g/Ha) de TMX que se utilizan en cada cultivo, mientras la columna Residuo (mg/kg) representa la concentración de residuos que se han encontrado en los cultivos después de la aplicación del tóxico.(CODEX, 2021; FAO-WHO)

### 1.5 Toxicidad en mamíferos

Además de los daños a los insectos blanco, los neonicotinoides ocasionan daño en mamíferos. En 2016 se demostró que los insecticidas TMX y acetamiprid (ACE)

administrados a una dosis de 1/10 de la DL50 de ambos insecticidas por vía oral. en ratas albinas macho, ocasionaron alteraciones en los niveles de enzimas antioxidantes, en la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE), en el nivel de testosterona, cambios en las concentraciones de colesterol y triglicéridos, además de modificaciones histológicas en corazón, cerebro y testículos. Concluyendo que TMX y ACE estimulan la toxicidad oxidativa, la cardiotoxicidad y la neurotoxicidad (Keshta et al., 2016). Por otra parte, la AChE intrauterina puede desempeñar un papel en la supresión de la reacción acrosomal a través de la subunidad  $\epsilon$  del receptor de acetilcolina (AChRe) que está presente en espermatozoides de ratones; de esta manera, AChRe actúa como un regulador de la reacción acrosomal en espermatozoides de mamíferos para asegurar que ésta solo ocurra en el momento óptimo para la fertilización (Makino et al., 2021).

### **1.6 Farmacocinética del TMX**

En un estudio realizado en el 2013 en ratas con exposición aguda a TMX, reportan que se difunde rápidamente por todo el cuerpo y se elimina a través de la orina 24 horas después de la administración, más del 90% se excreta como compuesto original. El tóxico se absorbe en el tracto gastrointestinal, pasa al torrente sanguíneo y de ahí se distribuye al hueso, cerebro, grasa abdominal, testículos/ovarios, corazón, riñón, hígado, pulmones, plasma, músculo esquelético, bazo y útero; su metabolismo se produce en el hígado, donde se degrada en clotianidina (CTD), su metabolito principal (Bednarska et al., 2013).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica la toxicidad aguda de insecticidas en función de la dosis letal media (DL50) y se consideran como moderadamente

tóxicos a los que, para causar la muerte en el 50% de la población estudiada, se deben aplicar de 50-2000 mg/kg de peso corporal. Con base en esta clasificación, la DL50 de TMX, administrado por vía oral en rata fue de 1563 mg /kg de peso corporal, tanto en machos como en hembras, por lo que corresponde a tóxicos de clase II, moderadamente peligrosos (Tabla 2); en organismos no objetivo expuestos a este insecticida, pueden presentarse reacciones dañinas como irritación en ojos, piel y mucosas respiratorias (OMS, 2019; Syngenta, 2019).

Aunque el insecticida es considerado moderadamente peligroso, en mamíferos representa un riesgo debido a la unión continua del insecticida con los nAChR (Wang et al., 2018), estos receptores pueden encontrarse en el cerebro, en células de las vías respiratorias, células endoteliales, tracto digestivo, piel, riñón, tracto urogenital, placenta (Wessler & Kirkpatrick, 2008) y células de Leydig (Karlin, 2010). Los nAChR intervienen en la transducción de señales que tienen un papel fundamental en muchos procesos fisiológicos tales como transductores de señales y regular funciones celulares como la diferenciación, migración, proliferación, regulación del contacto entre célula-célula, locomoción y transporte de agua y iones (Wessler & Kirkpatrick, 2017).

**Tabla 2.** Clasificación Toxicológica de Plaguicidas de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud.

Clase		DL50 para la rata (mg/kg de peso corporal)	
		Oral	Dérmica
1a	Sumamente peligroso	<5	<50
1b	Muy peligroso	5-50	50-200
II	Moderadamente peligroso	50-2000	200-2000
III	Muy peligroso	Más de 2000	Más de 2000

Tomado de: (OMS, 2019).

### 1.7 Acetilcolina

La ACh es una monoamina, que se encuentra principalmente, en las vesículas sinápticas de las neuronas colinérgicas (Barrett & Ganong, 2010). No obstante, la ACh tiene acción en células no inervadas por fibras colinérgicas neuronales; como las células epiteliales de las vías respiratorias, intestino, piel, urotelio, vagina, placenta, córnea; células de la granulosa; células endoteliales e inmunitarias y células de la grasa subcutánea (Wessler & Kirkpatrick, 2008). En la reproducción, se ha encontrado que la síntesis y liberación de ACh puede desempeñar funciones en la señalización celular local. Se ha encontrado la subunidad  $\epsilon$  (AChRe) en los testículos y espermatozoides murinos. También mediante técnicas de inmunohistoquímica se ha encontrado en testículos de rata la expresión de la subunidad  $\alpha 7$  del nAChR en espermatogonias, espermatoцитos, así como en las células de Sertoli (Schirmer et al., 2011) y en el espermatozoide se ha reportado su papel en la movilidad.(Bray, Son,

Kumar, et al., 2005; Bray, Son, & Meizel, 2005) Por otra parte, en el espermatozoide humano se reportó la presencia de las subunidades  $\alpha$  3, 5,7 y 9, y  $\beta$  4 del nAChR (Kumar & Meizel, 2005).

### **1.7.1 Receptores de ACh**

Los receptores colinérgicos se clasifican en; muscarínicos (mAChR) y nicotínicos (nAChR), a la vez se subclasifican, de acuerdo con su ubicación; los que se encuentran en el cerebro, en el corazón, en músculo liso, en tejido e islotes pancreáticos (Barrett & Ganong, 2010). Los nAChR están compuestos por cinco subunidades que forman un conducto, son canales iónicos permeables  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^{+}$ , aunque con diferentes afinidades según el subtipo de nAChR (Albuquerque et al., 2009). Se reportó la expresión de ambos receptores de ACh en células de Leydig en los testículos (Karlin, 2010) y espermatozoides de mamíferos, entre ellos rata y humano (Kumar & Meizel, 2005; Schirmer et al., 2011).

Las células madre embrionarias de ratones, las células epiteliales, endoteliales e inmunitarias sintetizan ACh, que a través de receptores nAChR y mAChR modulan las actividades celulares para responder a estímulos internos o externos (Wessler & Kirkpatrick, 2008).

A través de mecanismos autocrinos y paracrinos la ACh del sistema no neuronal se une a los receptores para ACh, los cuales se expresan en las células de mamíferos anteriormente mencionadas, de manera que funcionan como transductores de señales y regulan funciones celulares como la diferenciación, migración, proliferación,

regulación del contacto entre célula-célula, locomoción y transporte de agua y iones (Wessler & Kirkpatrick, 2017).

Se ha encontrado ACh en células que cubren las superficies internas y externas de ratas y humanos. Por ejemplo, en humanos se ha encontrado en la superficie del epitelio de bronquios, boca, intestino delgado y grueso, vesícula biliar, vagina, piel y en la pleura pulmonar; mientras que en ratas se ha encontrado en el epitelio traqueal e intestinal (Klapproth et al., 1997).

La placenta humana también sintetiza, almacena y libera ACh (Wessler et al., 2001). Los linfocitos expresan ACh. la estimulación de los nAChR con ACh o nicotina provoca una señalización rápida y transitoria de  $Ca^{2+}$  en los linfocitos T y B, probablemente a través de vías mediadas por la subunidad  $\alpha 7$  nAChR. Es probable que el sistema colinérgico en los linfocitos esté implicado en la regulación de la función inmunitaria debido a que en animales experimentales con anomalías inmunológicas presentan una actividad colinérgica linfocítica alterada (Kawashima & Fujii, 2004).

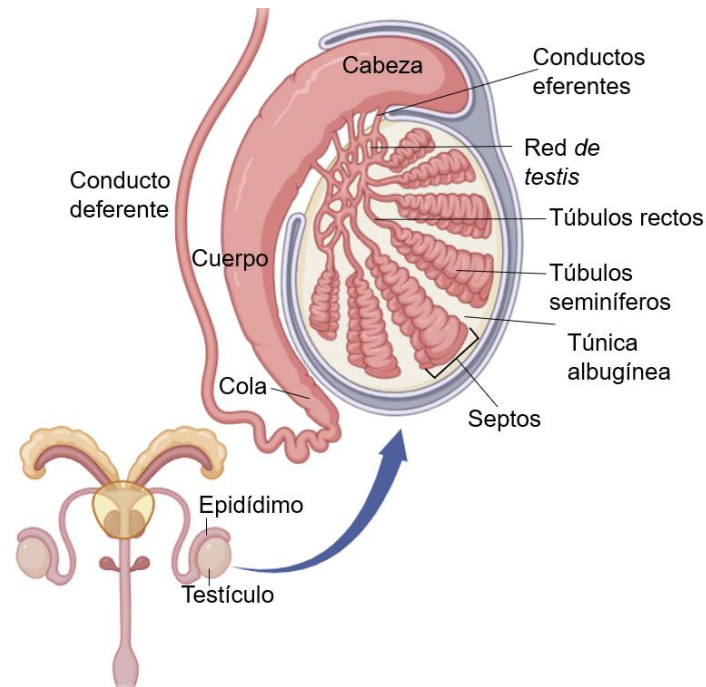
En el epitelio gingival y esofágico humano se encontró expresión de ARNm para las subunidades nAChR  $\alpha 3$ ,  $5$ ,  $7$  y  $\beta 2$ , colina acetiltransferasa y las formas asimétricas y globulares de AChE. Además, los nAChR expresados por estos epitelios regulan la movilidad y la adhesión celular (Nguyen et al., 2000).

Dado que el sistema colinérgico desempeña un papel clave en la reproducción de mamíferos, es primordial abundar en el estudio de los efectos del TMX sobre la fisiología del testículo y epidídimo. En este sentido este proyecto busca entender los mecanismos subyacentes y los efectos específicos del TMX en la reproducción masculina. Dado el uso extendido de TMX y otros neonicotinoides, los resultados de

esta investigación podrían influir en políticas de salud pública y en la regulación de plaguicidas, asegurando así un enfoque más seguro y sostenible para el control de plagas en la agricultura. La protección de la salud reproductiva es esencial no solo para la biodiversidad y la integridad ecológica, sino también para la salud humana y el bienestar a largo plazo. Además, se sabe poco sobre el daño que el TMX produce en la fisiología espermática y testicular, por lo que es necesario estudiar los daños en la histología testicular y en los espermatozoides durante la maduración epididimaria.

### **1.8 Estructura y función del testículo**

Dentro de los testículos (figura 4) se encuentran los túbulos seminíferos que desembocan en una red de túbulos rectos formando la red de testis que converge con los conductos eferentes, los cuales transportan a los espermatozoides a la cabeza del epidídimo (O'Donnell et al., 2017). Los espermatozoides atraviesan el epidídimo que se divide en 4 secciones en segmento inicial (en rata), cabeza (caput), cuerpo (corpus) y cola (cauda) para completar su maduración; finalmente los espermatozoides llegan al conducto deferente, pasan a través de los conductos eyaculadores hasta la uretra y al cuerpo de la próstata en el momento de la eyaculación (Barrett & Ganong, 2010).



**Figura 4 Estructura del testículo y epidídimo.**

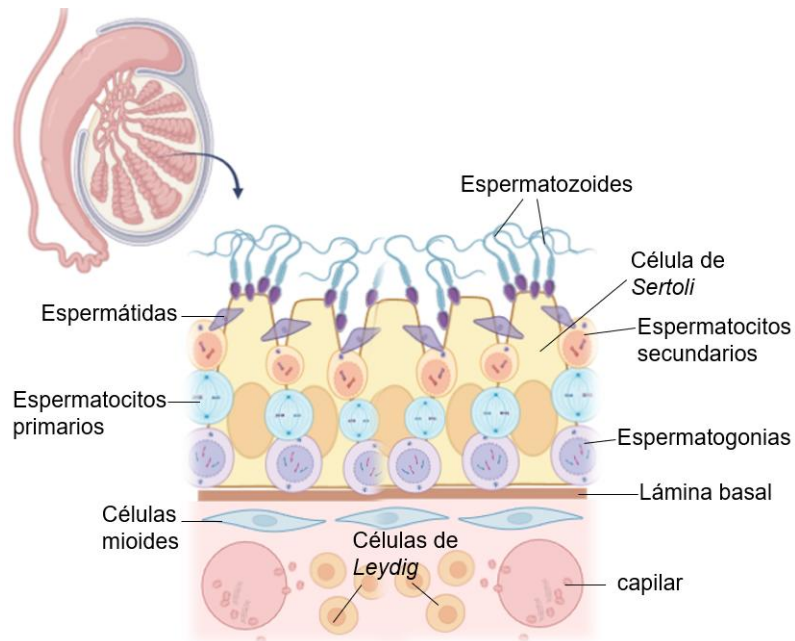
*Creado en Biorender.com*

En los túbulos seminíferos se realiza la espermatogénesis, es decir la formación de los espermatozoides. Entre los túbulos seminíferos existe tejido intersticial que contiene a las células intersticiales de Leydig las cuales secretan testosterona (Barrett & Ganong, 2010).

Las paredes de los túbulos seminíferos están revestidas por células espermatogénicas y células de Sertoli que se extienden desde la lámina basal del túbulo hasta la luz y están en contacto con las células espermatogénicas para su nutrición y soporte (Barrett & Ganong, 2010; Cheng & Sun, 2008). Entre las células de Sertoli se forman uniones estrechas cerca de la lámina basal para formar la barrera hematotesticular y ayudar a crear un microambiente adecuado para la formación y desarrollo espermatogénico (Cheng & Sun, 2008), también divide el epitelio seminífero en dos

compartimientos, el basal que contiene espermatogonias, y el espacio adluminal en el que se encuentran los espermatoцитos primarios y secundarios, espermatidas y espermatozoides (Cheng & Mruk, 2012).

Dentro del túbulo seminífero se encuentran diferentes tipos de células espermatoгénicas dependiendo la fase de la espermatoгénesis (figura 5). Las espermatogonias son las células cercanas a la lámina basal de los túbulos seminíferos, se dividen por mitosis para dar lugar a las espermatogonias tipo A y B. Las espermatogonias B se diferenciarán para formar espermatoцитos primarios que experimentarán división meiótica y formarán espermatoцитos secundarios. Finalmente, los espermatoцитos secundarios sufrirán una segunda meiosis para dar lugar a las espermatidas que maduraran en proceso de espermiogénesis para dar lugar a los espermatozoides que son liberados a la luz del túbulo seminífero en un proceso conocido como espermiación (Barrett & Ganong, 2010; Cheng & Sun, 2008).



**Figura 5 Estructura del epitelio seminífero.** Creado en Biorender.com

## 2 Antecedentes

El TMX, como miembro de segunda generación de los neonicotinoides, posee un mecanismo de acción que afecta los nAChR, cruciales para la función neuromuscular en insectos. Sin embargo, estos receptores también están presentes en varios tejidos de mamíferos, incluyendo el sistema nervioso central, el tracto digestivo, y el sistema reproductivo (Karlin, 2010; Wessler & Kirkpatrick, 2008). La capacidad del TMX para unirse y activar estos receptores en mamíferos plantea un riesgo significativo, dado que podría interferir con procesos fisiológicos esenciales y causar efectos tóxicos en órganos no objetivo, como los testículos (Keshta et al., 2016).

Los estudios previos han señalado que la exposición a neonicotinoides puede resultar en alteraciones histológicas de testículo y cambios en los parámetros espermáticos, lo que podría traducirse en efectos adversos en la fertilidad (Bal et al., 2012; Habotta et al., 2021). Las investigaciones han mostrado que el TMX puede inducir estrés oxidante, afectar los niveles hormonales y causar daño celular en los testículos, comprometiendo así la espermatogénesis y la calidad del espermatozoide (Habotta et al., 2021; Keshta et al., 2016). Además, la evidencia sugiere que la exposición a TMX puede resultar en fragmentación del ADN espermático, lo que puede implicar, a largo plazo, en pérdida de la viabilidad y funcionalidad de los espermatozoides.

El TMX se detecta ampliamente en el medio ambiente, contaminando aguas, suelos y vegetación, lo que incrementa el riesgo de exposición humana a través de la cadena alimentaria (Liu et al., 2022; Montiel-León et al., 2019). Las concentraciones de TMX en aguas superficiales y suelos, así como su presencia en muestras humanas, subrayan la necesidad de evaluar su toxicidad, no solo desde una perspectiva aguda,

sino también a través de exposiciones crónicas de baja dosis, que son más representativas de la exposición real (Anai et al., 2021; López-Trinidad et al., 2021; Pask, 2016; Zhang & Lu, 2022). La exposición a cantidades significativas de TMX en la vida cotidiana y desconocer cuáles son sus efectos a largo plazo son un problema que hay que resolver.

## **2.1 Toxicidad del TMX en la reproducción de mamíferos**

El TMX se utiliza ampliamente y se ha detectado en el ambiente, alimentos y muestras humanas. En las cuencas de China se detectó TMX en todos los sitios de muestreo con concentraciones que van desde 0.13 hasta 92.8 ng/L, según Liu y colaboradores (2022), y de 0.15 hasta 15.3 ng/g según Tan y colaboradores (2016).

Por consideraciones éticas y la dificultad de la toma de muestras sanguíneas, la orina humana se utiliza como biomarcador de la exposición al TMX. En todos los países reportados, excepto Japón, fue inferior a 0.5 ng/mL (Zhang & Lu, 2022). En algunas zonas y poblaciones de Japón se analizaron las concentraciones de TMX en muestras de orina de mujeres embarazadas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS); los resultados fueron de 7.4 y 72 µg de TMX/g de creatina (Anai et al., 2021). Esto puede estar relacionado con la ingesta de alimentos expuestos a TMX entre ellos, brócoli, espinaca, col, lechuga, berenjena, pimiento verde, mandarinas, peras y melón.

Por otra parte, en China, el TMX en orina se detectó por debajo de 0.41 ng/mL (Xu et al., 2022). En algunos estudios en que se pudieron tomar muestras sanguíneas, oscila entre 0.01 y 0.20 ng/mL en el sur de China (Chen et al., 2021; Xu et al., 2021; Zhang & Lu, 2022).

El TMX afecta potencialmente a organismos no objetivo, incluidos los humanos. Según la OMS, es un tóxico de clase III, siendo los órganos blanco principales; el hígado y los riñones (OMS, 2019). Los ratones que se alimentaron de una dieta con TMX durante 50 semanas tuvieron una incidencia de tumores hepáticos mayor (Green et al., 2005). Además, TMX puede unirse a receptores de ACh y reducir los potenciales de acción inducidos por el neurotransmisor, lo que provoca cambios en procesos bioquímicos y conductuales relacionados con la vía colinérgica y aumenta la ansiedad en ratas (Rodrigues et al., 2010). La exposición materna a concentraciones altas de TMX parece reducir el peso corporal de la descendencia y el peso cerebral absoluto. Además, se asocian síntomas típicos neurológicamente relacionados (pérdida de memoria reciente, temblor de dedos, dolor de cabeza, fatiga general, palpitaciones/dolor de pecho, dolor abdominal, dolor/debilidad/espasmo muscular y tos) y atípicos, cuando se encuentra alta concentración de TMX (Marfo et al., 2015).

Estudios en mamíferos, principalmente en ratas y ratones, mostraron que la exposición a neonicotinoides desencadena anomalías morfológicas y funcionales en órganos reproductivos, así como, disminución en la concentración de espermatozoides y alteraciones en la espermatogénesis (Mantovani & Maranghi, 2005). Se cree que los neonicotinoides interactúan con hormonas androgénicas suprarrenales, con el receptor de andrógenos y el receptor de estrógenos, lo que probablemente, ocasione modificaciones en la síntesis, metabolismo y transporte de hormonas reproductivas. Sin embargo, en humanos, solamente existe un estudio que demuestre la relación entre las concentraciones de neonicotinoides y las hormonas endocrinas reproductivas (Suwannarin et al., 2021).

En la actualidad, existen pocos artículos que mencionan el efecto negativo de los neonicotinoides en la histología testicular y en los espermatozoides. Bal y colaboradores, (2012) reportaron que dosis subcrónicas del neonicotinoide CTD en ratas macho provocó disminución significativa en los pesos absolutos de la cauda del epidídimo y de vesículas seminales a dosis de 32 mg/kg/día. También CTD a 8 y 32 mg/kg/día aumentó significativamente las tasas de anomalías morfológicas de la cabeza y cola de los espermatozoides en comparación con el grupo control. La dosis de 32 mg/kg/día redujo significativamente la concentración de espermatozoides en el epidídimo. La apoptosis celular espermatogénica, demostrada por tinción TUNEL, en los túbulos seminíferos de los testículos de ratas de los grupos tratados con CTD mostraron condensación de cromatina, gemación citoplasmática y cuerpos apoptóticos en una manera dependiente de la dosis (Bal et al., 2012). Los mismos autores también evaluaron la fragmentación del ADN como criterio para la apoptosis celular, en dicho estudio se observó fragmentación del ADN aislado de los espermatozoides de ratas expuestas a CTD a dosis de 32 mg/kg/día, también se encontró una reducción estadísticamente significativa en el nivel de testosterona sérica en comparación con el grupo control; también provocó un aumento no significativo en la peroxidación de lípidos, mientras que el nivel de enzimas antioxidantes GSH en el tejido testicular fue significativamente más bajo en las ratas expuestas a CTD.

Mientras que Habotta et al. (2021), sugieren que dosis subcrónicas del TMX en ratas macho causó estrés oxidante, reducción en los niveles testiculares de glutatión y de la actividad antioxidante de las enzimas SOD y CAT, disminución de testosterona, así

como niveles más altos de malondialdehído y ácido nítrico. Además, mediante examen histopatológico se confirmó daño testicular.

Con estas bases, se plantearon la pregunta de investigación, la hipótesis y los objetivos que trataremos en el siguiente apartado.

### **3 Pregunta de investigación**

¿Cuáles son los daños que causa el TMX en la histología del testículo y en el proceso de maduración espermática en la rata macho Wistar?

### **4 Hipótesis**

Si la administración crónica de TMX en ratas adultas causará daños a nivel testicular en ratas Wistar, éstos se verán reflejados a nivel tisular y celular provocando alteraciones en la maduración de espermatozoides de epidídimo.

### **5 Objetivos**

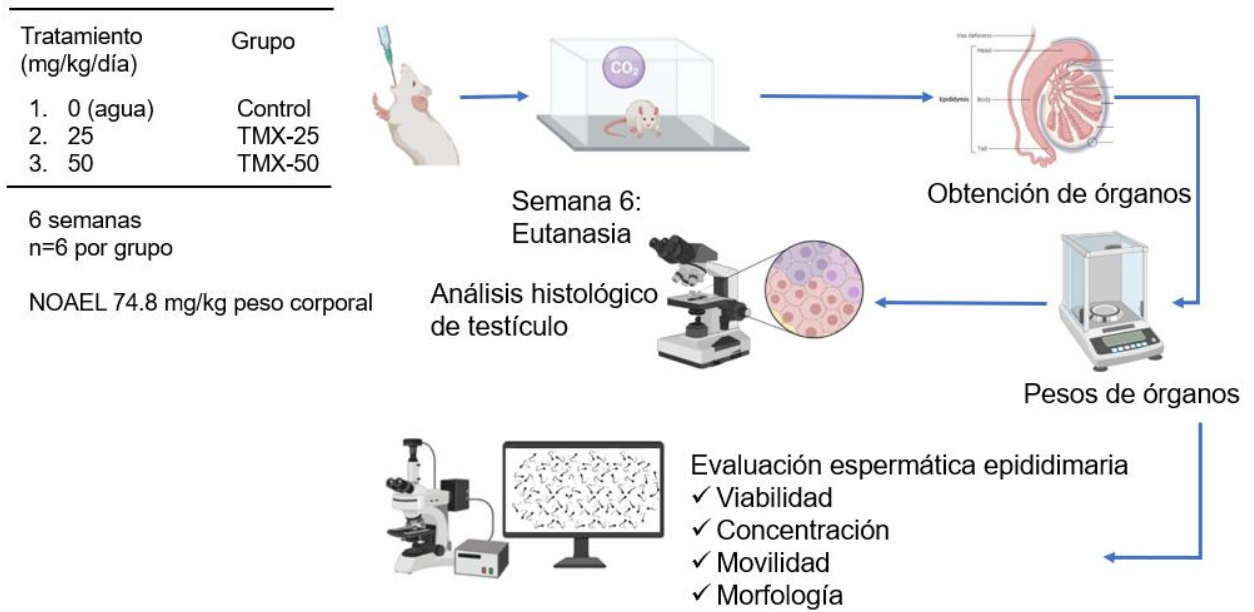
#### **5.1 General**

Determinar los efectos de la exposición crónica al neonicotinoide TMX en el testículo y espermatozoides de epidídimo de rata.

#### **5.2 Específicos**

- Determinar los efectos que produce el TMX en el tejido testicular.
- Evaluar qué efectos produce el TMX en la maduración epididimaria de espermatozoides de rata Wistar.

## 6 Diseño experimental



Análisis Estadístico: ANOVA, Prueba post-Hoc: Tuckey; Kruskal-Wallis, Prueba post-Hoc: Dunn  
Valor estadísticamente significativo  $p < 0.05$

Created in BioRender.com bio

**Figura 6. Diseño experimental del tratamiento con Tiametoxam (TMX) en rata Wistar.**

Se formó un grupo control y dos experimentales de 6 ratas cada uno. Se les administró 25 y 50 mg/kg/día de TMX durante 6 semanas (TMX-25 y TMX-50, respectivamente). En la sexta semana se realizó la eutanasia para obtener los testículos (evaluación histológica) y los epidídimos (espermatozoides), y análisis de la calidad espermática.

## Técnica Histológica



**Figura 7. Diagrama de la técnica histológica de testículos de rata Wistar.**

Los testículos se extrajeron y se fijaron en formol. Se hicieron cortes transversales del testículo y se pasaron por un tren de deshidratación con alcoholes graduales. Se incluyeron en parafina y se hicieron cortes de 5 µm. Se tiñeron con hematoxilina-eosina y se observaron en microscopio de campo claro a 100x y 400x.

## **7 Materiales y métodos**

Para determinar los efectos de la exposición crónica al TMX en el testículo y espermatozoides de rata, se utilizaron un grupo control y dos grupos experimentales formados por 6 ratas macho de la cepa Wistar de 8 semanas de edad. Estos grupos se mantuvieron con agua y alimento *ad libitum*, bajo un ciclo controlado de luz-obscuridad (12hrs:12hrs) dentro del Bioterio de la UAM-Iztapalapa. Los animales fueron manejados de acuerdo con los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (SAGARPA, 2001), en conjunto con los lineamientos de la comisión de Bioética de la investigación, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM-Iztapalapa.

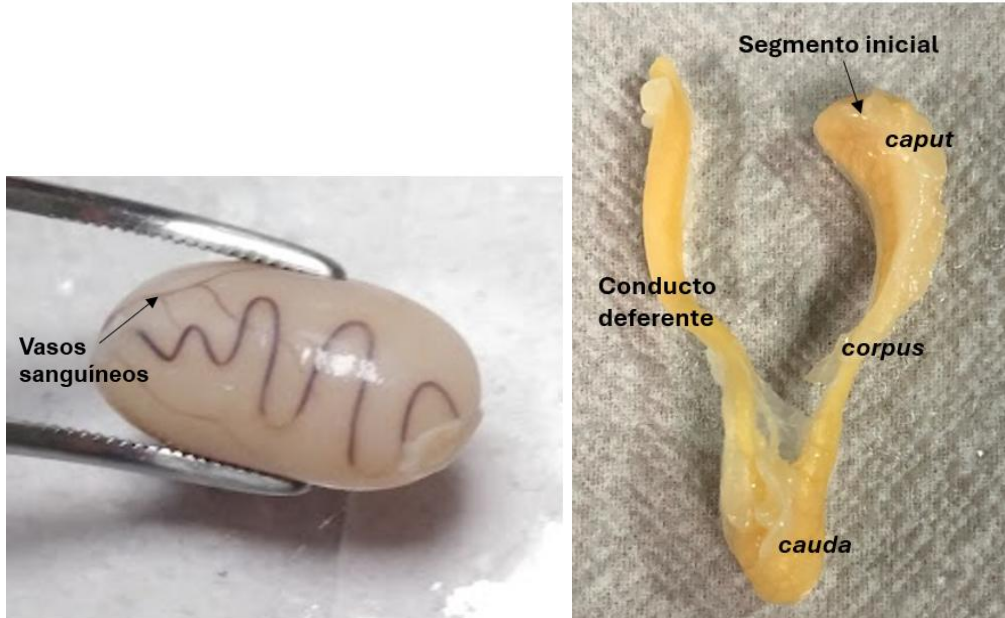
### **7.1 Dosis y vía de administración**

A las ratas del grupo control se les administró agua potable por ingesta forzada, mientras a los grupos experimentales se les administraron también por ingesta forzada utilizó 25 y 50 mg/kg de peso corporal de la rata por día (TMX-25 y TMX-50 respectivamente), durante 6 semanas (Keshta et al., 2016). Se utilizó la formulación comercial de TMX, Ripper de Agroquímicos Versa.

### **7.2 Obtención de órganos**

Se realizó eutanasia a las ratas en cámara de CO<sub>2</sub>, posteriormente se realizó la decapitación para obtener sangre para análisis no incluidos en este proyecto. Se extrajeron los testículos y epidídimos. Cada órgano se pesó en balanza electrónica por separado.

### 7.3 Testículo y epidídimo



**Figura 8. Testículo y epidídimo de rata Wistar.**

Fotografías tomadas en el laboratorio de expresión génica. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

### 7.4 Índice gonado-somático

Se calculó el índice gonado-somático utilizando la misma fórmula para calcular el índice órgano-somático que es la relación entre el peso del órgano y el peso total de espécimen. Se utiliza para determinar si el órgano crece o disminuye de tamaño más que el organismo completo. Se calculó con la siguiente fórmula:

$$IOS = \text{peso} \frac{\text{órgano reproductivo}}{\text{peso corporal}} * 100$$

## **7.5 Técnica histológica**

Se utilizaron los testículos derechos para realizar los ensayos histológicos, se fijaron en formol al 10 % el tiempo que fue necesario para tener consistencia dura, se revisaban las muestras cada tercer día. El material fijado se lavó tres veces durante 10 minutos con agua corriente para eliminar el exceso de fijador. Los testículos se cortaron a la mitad de manera transversal y se pasaron por una serie de alcoholes para su deshidratación: en 30°, 50°, 70°, 80°, 96°, 96°-xilol, xilol; además se les realizaron dos baños de parafina. Finalmente, se orientaron e incluyeron en parafina (Leica Paraplast) a 65°C. Se realizaron cortes de los testículos de 5 µm de grosor y se montaron en portaobjetos. Los cortes se dejaron secar un día y al siguiente día se realizó un tren de tinción de hematoxilina y eosina, para la cual, las muestras se desparafinaron 30 minutos antes de comenzar el tren (anexo 1). Previo al protocolo de tinción, se realizaron pruebas para estandarizar la técnica. Las muestras fueron montadas con Entellan® para ser analizadas mediante el uso del microscopio óptico (Carl Zeiss, Alemania) y se tomaron fotografías con una cámara digital.

## **7.6 Evaluación histológica**

De cada grupo se tomaron al azar tres ratas y de los testículos se hicieron tres cortes transversales de cada uno por lo que se analizaron nueve cortes. Por cada grupo se contaron y analizaron 100 túbulos seminíferos en microscopio óptico (Carl Zeiss, Alemania) y se tomaron fotografías con una cámara digital.

Se determinó:

- El área del túbulo seminífero mediante el software analizador de imágenes ImageJ 1.54-win-java8.

- El área del lumen del túbulo seminífero mediante ImageJ.
- El grado de madurez del epitelio seminífero de Johnsen (1970) (anexo 2), se analizaron las imágenes con el programa CaseViewer.

Para obtener el índice de diferenciación, lo cual es el resultado de dividir el número de espermatoцитos diferenciados entre el número de espermatoгонias observadas, se analizaron las imágenes con el programa CaseViewer, se contó:

- El número de espermatoгонias
- El número de espermatoцитos

### **7.7 Obtención de los espermatozoides de epidídimo**

Después del sacrificio de las ratas, se extrajeron los epidídimos y se pesaron en la balanza electrónica, luego se realizó la perfusión del conducto deferente utilizando una jeringa delgada cargada con PBS precalentado. La cola del epidídimo se segmentó en pequeños cortes transversales y se permitió la salida de los espermatozoides por nado libre (swim-out). Se les realizó una evaluación básica, para determinar movilidad, concentración, viabilidad y anomalías morfológicas de acuerdo con criterios ya establecidos por el 6to Manual de Evaluación de Líquido Seminal de la OMS (WHO, 2021) . Para que la muestra espermática se considere normoespérmica, la movilidad progresiva debe ser >30%, las anomalías <4%, la concentración >16x10<sup>6</sup>/mL y la viabilidad >54% según (WHO, 2021).

### **7.8 Movilidad espermática epididimaria**

El tipo de movilidad se describió según los criterios del manual de la OMS (WHO, 2021). Para observar los espermatozoides al microscopio se preparó un portaobjetos

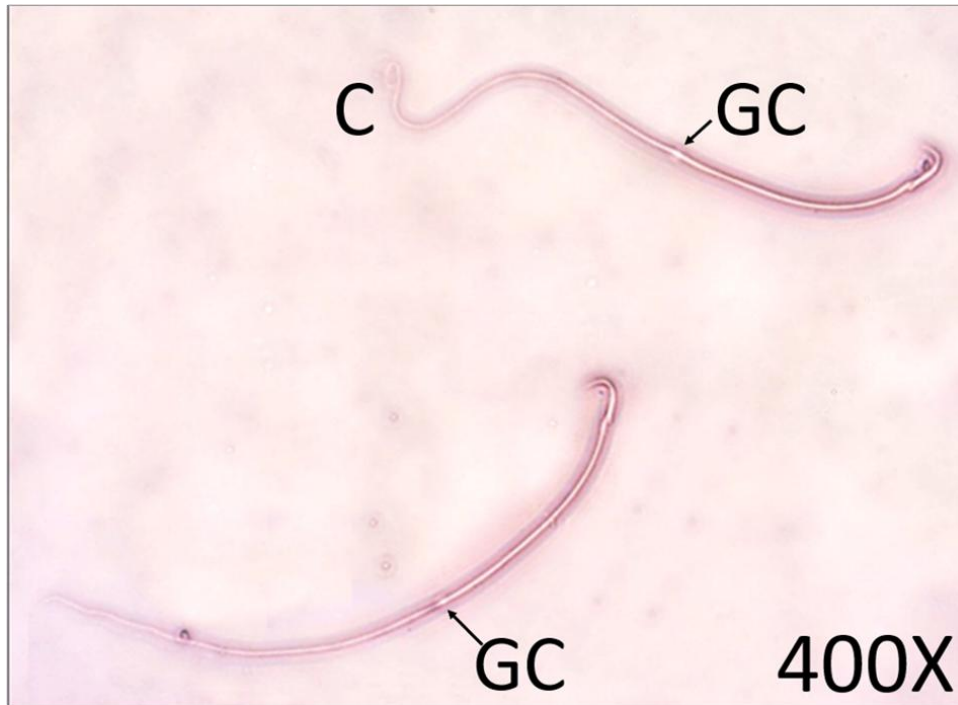
con 2  $\mu\text{L}$  de muestra y 10  $\mu\text{L}$  de PBS y colocó un cubreobjetos. Después se observó al microscopio de contraste de fases a 100x y se estimó el porcentaje de movilidad.

### **7.9 Concentración espermática epididimaria**

La concentración espermática se determinó mediante el uso de la cámara de Neubauer en un microscopio a 100X. La mortalidad se determinó mediante la técnica de tinción con Eosina/Nigrosina (E-N); se mezclaron 5  $\mu\text{L}$  de muestra con 5  $\mu\text{L}$  de solución de tinción en un portaobjetos a 37°C. Se revisaron las preparaciones en microscopio de campo claro a 400x y se consideraron como vivos aquéllos que no presentaron tinción y muertos los teñidos en color rosa a rojo, se cuantificaron 200 espermatozoides. Con los mismos frotis se determinó la proporción de espermatozoides con anomalías morfológicas.

### **7.10 Anormalidades morfológicas**

Las anomalías morfológicas observadas en los espermatozoides fueron en cabeza, flagelos, gota citoplasmática (figura 9) y se consideró como exceso de citoplasma residual a aquellas gotas citoplasmáticas que excedían 1/3 del tamaño de la cabeza del espermatozoide. Se cuantificaron 200 espermatozoides.

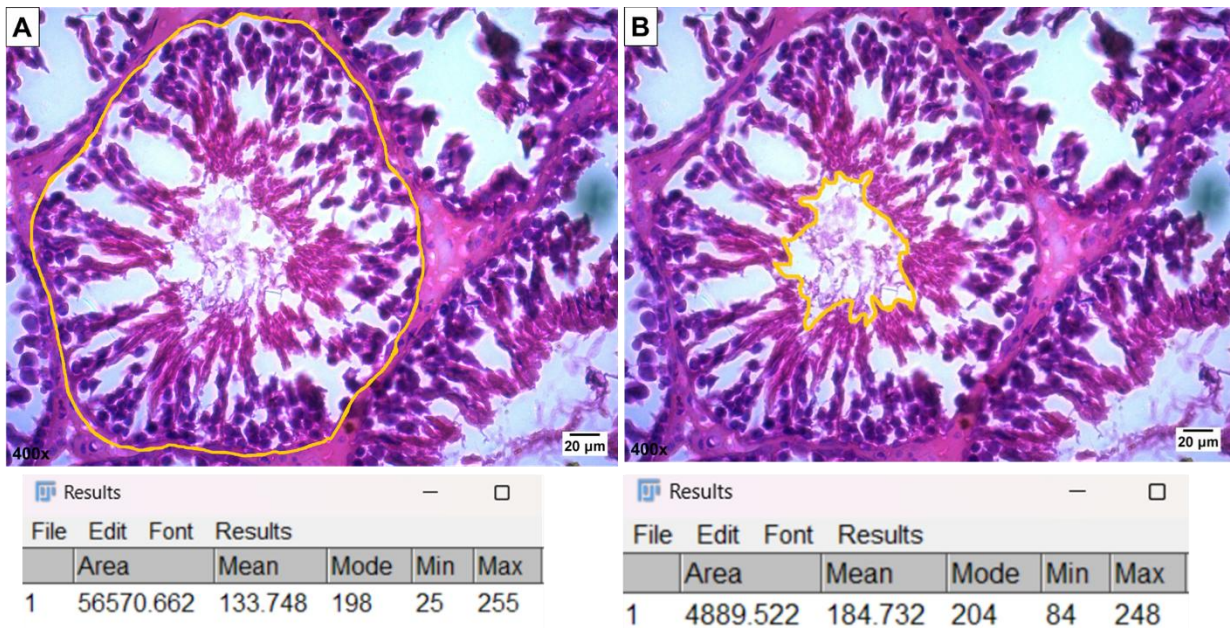


**Figura 9. Fotomicrografía de morfológica espermática.**

*Imagen representativa de espermatozoide teñido con eosina-nigrosina. Esta muestra pertenece al grupo TMX-50. En esta dosis, se observó mayor % de gota citoplasmática (GC) en la pieza principal del espermatozoide y algunas colas enrolladas (C). 400x.*

### 7.11 Mediciones de área de túbulo seminífero y área luminal

Con el programa ImageJ se seleccionó manualmente el borde del túbulo para calcular el área total y el área luminal como se indica en la Figura 10.



**Figura 10.** Corte transversal de testículo de rata Wistar.

Imagen representativa que muestra un corte transversal (5 $\mu$ m) de testículo de rata Wistar con A: medición de área de túbulo seminífero. B: medición de área luminal de túbulo seminífero. Las imágenes se capturaron en analizador de imágenes Zeiss y se midieron con el programa ImageJ, escala de 20  $\mu$ m a 400x.

### 7.12 Análisis Estadístico

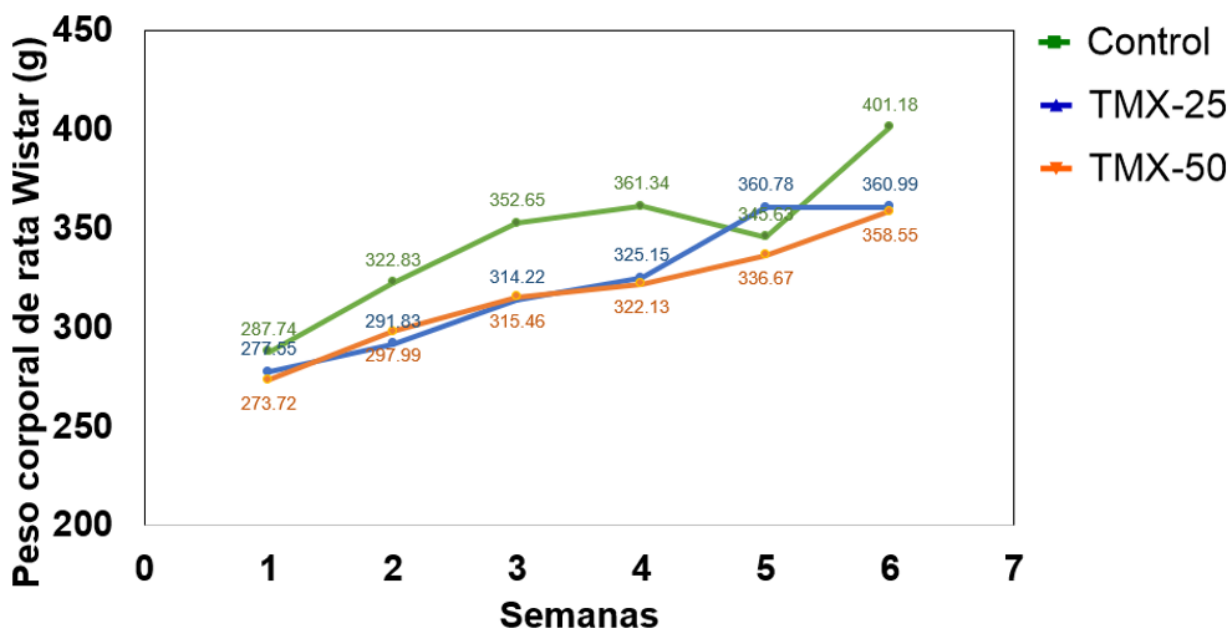
Para determinar si las diferencias entre las medias de los resultados fueron significativas entre el grupo control y los grupos tratados, primero se realizaron pruebas de normalidad y homocedasticidad. En el caso de los datos que fueron normales y con varianzas iguales, se realizó una ANOVA y una prueba “t” de Student. Para datos cuya distribución no fue normal o fue heterocedástica, como en el caso de las

anormalidades morfológicas e índice de diferenciación, la prueba utilizada fue la no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de prueba post-hoc comparación múltiple de Dunn. Para todas las pruebas, la diferencia se tomó como significativa para  $p < 0.05$ . Para la histología se utilizó análisis de superficies teñidas y de células presentes, las medias se compararon mediante la prueba “t” de Student.

## **8 Resultados**

### **8.1 Peso de ratas Wistar tratadas con Tiametoxam**

Las ratas se pesaron dos veces por semana con balanza electrónica y se obtuvo el promedio semanal durante las 6 semanas del grupo control y de los grupos tratados con dosis 25 y 50 mg/kg/día (TMX-25 y TMX-50, respectivamente) como lo indica la Figura 11 y Tabla 3. En general y de manera natural, las ratas subieron de peso cada semana. El grupo control aumentó de manera constante su peso corporal, lo cual es esperado conforme transcurre la edad de las ratas. Mientras que los grupos tratados tuvieron un aumento de peso menos pronunciado en comparación con el grupo control, especialmente en las primeras 3 semanas. El grupo control, a partir de la cuarta semana, parece disminuir su incremento en peso, aunque al final del tratamiento los pesos se aproximaron y no hubo diferencias significativas.



**Figura 11. Efecto del Tiametoxam sobre el peso corporal de ratas macho Wistar.**

Tratamiento durante 6 semanas Grupos: Control, TMX-25 y TMX-50 (Tiametoxam 25 y 50 mg/kg/día). n=6. No se encontraron diferencias significativas entre grupos  $p < 0.05$ . Media  $\pm$  Error estándar de la media.

**Tabla 3. Efecto del Tiametoxam en el peso de ratas Wistar macho**

Semana	Peso de ratas (Media $\pm$ ES)		
	Tratamiento		
	Control	TMX-25	TMX-50
1	287.74 $\pm$ 20.82	277.55 $\pm$ 10.36	273.72 $\pm$ 4.60
2	322.83 $\pm$ 18.06	291.83 $\pm$ 10.18	297.99 $\pm$ 6.03
3	352.65 $\pm$ 18.30	314.22 $\pm$ 11.16	315.46 $\pm$ 9.22
4	361.34 $\pm$ 21.11	325.15 $\pm$ 11.44	322.13 $\pm$ 8.55
5	345.63 $\pm$ 14.24	360.78 $\pm$ 13.13	336.67 $\pm$ 5.26
6	401.18 $\pm$ 24.84	360.99 $\pm$ 10.77	358.55 $\pm$ 8.13

Grupos: Control; TMX-25 y TMX-50, 25 y 50 mg/kg/día, respectivamente. Tratamiento durante 6 semanas. n=6.  $p < 0.05$ . No se encontraron diferencias significativas entre grupos. Media  $\pm$  Error estándar de la media.

## **8.2 Pesos de órganos reproductores**

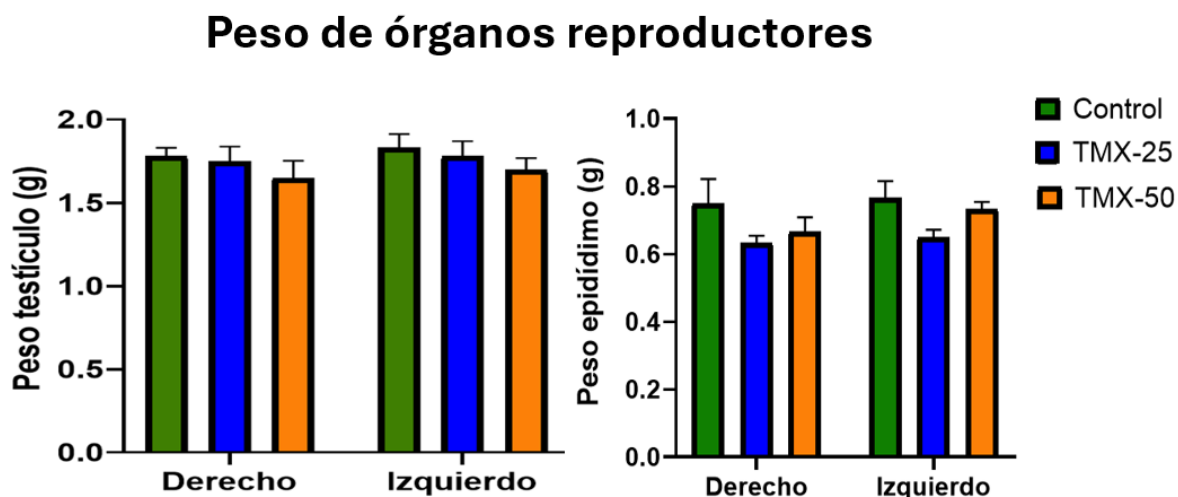
Posterior a la decapitación, una vez disecados, los testículos y epidídimos se pesaron en la balanza analítica. Se observó que los testículos de las ratas del grupo TMX-25 tenían consistencia blanda, mostraban las venas del testículo más gruesas y con grasa visceral. Mientras que los testículos de las ratas del grupo TMX-50 tuvieron mayor hemorragia, con más cantidad de venas y con más flacidez en comparación los grupos control y TMX-25. Por otra parte, la túnica albugínea de los epidídimos de las ratas de los grupos TMX-25 y TMX-50 adelgazó en comparación con el grupo control (Figura 12).



**Figura 12. Efecto de Tiametoxam (TMX) en la morfología de testículo y epidídimo de ratas Wistar**  
*Tratamiento durante 6 semanas. Grupo control (A); TMX-25 (25 mg/kg/día) (B) TMX-50 (50 mg/kg/día) (C). Los testículos tratados con TMX mostraron más flacidez, venas más gruesas y con hemorragia.*

En la figura 13 se muestran los resultados del peso de los testículos y epidídimos de ratas, que fueron tratadas durante 6 semanas con diferentes dosis de TMX. con un promedio de peso en testículos de 1.78 a 1.83 g en el Grupo Control, 1.75 a 1.78 grupo tratado con TMX-25 y 1.65 a 1.7 g grupo tratado con TMX-50. Respecto a los

epidídimos, promedio de peso de 0.75 a 0.77 g en el Grupo Control, 0.6 a 0.7 g grupo tratado con TMX-25 y 0.67 a 0.73 g grupo tratado con TMX-50. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas después del tratamiento.

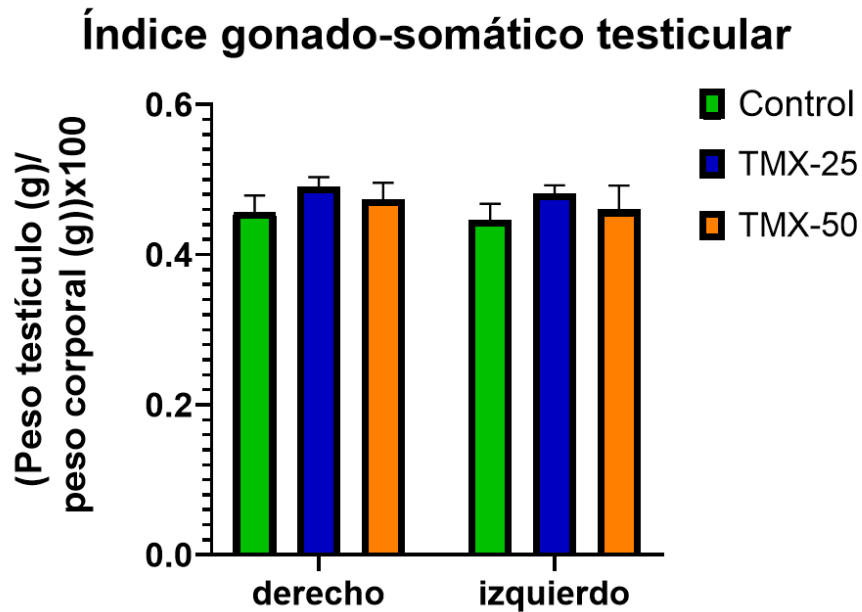


**Figura 13. Efecto del Tiametoxam sobre el peso de los testículos y epidídimos de ratas macho Wistar.**

Grupos: Control, TMX-25 y TMX-50 (Tiametoxam 25 y 50 mg/kg/día). n=6. No se encontraron diferencias significativas entre grupos.  $p < 0.05$  Media  $\pm$  Error estándar de la media.

### 8.3 Índice gonado-somático de testículo

En la figura 14 se representa el índice gonado-somático testicular de las ratas de los grupos Control, TMX-25 y TMX-50. Los valores de promedios de todos los grupos fueron de 0.45 a 0.48 (Tabla 2); no se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos para ninguno de los testículos (derecho e izquierdo), por lo que se concluye que el tratamiento con TMX durante 6 semanas no parece tener efecto sobre el gonado-somático testicular.

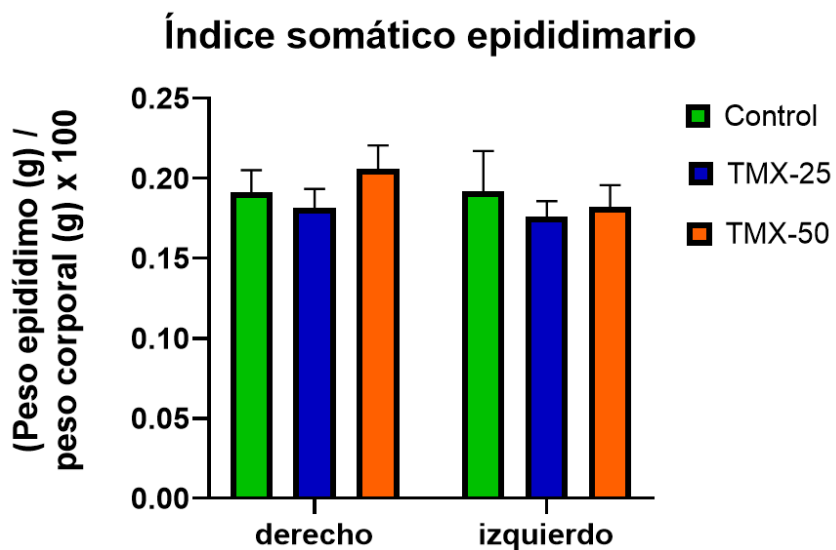


**Figura 14. Efecto del Tiametoxam (TMX) sobre el índice gonado-somático de ratas Wistar.**

Tratamiento durante 6 semanas. Grupos: Control, TMX-25 y TMX-50 (Tiametoxam 25 y 50 mg/kg/día). n= 6 No se encontraron diferencias estadísticas significativas  $p < 0.05$ . Media  $\pm$  Error estándar de la media.

#### 8.4 Índice gonado-somático de epidídimo

En la figura 15 se representa la gráfica de los datos obtenidos de los epidídimos derecho e izquierdo de las ratas de los grupos Control, TMX-25 y TMX-50 tratados durante 6 semanas. El grupo TMX-25 tiene un valor promedio del índice de 0.179, menor en comparación con el control (0.192) y el grupo TMX-50 con valor promedio de 0.195. Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas entre grupos en comparación con el grupo control, por lo que TMX no parece alterar el índice gonado-somático epididimario. En la Tabla 4 se muestran los resultados del índice gonado-somático de los epidídimos y testículos de las ratas de los grupos Control, TMX-25 y TMX-50.



**Figura 15.** Efecto de Tiametoxam (TMX) sobre el índice somático de epidídimo de ratas Wistar

Tratamiento durante 6 semanas. Grupos: Control, TMX-25 y TMX-50 (Tiametoxam 25 y 50 mg/kg/día). n= 6 No se encontraron diferencias estadísticas significativas  $p < 0.05$ . Media  $\pm$  Error estándar de la media.

**Tabla 4.** Efecto de Tiametoxam en el índice gonado-somático de testículo y de epidídimo de ratas Wistar.

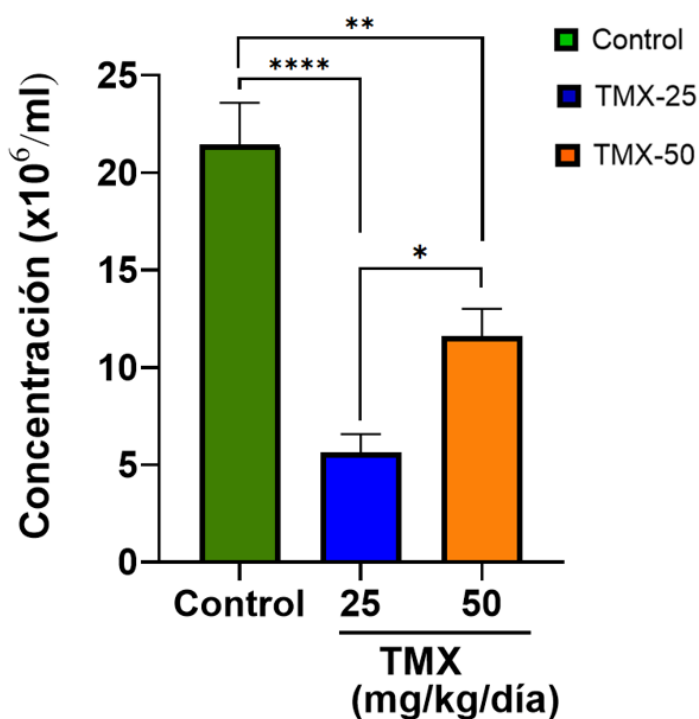
Órgano	Índice gonado-somático		
	TMX (mg/kg/día)		
	Control	25	50
Testículo	0.452 $\pm$ 0.015	0.486 $\pm$ 0.008	0.467 $\pm$ 0.019
Epidídimo	0.192 $\pm$ 0.014	0.179 $\pm$ 0.007	0.195 $\pm$ 0.010

Los datos representan las medias  $\pm$  Error Estándar de la Media de n=6 por grupo. ANOVA seguida de Tukey.

## Calidad espermática

### 8.5 Concentración espermática

La concentración de espermatozoides del grupo control fue de  $20 \times 10^6/\text{mL}$ ; para los grupos experimentales fue de  $5 \times 10^6/\text{m}$  con TMX-25 y  $11 \times 10^6/\text{mL}$  con TMX-50 (Figura 16). Al comparar el grupo control con los experimentales se observa una disminución de 75 y 50% del número de espermatozoides en los grupos TMX-25 y TMX-50, respectivamente. Sorpresivamente, la dosis TMX-50 tuvo una concentración mayor que la dosis TMX-25.

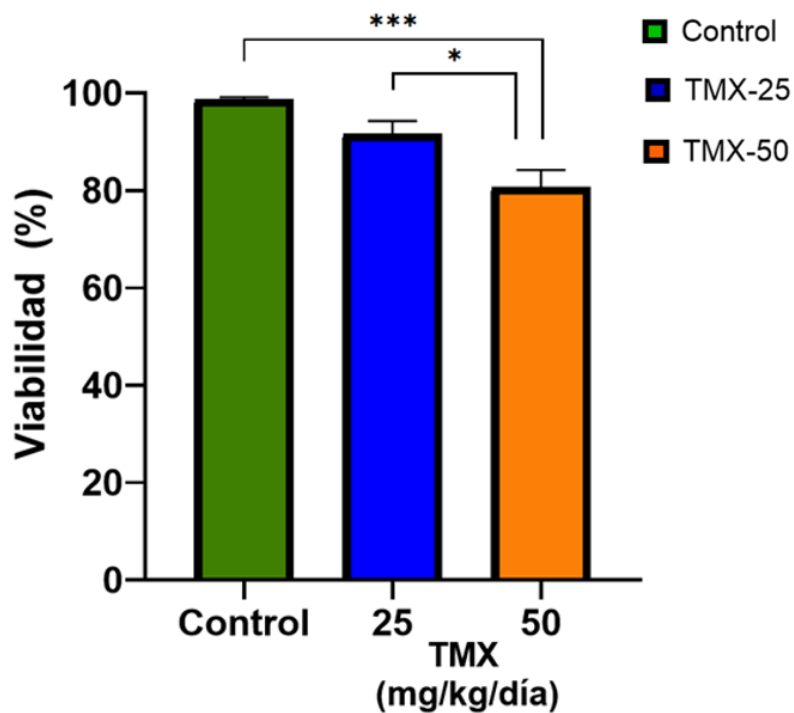


**Figura 16. Concentración espermática de ratas tratadas con Tiametoxam (TMX).**

Tratamiento durante 6 semanas. Grupos: Control, TMX-25 y TMX-50 (Tiametoxam 25 y 50 mg/kg/día).  $n = 6$  Hubo diferencia significativa entre el grupo control y grupos tratados y entre ambas dosis de TMX. de la media,  $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.001^{**}$ ,  $p < 0.0001^{****}$ . Media  $\pm$  Error estándar de la media.

## 8.6 Viabilidad espermática epididimaria

Se obtuvo un porcentaje de 98% de espermatozoides viables en el grupo control, 91% en el grupo TMX-25 y 80% en la dosis de TMX-50, indicando diferencia estadísticamente significativa (Figura 17) Estos resultados muestran que TMX afecta la viabilidad, afirmando que entre mayor sea la dosis de TMX mayor es la mortalidad espermática.

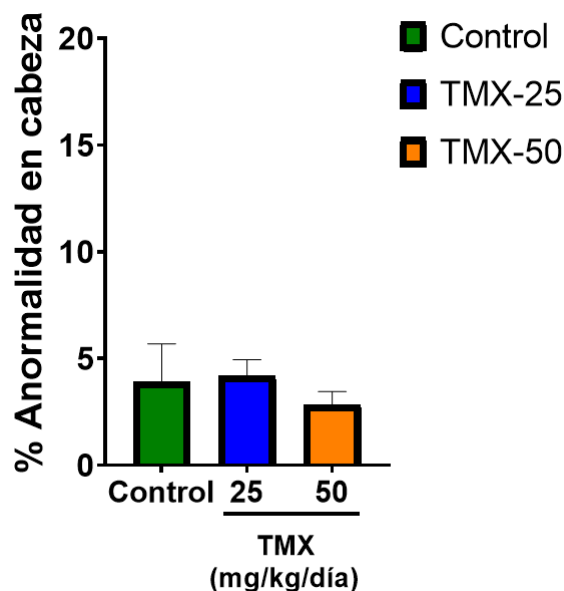


**Figura 17. Viabilidad espermática de ratas tratadas con Tiametoxam (TMX).**

Tratamiento durante 6 semanas. Grupos: Control, TMX-25 y TMX-50 (Tiametoxam 25 y 50 mg/kg/día). No se observa diferencia significativa entre el grupo control y TMX-25. Hay diferencias significativas entre el grupo control y TMX-50,  $< 0.001^{***}$  y entre los grupos tratados TMX-25 y TMX-50  $p < 0.05^*$ . Media  $\pm$ . Error estándar de la media

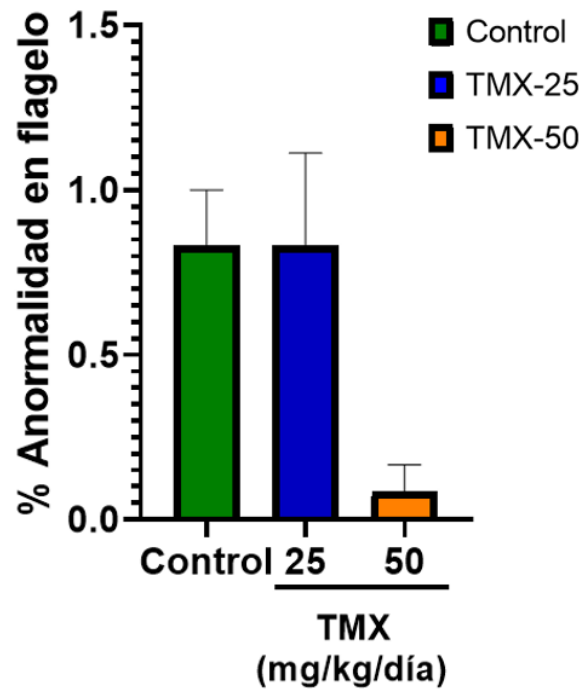
## 8.7 Anormalidades morfológicas

Las anormalidades morfológicas evaluadas en los espermatozoides fueron cabeza, flagelos anormales, gota citoplasmática y exceso de citoplasma residual. No se encontró diferencia significativa entre las medias de grupos control y los tratamientos de las anormalidades en cabeza y flagelo (Figuras 18 y 19). La presencia de gota citoplasmática incrementó de manera dependiente de la dosis, presentando 8% en el grupo Control, 23.58% en el grupo TMX-25, y 36.83% en el grupo TMX-50 (Figura 20). Para el exceso de citoplasma residual hubo una tendencia al aumento en TMX-50 con respecto a TMX-25, sin embargo, no hubo diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 21).



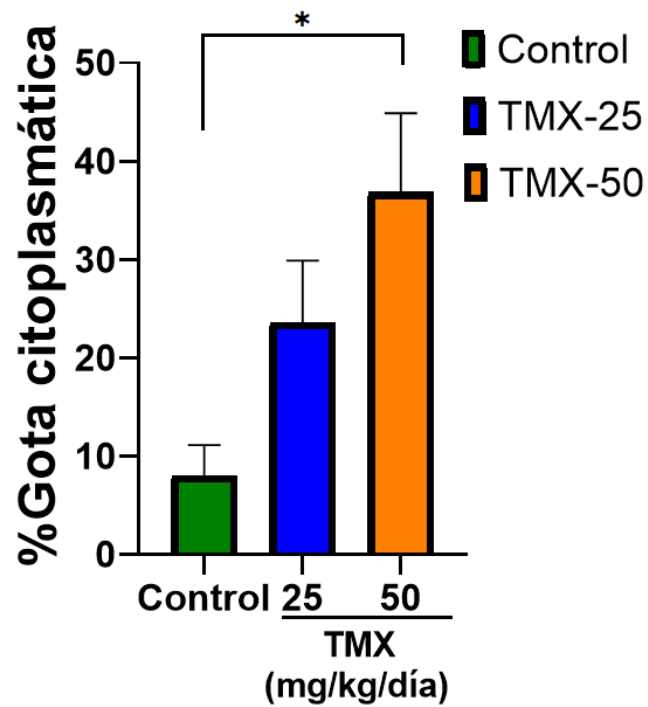
**Figura 18. Morfología de la cabeza de espermatozoides de ratas tratadas con Tiametoxam (TMX).**

Tratamiento durante 6 semanas. Grupos: Control, TMX-25 y TMX-50 (Tiametoxam 25 y 50 mg/kg/día).  $n=6$ . Prueba estadística Kruskal-Wallis  $p < 0.05$ . No se encontraron diferencias significativas en las anormalidades presentes en la cabeza de los espermatozoides. Media  $\pm$  Error estándar de la media.



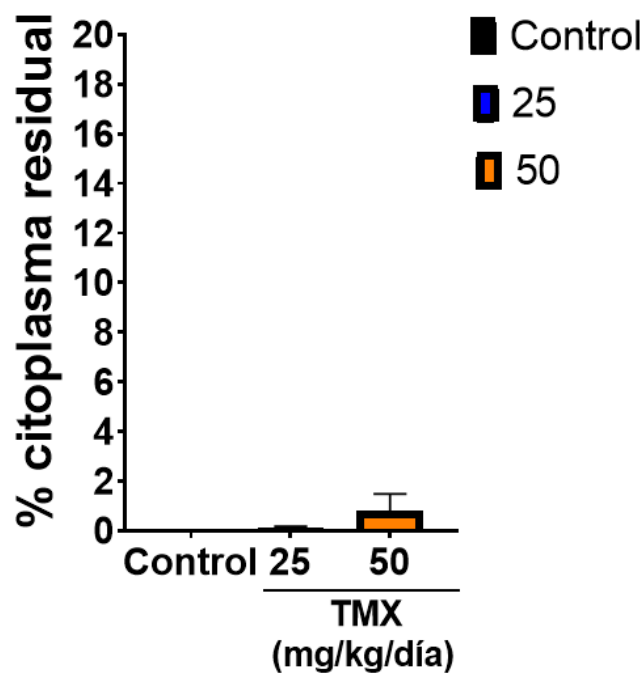
**Figura 19. Morfología del flagelo de espermatozoides de ratas tratadas con Tiametoxam (TMX).**

Tratamiento durante 6 semanas. Grupos: Control, TMX-25 y TMX-50 (Tiametoxam 25 y 50 mg/kg/día).  $n=6$ . Prueba estadística Kruskal-Wallis. Se encontraron menos anomalías en el flagelo de los espermatozoides tratados con TMX-50.  $p < 0.05$ . Media  $\pm$ . Error estándar de la media.



**Figura 20. Gota citoplasmática en espermatozoides de ratas tratadas con Tiametoxam (TMX).**

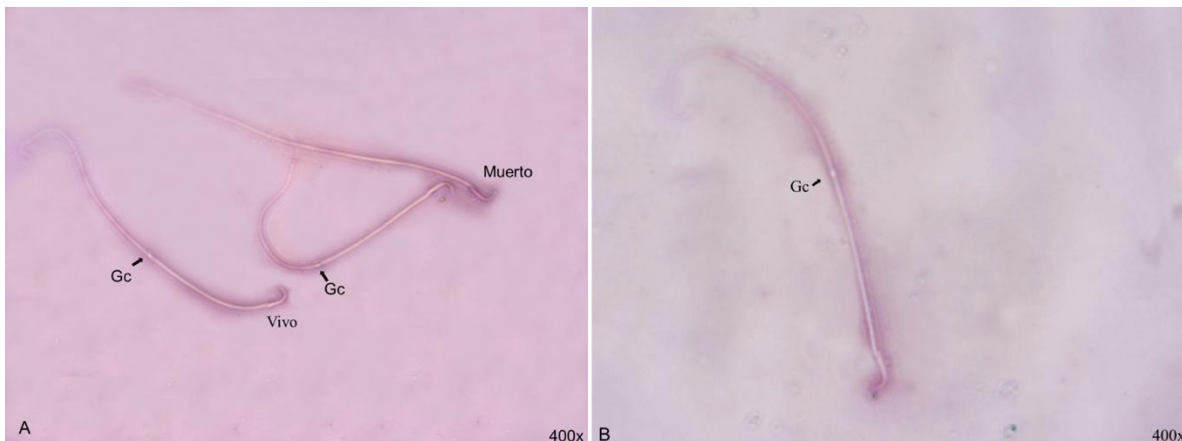
Tratamiento durante 6 semanas de tratamiento. Grupos: Control, TMX-25 y TMX-50 (Tiametoxam 25 y 50 mg/kg/día) n=6. Prueba estadística Kruskal-Wallis.  $p < 0.05$ . La presencia de gotas citoplasmáticas en los espermatozoides fue significativamente mayor en el grupo de mayor dosis de tóxico con respecto al control. Media  $\pm$ . Error estándar de la media.



**Figura 21. Exceso de citoplasma residual en espermatozoides de ratas tratadas con TMX.**

Tratamiento durante 6 semanas. Grupos: Control, TMX-25 y TMX-50 (Tiametoxam 25 y 50 mg/kg/día)  $n=6$ . Prueba estadística Kruskal-Wallis. Hubo una tendencia de exceso de citoplasma residual en los espermatozoides del grupo de mayor dosis de tóxico, sin embargo, no fue estadísticamente significativo  $p < 0.05$ . Media  $\pm$  Error estándar de la media.

En la figura 22 se muestra una imagen representativa del efecto de TMX sobre la viabilidad en los espermatozoides obtenidos de la cauda del epidídimo de rata Wistar después del tratamiento por 6 semanas, y también de gotas citoplasmáticas encontradas en los espermatozoides tratados con TMX-50.



**Figura 22. Fotomicrografía de viabilidad espermática de ratas tratadas con TMX.**

*A: Muestra espermática representativa de 6 semanas de tratamiento de Tiametoxam, con la dosis 25 mg/kg/día, se observó mayor proporción de espermatozoides muertos. B: Muestra representativa de la dosis 50 mg/kg/día, se observó mayor proporción de gota citoplasmática en la pieza principal del espermatozoide, 400x. Tinción con Eosina-Nigrosina*

## 8.8 Movilidad espermática epididimaria

Se presentaron cuatro categorías de movilidad espermática (A-D) de acuerdo con (WHO, 2021) que se clasificaron de la siguiente manera:

A) Progresiva rápida: los espermatozoides se mueven rápidamente en línea recta o en círculo grande cubriendo una distancia del punto de inicio al punto final a una velocidad  $\geq 25 \mu\text{m/s}$  o al menos  $\frac{1}{2}$  de la longitud del flagelo en un segundo.

B) Progresiva lenta. Los espermatozoides se mueven en línea recta o en círculo grande de forma lenta; a una velocidad de 5 a  $25 \mu\text{m/s}$  o menos de  $\frac{1}{2}$  de la longitud del flagelo en un segundo.

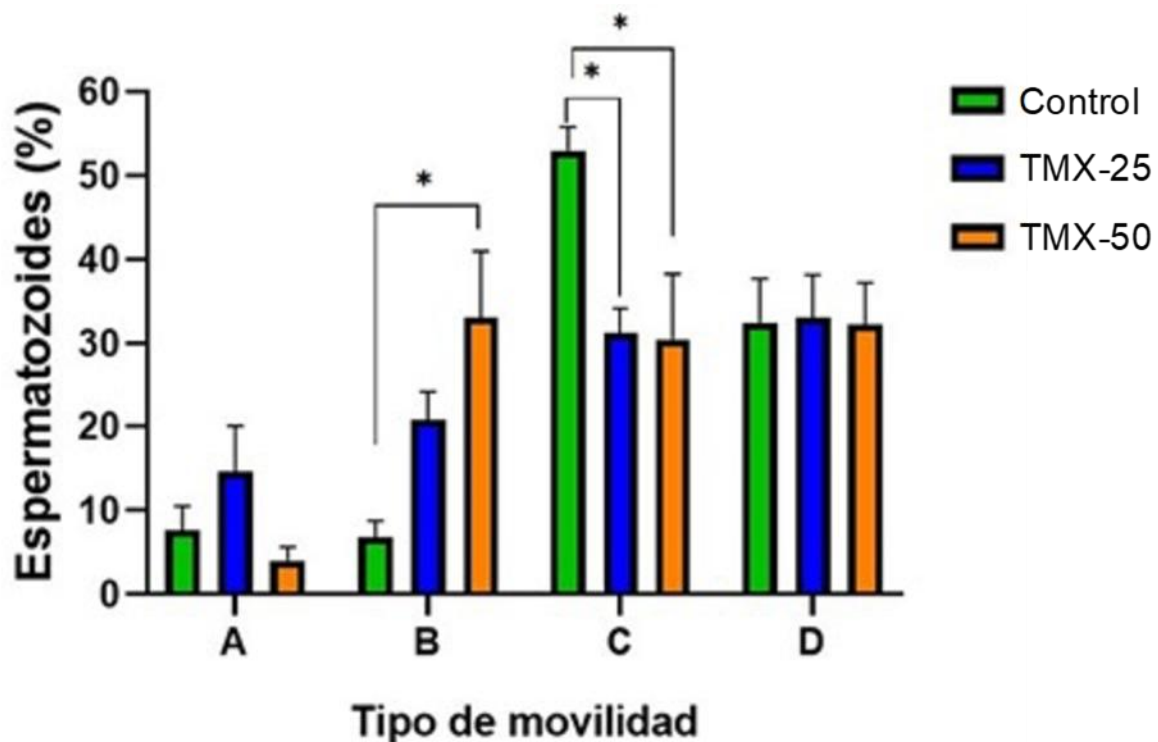
C) No progresiva. Los espermatozoides tienen movimiento activo del flagelo, pero sin avance, nadan en círculos pequeños, desplazan la cabeza  $< 5 \text{ m/s}$ .

D) Inmóviles: los espermatozoides no presentan ningún movimiento del flagelo.

En la figura 23 se muestra el efecto de TMX sobre el tipo de movilidad que presentaron los espermatozoides obtenidos de la cauda del epidídimo de rata Wistar después del tratamiento por 6 semanas. No se observaron diferencias significativas en el tipo de movilidad progresiva rápida: e inmóvil. entre el grupo control y los grupos tratados

Sin embargo, se registró un aumento significativo en la movilidad progresiva lenta (tipo B) en el grupo TMX-50, donde el 33.16 % de los espermatozoides presentaron este tipo de movilidad en comparación con el 6.83 % registrado en el grupo control ( $p < 0.05$ ), lo que sugiere que el tratamiento con TMX favoreció un incremento en esta categoría de movilidad espermática. Por el contrario, se observa una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en el tipo de movilidad no progresivo entre el grupo control donde se obtuvo un porcentaje de 53 % de espermatozoides con movilidad C y en el grupo TMX-50 donde se registró un 30.5 % de espermatozoides.

En general, el tratamiento con TMX parece reducir el movimiento no progresivo y favorecer el progresivo lento, especialmente con TMX-50.



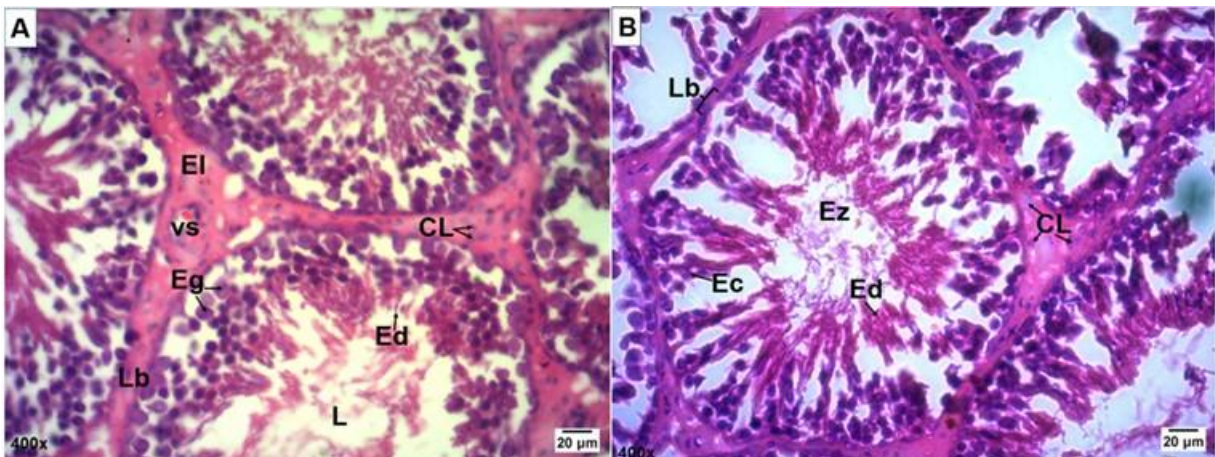
**Figura 23. Movilidad espermática de ratas tratadas con TMX.**

Tratamiento durante 6 semanas. Se presentaron espermatozoides con los tipos de movilidad: A) Progresiva rápida, B) Progresiva lenta, C) No progresiva, D) Inmóviles. Grupos: Control, TMX-25 y TMX-50 (Tiametoxam 25 y 50 mg/kg/día).  $n=6$ . Hubo diferencia significativa de movilidad progresiva lenta (B) entre el grupo control y TMX-50,  $p < 0.05^*$ . También hubo diferencia significativa de movilidad no progresiva (C) entre el grupo control y las dosis TMX-25 y TMX-50,  $p < 0.05^*$  Media  $\pm$  Error estándar de la media.

De acuerdo con los resultados anteriores, el tratamiento de TMX durante 6 semanas tuvo efecto significativo sobre la calidad espermática en todos los parámetros espermáticos; la morfología, la movilidad del espermatozoide, la viabilidad y la concentración.

## 8.9 Histología testicular

En los túbulos seminíferos de la dosis control (Figuras 24 y 27 A) se observó un número mayor de espermatogonias colocadas de manera adecuada adyacentes a la lámina basal y también con espermatozoides en el lumen de los túbulos seminíferos. La lámina basal y el espacio intersticial mantienen su estructura y contiene células de Leydig. Los túbulos seminíferos presentaron forma redonda e íntegra.

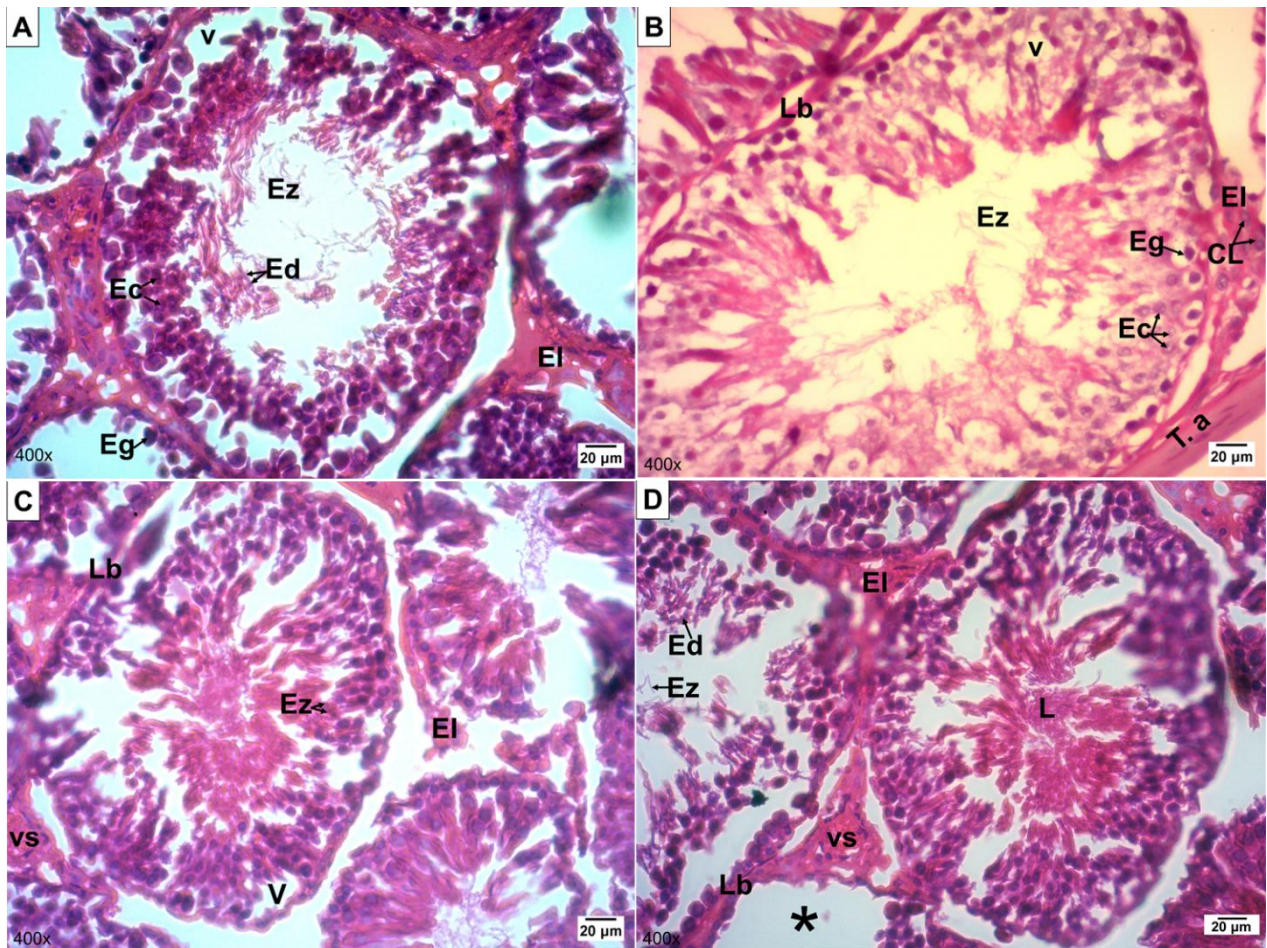


**Figura 24. Tejido testicular de ratas Wistar de grupo control.**

*A): Espacio intersticial (EI). Células de Leydig (CL). Lámina basal bien definida y el epitelio germinal organizado adecuadamente. B): Espermatocitos (Ec) íntegros con núcleos teñidos y bien definidos, algunas espermátidas (Ed) en proceso de diferenciación, el lumen con espermatozoides (Ez). El espacio intersticial (EI) con células de Leydig y la lámina basal (Lb) íntegra. Tinción: hematoxilina-eosina, escala de 20 µm a 400x.*

En los túbulos seminíferos de las ratas tratadas con TMX-25, la lámina basal está más delgada al compararse con el grupo control. Los túbulos pierden la forma redondeada, están alargados o sin forma. Hay vacuolización en el epitelio germinal también se encuentra desorganizado con espermatogonias desprendidas de la lámina basal Así

mismo, algunos túbulos contienen espermátidas sin diferenciar o en retención en el lumen (Figura 25 y 27-B).

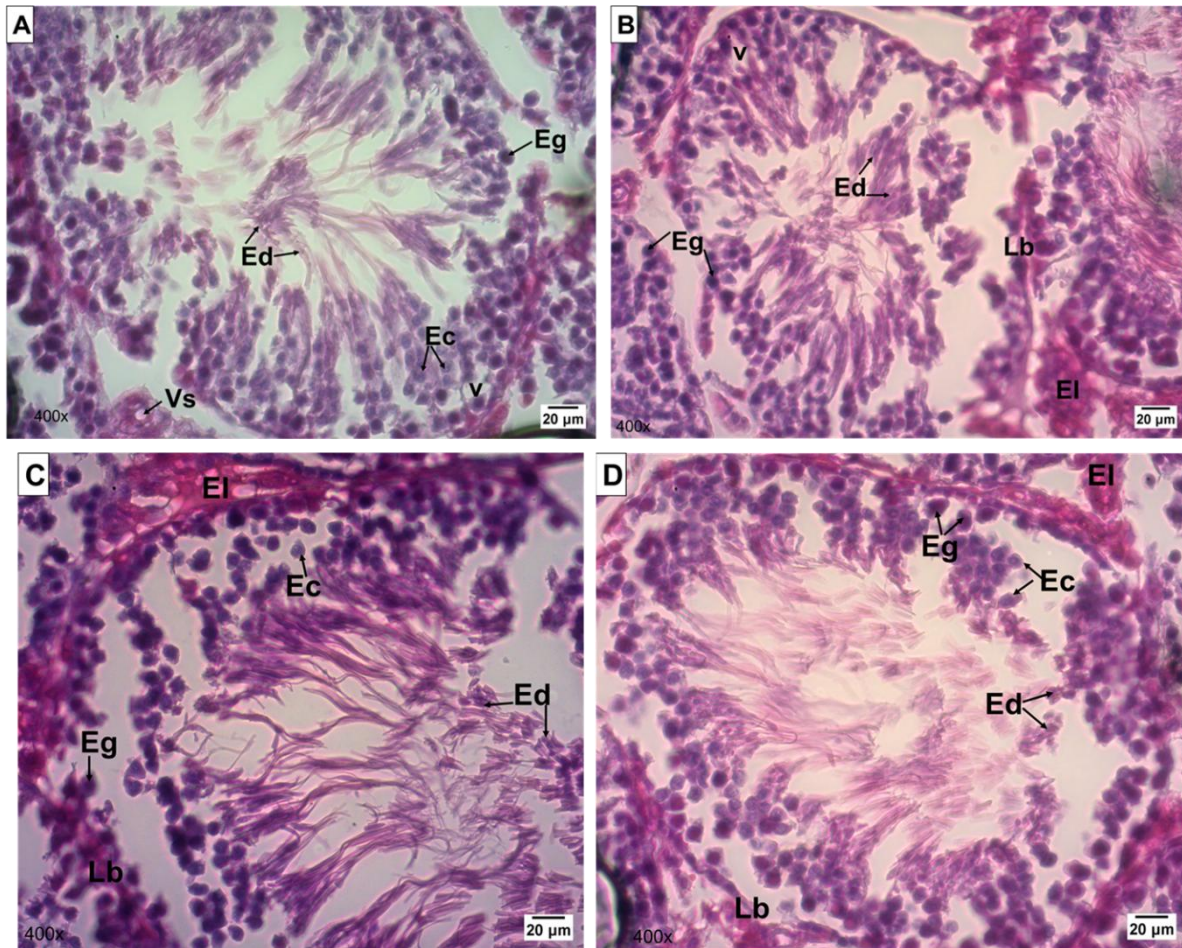


**Figura 25. Tejido testicular de ratas Wistar tratadas con TMX-25.**

*Tratamiento durante 6 semanas. A: Vacuolización del epitelio germinal (V) y lumen con pocos espermatozoides. B Lámina basal (Lb) adelgazada, C: Vacuolización (v) en el epitelio germinal y espacio intersticial desorganizado (EI). D: túbulo seminífero con epitelio germinal desorganizado, espermátidas (Ed) sin diferenciar \* Túbulo seminífero sin epitelio germinal. Tinción: hematoxilina-eosina, escala de 20 µm a 400x.*

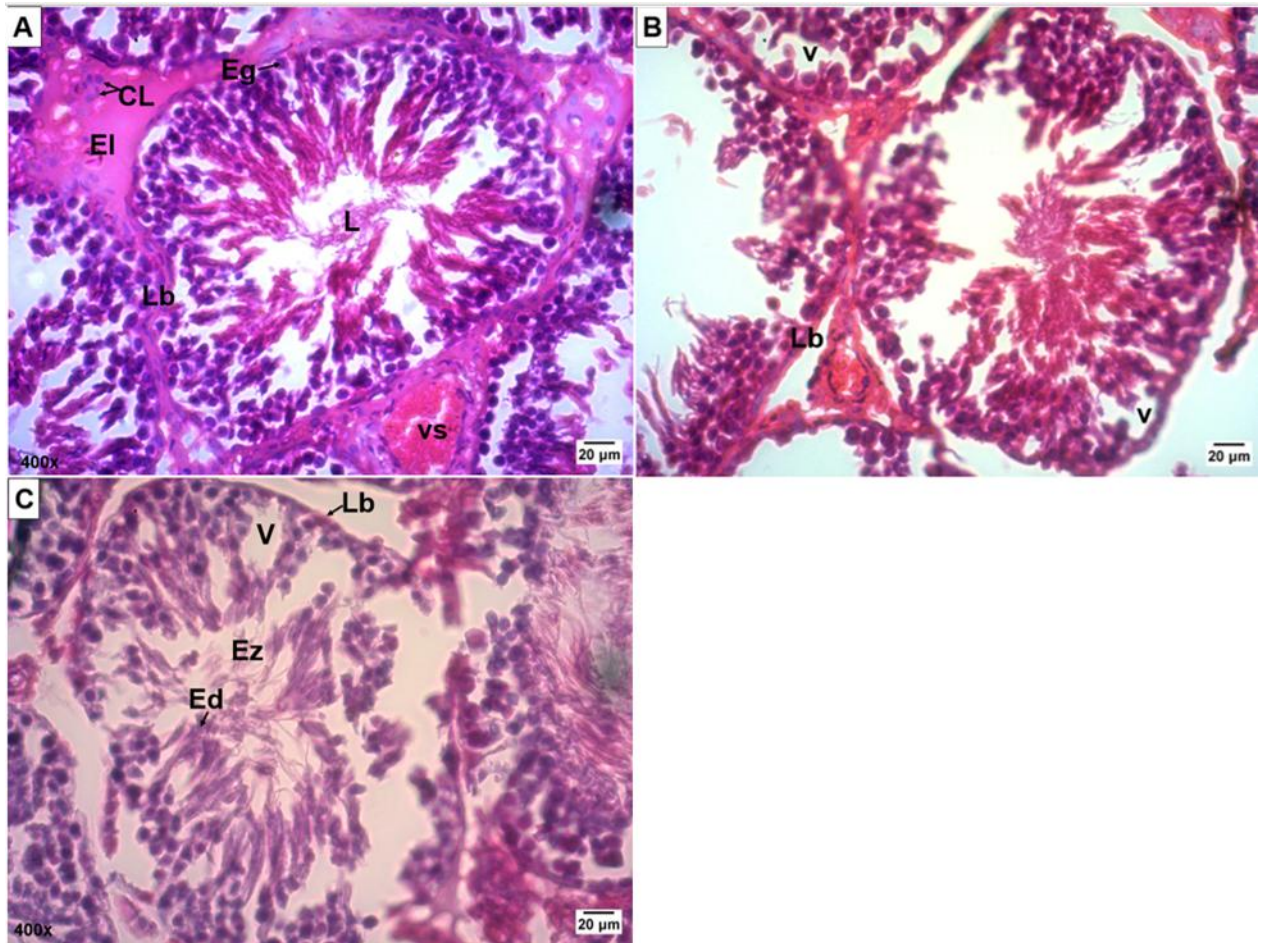
En contraste con el grupo control, los túbulos seminíferos de TMX-50 (Figura 26 y 27-C) están más grandes, alargados y el epitelio germinal está desorganizado Algunos

túbulos seminíferos no contienen células o están completamente cerrados, no se visualiza el lumen de manera correcta.



**Figura 26. Tejido testicular de ratas Wistar tratadas con TMX-50.**

*Tratamiento durante 6 semanas. A: La lámina basal (Lb) ha perdido su arquitectura. B: Las espermatogonias (Eg) están desprendidas de la lámina basal (Lb). Hay más espermatidas (Ed) en el lumen del túbulo seminífero y con mayor espacio entre los túbulos (tejido intersticial). C: Espermatogonias (Eg) desprendidas de la lámina basal D. Epitelio germinal desorganizado Tinción: hematoxilina-eosina, escala de 20 µm a 400x.*



**Figura 27. Tejido testicular de ratas Wistar de grupo control, TMX-25 y TMX-50.**

*Tratamiento durante 6 semana. A: Grupo control: Se observan espermatogonias (Eg) bien definidas en la periferia de los túbulos, con abundantes espermatozoides en el lumen (L) del túbulo; el espacio Intersticial (EI) con células de Leydig (CL) y vaso sanguíneo (vs) B: Grupo 25 mg/kg/día con TMX la lámina basal (Lb) comienza a adelgazarse y perder estructura, hay vacuolización (v) en el epitelio germinal y desprendimiento de células. C: Grupo TMX-50 células espermatogénicas desprendidas, desorganización y ruptura del túbulo. Tinción: hematoxilina-eosina, escala de 20  $\mu$ m a 400x.*

La tabla 5 muestra un resumen de los cambios histopatológicos observados en los túbulos seminíferos de las ratas tratadas con TMX-25 y TMX-50 durante 6 semanas.

**Tabla 5.** Cambios histológicos en testículo de ratas tratadas con Tiametoxam.

Órgano	Tratamiento		
	TMX (mg/kg/día)		
	Control	25	50
<b>Estructura espermática</b>	+++	++	+-
<b>Túbulos seminíferos</b>	Redondos, lumen con espermatozoides	Pierden forma redondeada, sin espermatozoides en lumen	Rotos, sin epitelio germinal, mayor espacio entre ellos. No se distingue el Lumen
<b>Espacio intersticial</b>	Contiene células de Leydig	Desestructurado	
<b>Epitelio germinal</b>	Espermatocitos íntegros, espermátidas en diferenciación	Células desprendidas y vacuoladas	Espermátidas en el lumen, sin diferenciar
<b>Lámina basal</b>	Espermatogonias adheridas	Comienza a adelgazarse, espermatogonias desprendidas	
+++, <i>morfología normal</i> ; ++, <i>algunas anormalidades</i> ; +-, <i>muchas anormalidades morfológicas</i> .			

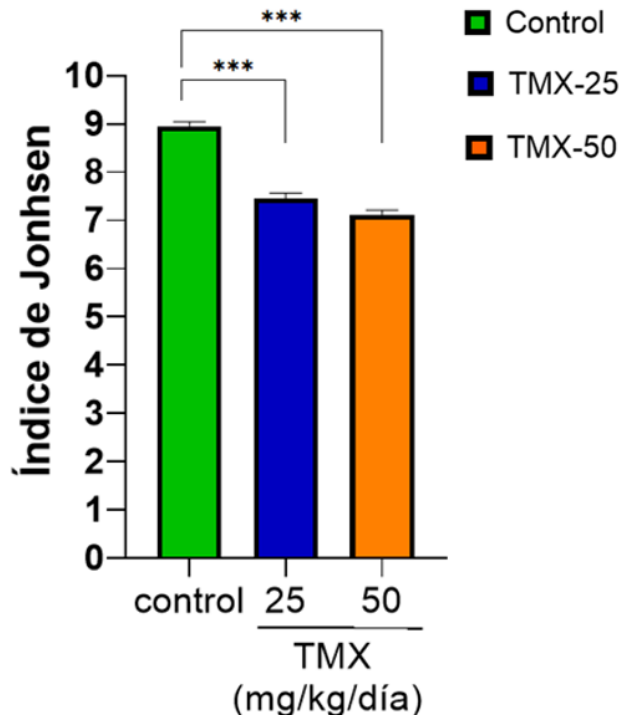
### **8.10 Índice de maduración del epitelio seminífero**

La tabla 6 muestra la frecuencia de pertenencia a las clases del índice de Johnsen de los túbulos seminíferos de las ratas Wistar del grupo control y los grupos tratados con TMX-25 y TMX-50 de acuerdo con los criterios del índice de madurez del epitelio seminífero descrito por Johnsen, 1970 (anexo 2). Se observa una disminución progresiva en los criterios conforme aumenta la dosis del insecticida, lo cual sugiere una alteración en la maduración espermatogénica inducida por el tratamiento. En el grupo control, los valores más frecuentes corresponden al criterio 10 y 9 con 34 y 35 túbulos respectivamente, indicando para el valor 10 una espermatogénesis completa con gran cantidad de espermatozoides (más de 6), el epitelio germinal organizado y con espesor regular dejando una luz abierta, mientras que el criterio 9 indica una espermatogénesis completa con poca cantidad de espermatozoides (5 o menos), el epitelio germinal desorganizado, con marcado desprendimiento o cierre del lumen. En contraste, el grupo tratado con TMX-25 mostró un índice disminuido de 8 con 45 túbulos con presencia de espermátidas maduras en diferenciación, sin espermatozoides maduros (5-10 espermatozoides). Finalmente, en el grupo tratado con TMX-50 predominó el valor 7 con 49 túbulos, sin espermatozoides y con gran cantidad de espermátidas sin signos de diferenciación (más de 6). Estos resultados revelan un efecto dosis-dependiente del TMX sobre la maduración del epitelio seminífero, con una reducción estadísticamente significativa (Figura 28) de los túbulos que completan la madurez en la espermatogénesis, en los grupos tratados en comparación con el control.

**Tabla 6.** Clasificación de los túbulos seminíferos del grupo control y grupos tratados de acuerdo con los criterios de Johnsen (1970).

Índice de Johnsen	Dosis		
	Tiametoxam (mg/kg/día)		
	Control	25	50
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	3	0
5	0	0	6
6	0	11	13
7	8	31	<b>49*</b>
8	23	<b>45*</b>	27
9	<b>35*</b>	9	5
10	34	1	0

\* frecuencia mayor de muestras con el índice de Johnsen.



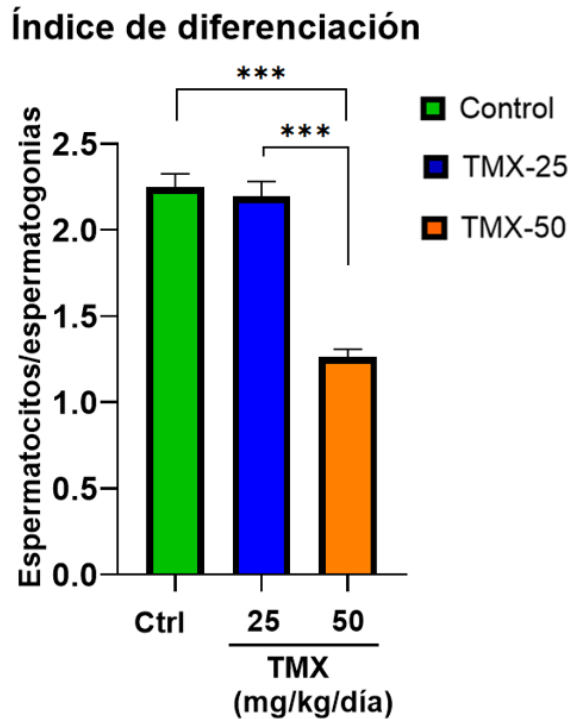
**Figura 28. Índice de Jonhsen en los túbulos seminíferos de las ratas Wistar tratadas con TMX.**

Tratamiento durante 6 semanas. De acuerdo con los criterios de Johnsen, 1970, se muestra el índice de maduración (índice de Jonhsen) en los túbulos seminíferos de las ratas tratadas. Grupos: Control, TMX-25 y TMX-50 (Tiametoxam 25 y 50 mg/kg/día). Disminución estadísticamente significativa entre el grupo Control y los grupos tratados  $p < 0.0001^{***}$ .  $p < 0.05$ . Media  $\pm$ . Error estándar de la media.

### 8.11 Índice de diferenciación

La figura 29 presenta el índice de diferenciación, expresado como la relación entre espermatoцитos diferenciados y espermatoгонias observadas, etapa que ocurre durante la fase proliferativa o espermatoгонica de la espermatoгонesis. El grupo control presenta un índice promedio cercano a 2.2, mientras que el grupo TMX-25 muestra una ligera disminucion a 2.0. En contraste, el grupo TMX-50 muestra una reduccion significativa con un valor cercano a 1.2. Entre el grupo control y el TMX-25 no se observan diferencias significativas; mientras que, comparando ambos con el grupo TMX-50 las diferencias sí son considerablemente significativas ( $^{***}$ ,  $p < 0.001$ ),

lo que indica un efecto dosis-dependiente del TMX sobre la diferenciación celular durante la espermatogénesis.



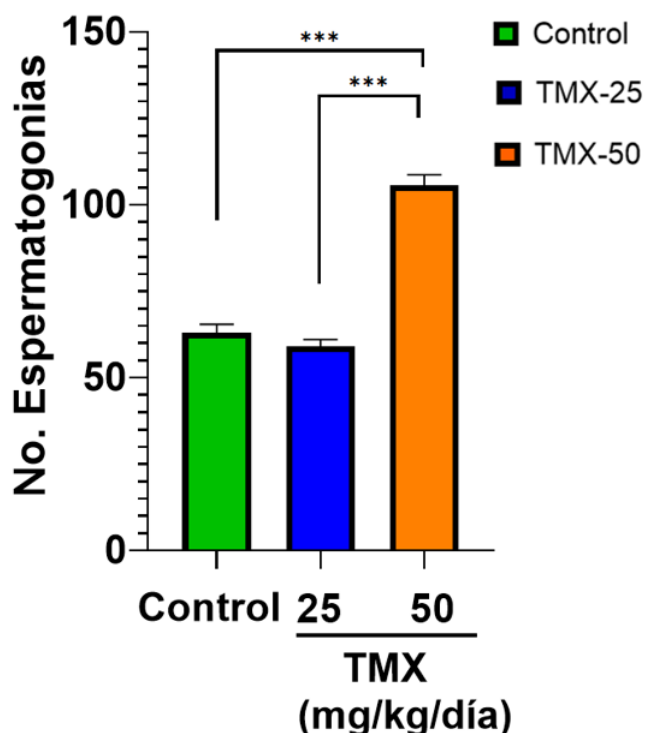
**Figura 29. Índice de diferenciación en los túbulos seminíferos de las ratas Wistar tratadas con TMX.**

Tratamiento durante 6 semanas. Grupos: Control, TMX-25 y TMX-50 (Tiametoxam 25 y 50 mg/kg/día). Disminución significativa entre el grupo Control y grupo 50 mg/kg/día y entre grupos tratados.  $p < 0.0001^{***}$ . Media  $\pm$  Error estándar de la media.

### 8.12 Número de espermatogonias

La figura 30 muestra el número de espermatogonias contadas en los túbulos seminíferos de los testículos del grupo control y los tratados con TMX. Entre el grupo control y el TMX-25 no se observaron diferencias significativas; mientras que, comparando ambos con el grupo TMX-50 las diferencias sí son considerablemente significativas. De acuerdo con lo anterior podemos inferir que en el grupo de mayor dosis no se diferenciaron a espermatocitos pues se encontró un promedio de 105

espermatogonias en comparación con las 63 encontradas en el grupo control y 59 en la TMX-25. A dosis altas el TMX probablemente esté interfiriendo el proceso de mitosis. Las espermatogonias no se diferenciaron, lo que causó una acumulación de las espermatogonias en la dosis mayor, similar a lo reportado (Zuscikova et al., 2023).



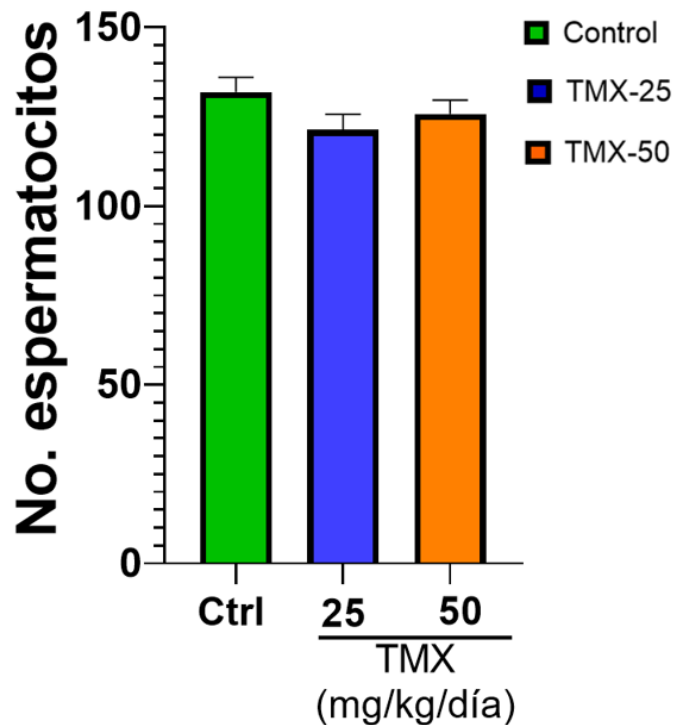
**Figura 30. Número de espermatogonias en los túbulos seminíferos de ratas Wistar tratadas con TMX.**

Tratamiento durante 6 semanas. Grupos: Control, TMX-25 y TMX-50 (Tiametoxam 25 y 50 mg/kg/día). Hubo diferencias significativas entre el grupo control y la dosis TMX-50, y entre ambos tratamientos.  $p < 0.05$ . Media Error estándar de la Media.

### 8.13 Número de espermatoцитos

El número de espermatoцитos contados en los túbulos seminíferos de los testículos del grupo control y grupos tratados con TMX no mostró cambios significativos con ninguna

dosis, pese a que la maduración se pueda ver bloqueada o retardada en etapas tempranas (espermatogonia), algún grupo de células lograron madurar compensando el número de espermatoцитos en todas las dosis (Figura 31).



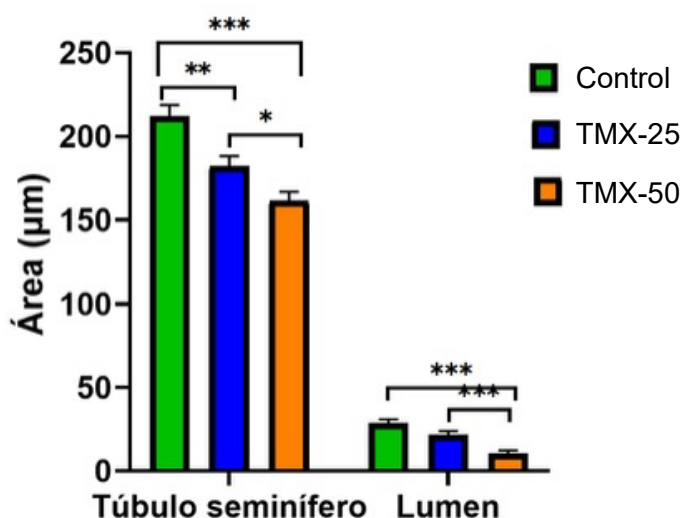
**Figura 31. Número de espermatoцитos en los túbulos seminíferos de ratas Wistar tratadas con TMX.**

Tratamiento durante 6 semanas. Grupos: Control, TMX-25 y TMX-50 (Tiametoxam 25 y 50 mg/kg/día). No hubo diferencias significativas entre los grupos.  $p < 0.05$ . Media Error estándar de la Media.

#### 8.14 Área de túbulos seminíferos y lumen

De acuerdo con la figura 32 y la tabla 7, se observó una disminución progresiva estadísticamente significativa del área de los túbulos seminíferos en los grupos tratados en comparación con el control. El grupo TMX-25 mostró una reducción en el área con un promedio de  $182.98 \mu\text{m}^2$  ( $p < 0.05$  \*), mientras que el grupo TMX-50 mostró una reducción significativa mayor a  $161.39 \mu\text{m}^2$  ( $p < 0.0001$  \*\*\*) comparado con

el control, donde se obtuvo un área promedio de 211.14  $\mu\text{m}^2$ . De igual manera, el análisis del lumen mostró una ligera disminución de 28.54  $\mu\text{m}^2$  en el grupo control, a 27.79  $\mu\text{m}^2$  en el grupo TMX-25, con un efecto estadístico y evidente en el grupo TMX-50 con un área promedio de lumen de 10.78  $\mu\text{m}^2$  ( $p < 0.001$  \*).



**Figura 32.** Área y lumen de los túbulos seminíferos de ratas Wistar tratadas con TMX.

Tratamiento durante 6 semanas. Grupos: Control, TMX-25 y TMX-50 (Tiametoxam 25 y 50 mg/kg/día). Hubo diferencias significativas entre los grupos.  $n=6$ .  $p < 0.05$ . Prueba estadística Kruskal-Wallis. Post-Hoc: Dunn. \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.005$  \*\*\* =  $p < 0.0001$ . Media  $\pm$  Error estándar de la Media

**Tabla 7.** Área y lumen de los túbulos seminíferos en ratas Wistar tratadas con Tiametoxam (TMX) durante 6 semanas.

Sitió anatómico	Promedio del área de los túbulos seminíferos y lumen ( $\mu\text{m}^2$ )		
	TMX (mg/kg/día)		
	Control	25	50
Túbulo seminífero	211.98 $\pm$ 6.70	182.14 $\pm$ 6.10 <sup>ac</sup>	161.39 $\pm$ 5.8 <sup>bc</sup>
Lumen	28.54 $\pm$ 2.54	27.79 $\pm$ 2.26 <sup>b</sup>	10.68 $\pm$ 1.73 <sup>b</sup>

Los datos representan las medias  $\pm$  EEM  $n=6$ . Prueba estadística Kruskal-Wallis. Post-Hoc: Dunn. Área ( $\mu\text{m}^2$ ) de los túbulos seminíferos: <sup>a</sup> $p < 0.005$  Control vs TMX-25 mg/kg/día; <sup>b</sup> $p < 0.0001$  Control vs TMX-50 mg/kg/día; <sup>c</sup> $p < 0.05$  Dosis TMX-25 vs TMX-50. Área ( $\mu\text{m}^2$ ) del lumen: <sup>b</sup> $p < 0.0001$  Control vs TMX-50 y TMX-25 vs TMX-50.

## 9 Discusión

### 9.1 Efectos generales del TMX sobre el peso corporal y los órganos reproductivos

En nuestro estudio, el TMX-25 y TMX-50 durante seis semanas en ratas macho Wistar no redujo significativamente el peso corporal ni el de los órganos reproductores (testículo y epidídimo) ni tampoco el índice órgano-somático. Estos resultados contrastan con los de Li et al. (2022), quienes reportaron que ratones expuestos a una dosis mucho menor (0.5 mg/kg/día) de TMX, aumentaron su peso corporal, aunque disminuyó el peso de sus riñones significativamente. En otro estudio, (Khaldoun-Oularbi et al., 2017) demostraron que el tratamiento con TMX a dosis 26, 39 y 78 mg/kg/día provocó una disminución significativa en una relación dosis-dependiente tras seis semanas de exposición. En particular, con la dosis más alta (78 mg/kg/día), el peso relativo del hígado y los testículos se redujo significativamente. Asimismo, Hamed et al. (2023) reportaron reducciones marcadas tanto en el peso corporal como en el de los órganos reproductores (testículos, epidídimo y vesículas seminales) en ratas tratadas por vía oral con TMX durante 58 días con dosis de 78.15 y 156.3 mg/kg/día.

Esta variación en los resultados podría deberse a diferencias en la respuesta entre ratas y ratones, ya que los ratones pueden ser más sensibles a TMX, que las ratas (Green et al., 2005), Además, en los estudios se utilizaron diferentes dosis y tiempos

de exposición. En nuestro estudio, las dosis fueron considerablemente más bajas, con la intención de establecer un umbral de **NOAEL** (dosis máxima sin efecto adverso observado, por sus siglas en inglés). Aunque no se encontraron efectos significativos en el peso corporal o de los órganos reproductivos, sí se observaron alteraciones importantes en la morfología del testículo, se observó hemorragia, resultados similares a los de Gerunov et al. (2020) quienes reportaron que el corazón e hígado de ratas tratadas con tiacloprid y clotianidina mostraron color marrón, hemorragia, sangran fácilmente y consistencia flácida debido a procesos inflamatorios y activación de mecanismos de defensa.

De igual manera se tuvieron resultados significativos en la calidad espermática y el tejido testicular, como se discute más adelante.

La toxicidad aguda (DL50 oral) de TMX y de su metabolito Clotianidina (CTD) permiten contextualizar estos resultados. Según la FAO y la EPA, la toxicidad aguda de TMX en ratas es de 1563 mg/kg/día mientras que la de CTD supera los 5000 mg/kg/día. Sin embargo, en ratones, la CTD tiene una toxicidad mucho mayor (DL50 oral para ratas: 1,000 mg/kg/día) (EPA, 2003; Syngenta, 2019). Por otro lado, se ha reportado que CTD tiene un efecto más enérgico sobre su metabolismo (Li et al., 2022), a pesar de su menor toxicidad aguda. Sin embargo, dado que el TMX se metaboliza a CTD y ambas sustancias se bioacumulan, el conjunto de ambas sustancias incrementa su toxicidad y los hace más dañinos para los organismos (Li et al., 2022).

## **9.2 Efectos del TMX sobre la espermatogénesis y calidad espermática**

Nuestros resultados muestran que la administración crónica de TMX afectó de manera significativa algunos parámetros relacionados con la espermatogénesis y la

maduración espermática, sin alterar el peso de los órganos reproductivos. Aunque el peso del testículo es un indicador conspicuo de la salud reproductiva, ya que refleja cambios en la masa celular y en la producción de líquido del túbulo seminífero o la pérdida de células germinales (Creasy, 2002), en este estudio no se observaron cambios significativos en el peso testicular. No obstante, sí disminuyó significativamente el área de los túbulos seminíferos del lumen, lo que sugiere una alteración estructural en epitelio seminífero y posible pérdida de células germinales.

En cuanto a la movilidad espermática, observamos que más del 30% de los espermatozoides en el grupo TMX-50 presentaron un patrón de movilidad progresiva lenta, comparado con solo 6.83% en el grupo control. Este cambio en la movilidad fue también evidente, aunque en menor grado, en el grupo TMX-25, lo que indica un efecto dosis-dependiente. Es bien sabido que en el epidídimo los espermatozoides adquieren su capacidad de movimiento flagelar progresivo, proceso que inicia principalmente después de la eyaculación mediante la activación espermática y (Olivera et al., 2016). El patrón observado sugiere que el TMX podría estar interfiriendo en este proceso, posiblemente a través de su interacción con receptores nicotínicos, pero también mediante la regulación de transportadores de serotonina y dopamina (Cartereau et al., 2018; Hirai et al., 2024).

El TMX-50 tuvo un efecto más pronunciado de la movilidad progresiva lenta. Resultados similares fueron reportados por (Bray, Son, & Meizel, 2005) quienes observaron que la acetilcolina provoca un aumento del calcio intracelular en los espermatozoides humanos. Mientras que ratones knock out de la Subunidad  $\alpha 7$  del

receptor nicotínico de acetilcolina, producen espermatozoides con motilidad deteriorada (Bray, Son, Kumar, et al., 2005).

Por otro lado, la viabilidad espermática se afectó. En el grupo control, el 95% de los espermatozoides eran viables, mientras que en los grupos TMX-25 y TMX-50, la viabilidad se redujo a 90 y 80%, respectivamente. Esta reducción, aunque leve, es claramente dosis-dependiente. Nuestros hallazgos coinciden con los de Hamed et al. (2023), quienes también observaron una disminución significativa de la viabilidad espermática en ratas de 10 a 11 semanas de edad tratadas por vía oral con 156.3 y 78.15 mg/kg/día de TMX.

Respecto a la concentración espermática, se detectó una disminución marcada: el grupo control presentó una concentración de  $20 \times 10^6$  espermatozoides/mL, mientras que el grupo TMX-25 bajó a  $5 \times 10^6$ /mL. De manera paradójica, en el grupo TMX-50 la disminución en la concentración espermática fue menos pronunciada, registrando  $11 \times 10^6$ /mL. Este patrón paradójico también ha sido observado en otros estudios, como el de Hamed et al. (2023), donde las dosis más altas no necesariamente provocaron la menor producción espermática. Este fenómeno podría explicarse por una mortalidad testicular selectiva, donde solo los espermatozoides más resistentes o de mejor calidad sobreviven a dosis más altas, generando un sesgo en el recuento final.

### **9.3 El TMX aumentó las anomalías morfológicas espermáticas**

Los análisis morfológicos revelaron que los espermatozoides de las ratas tratadas con TMX presentaron anomalías estructurales, especialmente en el flagelo y la presencia de gotas citoplasmáticas. En el grupo TMX-25 se observó una tendencia al aumento de anomalías en la cabeza del espermatozoide, aunque sin diferencias significativas.

En cambio, en el grupo TMX-50 se observaron menos anomalías flagelares que en el grupo control, un hallazgo inesperado, también reportado por Hamed (2023), quienes encontraron aumento en las anomalías de los espermatozoides en los grupos tratados con TMX. Esta reducción podría deberse a una eliminación mayor de espermatozoides defectuosos en el testículo o el epidídimo, causada por los efectos tóxicos del TMX, como ya se ha descrito para otras sustancias citotóxicas (Akbarsha et al., 2000)

Según Cevallos (2012), las malformaciones espermáticas primarias se generan durante la espermatogénesis testicular, incluyen alteraciones en la cabeza, pieza media y cola. El mal manejo de las muestras también puede generar daños mecánicos, pero este no fue el caso en nuestro estudio. Así, estos datos sugieren que la exposición a TMX pudo haber provocado muerte celular temprana, dejando una menor proporción de espermatozoides anormales en las muestras, especialmente a dosis altas.

La presencia significativa de gotas citoplasmáticas en el grupo TMX-50 fue uno de los hallazgos más relevantes. Estas gotas representan residuos del citoplasma no eliminados durante la espermiogénesis. En condiciones normales, las células de Sertoli fagocitan este exceso de citoplasma, y el remanente se desplaza a lo largo del espermatozoide durante su maduración en el epidídimo, donde suele eliminarse durante la eyaculación (Cooper, 2011). En especies como el humano, la gota puede retenerse y cumplir funciones fisiológicas, pero en roedores, su retención indica maduración incompleta (Rengan et al., 2012).

Una muestra espermática de buena calidad debe presentar menos del 20% de anomalías secundarias (malformaciones por maduración incompleta) (Stornelli et al.,

1999); Cevallos (2012). La cantidad significativa de gotas citoplasmáticas en el grupo TMX-50 indica afectación epididimaria y se asocia con exposición a sustancias citotóxicas, como ya fue reportado en ratas tratadas con vincristina (Averal et al., 1996).

#### **9.4 Daño tisular y alteraciones histológicas en túbulos seminíferos**

Nuestros resultados evidencian que la exposición crónica al TMX causó daño estructural notable en los túbulos seminíferos. En las ratas tratadas con 25 mg/kg/día de TMX, se observaron vacuolizaciones del epitelio seminífero, relacionadas con la pérdida de células germinales, mientras que en el grupo de 50 mg/kg/día se presentó desprendimiento de células espermatogénicas hacia el lumen, lo que sugiere una alteración en la adhesión celular mediada por las células de Sertoli (Vidal & Whitney, 2014).

Este hallazgo coincide con lo reportado por Nakai et al. (2002), quienes observaron un efecto similar al administrar carbendazim, un fungicida que desorganiza el citoesqueleto de las células de Sertoli, causando la pérdida de contacto con las células germinales. También se ha reportado que el insecticida neonicotinoide Acetamiprid (ACE) genera desprendimiento del epitelio germinal y formación de vacuolas, efectos comparables a los observados con TMX en nuestro estudio (El-Hak et al., 2022).

Una observación interesante fue la presencia de gran cantidad de espermatozoides en el lumen de los túbulos en el grupo TMX-50. A pesar del daño en algunas zonas de la membrana basal y la desorganización epitelial, se conservaron regiones con organización celular intacta, lo cual sugiere que ciertos sectores del epitelio pudieron

mantener la espermatogénesis activa, explicando la presencia de espermatozoides incluso en condiciones de daño estructural.

El epitelio seminífero está compuesto por varios tipos celulares, incluyendo las espermatogonias, las cuales pueden dividirse en células mitóticas (proliferativas) y tipo B (que inician la meiosis). Las células mitóticas no están protegidas por la barrera hematotesticular (BTB), lo que las hace especialmente vulnerables a agentes tóxicos (Meistrich, 1986). En cambio, las espermatogonias tipo B son más resistentes y pueden contribuir a la regeneración del epitelio.

### **9.5 Índices de diferenciación y maduración: espermatogénesis alterada**

Los resultados de este estudio muestran que el TMX afecta la espermatogénesis desde las etapas iniciales. La disminución del índice de diferenciación fue evidente en el grupo TMX-50, lo que indica un bloqueo o retraso en la maduración de espermatogonias hacia espermatoцитos. Esta alteración refleja un impacto temprano del TMX sobre las células germinales más inmaduras.

El análisis histológico reveló una disminución significativa en el índice de maduración (Índice de Johnsen). En el grupo TMX-50, los túbulos presentaron predominantemente un score de 7, lo que corresponde a ausencia de espermatozoides y presencia de más de seis espermátidas sin signos de diferenciación (Johnsen, 1970). Esto sugiere toxicidad directa sobre las células de Sertoli, las cuales son fundamentales en la elongación de espermátidas (espermiogénesis) y su liberación al lumen (espermiación) (Cheng & Sun, 2008).

También se observó una reducción del área total del túbulo y del lumen, lo cual indica degeneración del tejido testicular. Estos cambios reflejan una pérdida progresiva de

células germinales y desorganización del epitelio seminífero, especialmente en las etapas postespermatogoniales. El hallazgo se refuerza con el aumento de espermatogonias en el grupo TMX-50, junto con un número mayor de espermátidas no diferenciadas, lo que sugiere una detención en el proceso meiótico, tal como fue reportado por Zuscikova et al. (2023).

### **9.6 Efectos del TMX en la espermiogénesis y espermiación**

El TMX también afectó las fases finales de la espermatogénesis. El desprendimiento de células germinales hacia el lumen fue evidente en ambos grupos tratados. Este fenómeno ha sido asociado con la exposición prolongada a compuestos tóxicos, los cuales desorganizan el epitelio seminífero y provocan degeneración de espermatogonias, eliminando la capa basal del epitelio y afectando principalmente a los espermátocitos adyacentes a la membrana basal (Moffit et al., 2007).

Además, se observó una disminución del número de células postmeióticas, es decir, espermátidas redondas y elongadas, fenómeno conocido como agotamiento de la maduración. Este proceso indica que la exposición al TMX compromete la meiosis y puede afectar la espermiogénesis en su totalidad. De acuerdo con Moffit et al. (2007), la pérdida de función testicular se caracteriza por alteraciones en el diámetro tubular, vacuolización, desorganización del epitelio, retención de espermátidas, y apoptosis de células germinales, todos efectos que fueron confirmados en nuestros hallazgos.

La disminución del área del túbulo y del lumen indican daño estructural en el epitelio seminífero, probablemente por la pérdida de células germinales y la degeneración del tejido testicular como se aprecia en la histología y en el índice de Johnsen. Esto porque el proceso de maduración celular durante la espermatogénesis está incompleto o

detenido desde las primeras etapas de la maduración. Esto coincide con un mayor conteo de espermatogonias en el grupo tratado con TMX-50 comparado con el control y el grupo tratado con TMX-25 y también con la presencia de mayor número de espermátidas sin diferenciar ya que el proceso meiótico parece estar retenido y que coincide además con nuestro resultado del índice de diferenciación, el cual fue menor para la dosis más alta de 50 mg/kg/día. La disrupción de la espermatogénesis observada en este estudio es consistente con lo reportado por Zuscikova et al. (2023). Por último, la disminución de la concentración espermática observada en este estudio refuerza la conclusión de que el TMX afecta negativamente la fisiología del tejido testicular, al reducir la producción y liberación de espermatozoides funcionales.

## **10 Conclusiones**

La administración crónica de TMX en ratas adultas tuvo un impacto significativo en la calidad espermática, afectando principalmente la morfología, movilidad y la concentración de los espermatozoides. Además, se observó un efecto importante en la viabilidad y en la maduración de espermatozoides de epidídimo. También se encontraron daños a nivel tisular pues se presentan alteraciones en la arquitectura del epitelio seminífero, el área de los túbulos seminíferos y del lumen.

## **11 Perspectivas**

1. Evaluar el daño tisular en el epidídimo, dado que este órgano es esencial para la maduración de los espermatozoides y podría ser uno de los órganos reproductores afectados por el TMX.
2. Analizar la concentración de hormonas del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, como la hormona luteinizante.
3. Estudiar los niveles de estradiol, ya que se ha reportado que esta hormona juega un papel relevante en la eliminación de la gota citoplasmática de los espermatozoides.

## 12 Bibliografía

- Akbarsha, M. A., Latha, P. N., & Murugaian, P. (2000). Retention of cytoplasmic droplet by rat cauda epididymal spermatozoa after treatment with cytotoxic and xenobiotic agents. *J Reprod Fertil*, 120(2), 385-390. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1200385>
- Albuquerque, E., Pereira, E., Alkondon, M., & Rogers, S. (2009). Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function. 89, 73-120.
- Anai, A., Hisada, A., Yunohara, T., Iwasaki, M., Arizono, K., & Katoh, T. (2021). Urinary neonicotinoids level among pregnant women in Japan. *Int J Hyg Environ Health*, 236, 113797. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2021.113797>
- Averal, H. I., Stanley, A., Murugaian, P., Palanisamy, M., & Akbarsha, M. A. (1996). Specific effect of vincristine on epididymis. *Indian J Exp Biol*, 34(1), 53-56. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8698408>
- Bal, R., Türk, G., Yılmaz, Ö., Etem, E., Kuloğlu, T., Baydaş, G., & Naziroğlu, M. (2012). Effects of clothianidin exposure on sperm quality, testicular apoptosis and fatty acid composition in developing male rats. *Cell Biol Toxicol*, 28(3), 187-200. <https://doi.org/10.1007/s10565-012-9215-0>
- Barrett, K., & Ganong, W. (2010). *Ganong Fisiología médica* (23 ed.). Mc Graw Hill Interamericana
- Bass, C., Denholm, I., Williamson, M. S., & Nauen, R. (2015). The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pestic Biochem Physiol*, 121, 78-87. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.04.004>

- Bednarska, A. J., Edwards, P., Sibly, R., & Thorbek, P. (2013). A toxicokinetic model for thiamethoxam in rats: implications for higher-tier risk assessment. *Ecotoxicology*, 22(3), 548-557. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1047-z>
- Bonmatin, J. M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreuzweiser, D. P., Krupke, C., Liess, M., Long, E., Marzaro, M., Mitchell, E. A., Noome, D. A., Simon-Delso, N., & Tapparo, A. (2015). Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ Sci Pollut Res Int*, 22(1), 35-67. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3332-7>
- Bray, C., Son, J. H., Kumar, P., & Meizel, S. (2005). Mice deficient in CHRNA7, a subunit of the nicotinic acetylcholine receptor, produce sperm with impaired motility. *Biol Reprod*, 73(4), 807-814. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.042184>
- Bray, C., Son, J. H., & Meizel, S. (2005). Acetylcholine causes an increase of intracellular calcium in human sperm. *Mol Hum Reprod*, 11(12), 881-889. <https://doi.org/10.1093/molehr/gah245>
- Cartereau, A., Martin, C., & Thany, S. H. (2018). Neonicotinoid insecticides differently modulate acetylcholine-induced currents on mammalian alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *Br J Pharmacol*, 175(11), 1987-1998. <https://doi.org/10.1111/bph.14018>
- Cavieres, M. (2004). Exposición a pesticidas y toxicidad reproductiva y del desarrollo en humanos: Análisis de la evidencia epidemiológica y experimental. *Revista Médica de Chile*, 132(7), 873-879. [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0034-98872004000700014&script=sci\\_arttext&tlng=e](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0034-98872004000700014&script=sci_arttext&tlng=e)

- Cevallos, A. d. C. (2012). Morfoanormalías espermáticas en perros. *Revista de Medicina Veterinaria y zootecnia*, 1(1), 80-85.
- Chang, H., Daugherty, L., & Mitchell, A. (2013). Bee afraid, bee very afraid—Neonicotinoids and the nAChRs family. *InterPro Protein Focus*, 25, 1-8.
- Chen, Q., Zhang, Y., Li, J., Su, G., Ding, Z., & Sun, H. (2021). Serum concentrations of neonicotinoids, and their associations with lipid molecules of the general residents in Wuxi City, Eastern China. *J Hazard Mater*, 413, 125235. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125235>
- Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. (2012). The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacol Rev*, 64(1), 16-64. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002790>
- Cheng, C. Y., & Sun, F. (2008). Chapter 1 In S. a. c. o. t. s. epithelium (Ed.), *Molecular mechanisms in spermatogenesis* (Vol. 636). Springer Science
- CODEX, F. (2021). *Codex Maximum Residue Limits for Pesticides and Extraneous* *Maximum Residue Limits* <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/en/>
- Cooper, T. (2011). The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian journal of andrology*, 13, 130-138. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.97>
- Creasy, D. (2002). Histopathology of the male reproductive system II: interpretation. *Current protocols in toxicology*
- El-Hak, H. N. G., Al-Eisa, R. A., Ryad, L., Halawa, E., & El-Shenawy, N. S. (2022). Mechanisms and histopathological impacts of acetamiprid and azoxystrobin in male rats. *Environ Sci Pollut Res Int*, 29(28), 43114-43125. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-18331-3>

EPA. (2003). *Pesticide Fact Sheet: Clothianidin*.

Pesticide Detail.

Gerunov, T., Gonokhova, M., Boyko, T., & Gerunov, V. (2020). *Pathomorphological changes in the organs and tissues of animals during acute intoxication with neonicotinoids containing nitroso or cyano group* International Scientific Conference The Fifth Technological Order: Prospects for the Development and Modernization of the Russian Agro-Industrial Sector (TFTS 2019),

Green, T., Toghill, A., Lee, R., Waechter, F., Weber, E., Peffer, R., Noakes, J., & Robinson, M. (2005). Thiamethoxam induced mouse liver tumors and their relevance to humans. Part 2: species differences in response. *Toxicol Sci*, 86(1), 48-55. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi125>

Habotta, O. A., Ateya, A., Saleh, R. M., & El-Ashry, E. S. (2021). Thiamethoxam-induced oxidative stress, lipid peroxidation, and disturbance of steroidogenic genes in male rats: Palliative role of *Saussurea lappa* and *Silybum marianum*. *Environ Toxicol*, 36(10), 2051-2061. <https://doi.org/10.1002/tox.23322>

Hamed, I. A., Sherif, R. M., El-Sheikh, E. A., Aldawek, A. M., & Shalaby, A. A. (2023). Protective effect of vitamin C against thiamethoxam-induced toxicity in male rats. *Open Vet J*, 13(10), 1334-1345. <https://doi.org/10.5455/OVJ.2023.v13.i10.13>

Hirai, A., Toda, C., Yohannes, Y. B., Collins, N., Tamba, M., Nomiyama, K., Eguchi, A., Hoshi, N., Hirano, T., Nakayama, S. M. M., Ishizuka, M., & Ikenaka, Y. (2024). Role of brain monoamines in acetamiprid-induced anxiety-like behavior. *Toxicology*, 505, 153839. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2024.153839>

- Johnsen, S. (1970). Testicular biopsy score count-a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*, 1(1), 2-25. <https://doi.org/10.1159/000178170>
- Kahl, M. B. (2022). *Principales características de los insecticidas utilizados en el cultivo de soja*. Paraná, Argentina Retrieved from [https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-\\_insecticidas\\_utilizados\\_en\\_soja-\\_caractersticas.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-_insecticidas_utilizados_en_soja-_caractersticas.pdf)
- Karlin, A. (2010). Nicotinic Acetylcholine Receptors. In (Second ed., pp. 221-224). Handbook of Cell Signaling: Academic Press.
- Kawashima, K., & Fujii, T. (2004). Expression of non-neuronal acetylcholine in lymphocytes and its contribution to the regulation of immune function. *Front Biosci*, 9, 2063-2085. <https://doi.org/10.2741/1390>
- Keshta, A. T., Hataba, A. A., Mead, H. M., & El-Shafey, N. M. (2016). Oxidative Stress and Biochemical Changes Induced by Thiamethoxam and Acetamiprid Insecticides in Rats. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(6), 44-60. [https://www.researchgate.net/profile/Hala-Mead/publication/323105408\\_OXIDATIVE\\_STRESS\\_AND\\_BIOCHEMICAL\\_CHANGES\\_INDUCED\\_BY\\_THIAMETHOXAM\\_AND\\_ACETAMIPRID\\_INSECTICIDES\\_IN\\_RATS/links/5a7f2ab54585154d57d74094/OXIDATIVE-STRESS-AND-BIOCHEMICAL-CHANGES-INDUCED-BY-THIAMETHOXAM-AND-ACETAMIPRID-INSECTICIDES-IN-RATS.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Hala-Mead/publication/323105408_OXIDATIVE_STRESS_AND_BIOCHEMICAL_CHANGES_INDUCED_BY_THIAMETHOXAM_AND_ACETAMIPRID_INSECTICIDES_IN_RATS/links/5a7f2ab54585154d57d74094/OXIDATIVE-STRESS-AND-BIOCHEMICAL-CHANGES-INDUCED-BY-THIAMETHOXAM-AND-ACETAMIPRID-INSECTICIDES-IN-RATS.pdf)
- Khaldoun-Oularbi, H., Bouzid, N., Boukreta, S., Makhlof, C., Derriche, F., & Djennas, N. (2017). Thiamethoxam Actara((R)) induced alterations in kidney liver

- cerebellum and hippocampus of male rats. *J Xenobiot*, 7(1), 7149. <https://doi.org/10.4081/xeno.2017.7149>
- Klapproth, H., Reinheimer, T., Metzen, J., Münch, M., Bittinger, F., Kirkpatrick, C. J., Höhle, K. D., Schemann, M., Racké, K., & Wessler, I. (1997). Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 355(4), 515-523. <https://doi.org/10.1007/pl00004977>
- Kumar, P., & Meizel, S. (2005). Nicotinic acetylcholine receptor subunits and associated proteins in human sperm. *J Biol Chem*, 280(27), 25928-25935. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502435200>
- Li, L., Liang, H., Zhao, T., Liu, Y., Yan, S., & Zhu, W. (2022). Differential effects of thiamethoxam and clothianidin exposure on their tissue distribution and chronic toxicity in mice. *Chem Biol Interact*, 366, 110149. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.110149>
- Liu, Z., Zhang, L., Zhang, Z., An, L., Hough, R., Hu, P., Li, Y. F., Zhang, F., Wang, S., Zhao, Y., Ke, Y., & Cui, S. (2022). A review of spatiotemporal patterns of neonicotinoid insecticides in water, sediment, and soil across China. *Environ Sci Pollut Res Int*, 29(37), 55336-55347. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-21226-6>
- López-Trinidad, B. P., Viguera-Villaseñor, R. M., Königsberg, M., Ávalos-Rodríguez, A., Rodríguez-Tobón, A., Cortés-Barberena, E., Arteaga-Silva, M., & Arenas-Ríos, E. (2021). Alterations in epididymal sperm maturation caused by ageing. *Reprod Fertil Dev*, 33(18), 855-864. <https://doi.org/10.1071/rd21081>

- Makino, Y., Hiradate, Y., Umezu, K., Hara, K., & Tanemura, K. (2021). Expression and Possible Role of Nicotinic Acetylcholine Receptor  $\epsilon$  Subunit (AChRe) in Mouse Sperm. In. *BIولوجY*.
- Mantovani, A., & Maranghi, F. (2005). Risk assessment of chemicals potentially affecting male fertility. *Contraception*, 72(4), 308-313. <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2005.04.014>
- Marfo, J. T., Fujioka, K., Ikenaka, Y., Nakayama, S. M., Mizukawa, H., Aoyama, Y., Ishizuka, M., & Taira, K. (2015). Relationship between Urinary N-Desmethyl-Acetamiprid and Typical Symptoms including Neurological Findings: A Prevalence Case-Control Study. *PLoS One*, 10(11), e0142172. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142172>
- Meistrich, M. L. (1986). Critical components of testicular function and sensitivity to disruption. *Biol Reprod*, 34(1), 17-28. <https://doi.org/10.1095/biolreprod34.1.17>
- Moffit, J., Bryant, B., Hall, S., & Boekelheide, K. (2007). Dose-dependent effects of sertoli cell toxicants 2,5-hexanedione, carbendazim, and mono-(2-ethylhexyl) phthalate in adult rat testis. *Toxicologic pathology*, 35, 719-727. <https://doi.org/10.1080/01926230701481931>
- Montiel-León, J. M., Munoz, G., Vo Duy, S., Do, D. T., Vaudreuil, M. A., Goeury, K., Guillemette, F., Amyot, M., & Sauvé, 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>

- Nakai, M., Miller, M. G., Carnes, K., & Hess, R. A. (2002). Stage-specific effects of the fungicide carbendazim on Sertoli cell microtubules in rat testis. *Tissue Cell*, 34(2), 73-80. [https://doi.org/10.1016/s0040-8166\(02\)00006-x](https://doi.org/10.1016/s0040-8166(02)00006-x)
- Nguyen, V. T., Hall, L. L., Gallacher, G., Ndoeye, A., Jolkovsky, D. L., Webber, R. J., Buchli, R., & Grando, S. A. (2000). Choline acetyltransferase, acetylcholinesterase, and nicotinic acetylcholine receptors of human gingival and esophageal epithelia. *J Dent Res*, 79(4), 939-949. <https://doi.org/10.1177/00220345000790040901>
- O'Donnell, L., Stanton, P., & Kretser, D. (2017). Endocrinology of the male reproductive system and spermatogenesis. In. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279031/>
- OMS. (2019). *Clasificación recomendada por la OMS de los plaguicidas por el peligro que presentan y directrices para la clasificación*
- Ortíz- Sánchez, P. B., Sámano Hernández, L., González-Márquez, H., & Fierro, R. (2024). Amenaza para la salud: El Acetamiprid. 3061 - 7278.
- Pask, A. (2016). *The Reproductive System*. (Vol. 886) [https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-94-017-7417-8\\_1](https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-94-017-7417-8_1)
- Rengan, A. K., Agarwal, A., van der Linde, M., & Du Plessis, S. S. (2012). An investigation of excess residual cytoplasm in human spermatozoa and its distinction from the cytoplasmic droplet. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-92>
- Rodrigues, K. J., Santana, M. B., Do Nascimento, J. L., Picanço-Diniz, D. L., Maués, L. A., Santos, S. N., Ferreira, V. M., Alfonso, M., Durán, R., & Faro, L. R. (2010).

Behavioral and biochemical effects of neonicotinoid thiamethoxam on the cholinergic system in rats. *Ecotoxicol Environ Saf*, 73(1), 101-107.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.04.021>

Rodríguez Mercado, J. J. (2022). *Toxicología Reproductiva*. Universidad Nacional Autónoma de México. Retrieved abril 2022 from

[https://www.zaragoza.unam.mx/toxicologia-](https://www.zaragoza.unam.mx/toxicologia-reproductiva/#:~:text=La%20Toxicolog%C3%ADa%20Reproductiva%20se%20define,se%20manejan%20de%20forma%20separada)

[reproductiva/#:~:text=La%20Toxicolog%C3%ADa%20Reproductiva%20se%2](https://www.zaragoza.unam.mx/toxicologia-reproductiva/#:~:text=La%20Toxicolog%C3%ADa%20Reproductiva%20se%20define,se%20manejan%20de%20forma%20separada)

[0define,se%20manejan%20de%20forma%20separada](https://www.zaragoza.unam.mx/toxicologia-reproductiva/#:~:text=La%20Toxicolog%C3%ADa%20Reproductiva%20se%20define,se%20manejan%20de%20forma%20separada)

SAGARPA. (2001). *NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*.

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>

Seifert, J. (2014). Neonicotinoids. In *Biomedical Sciences* (Third ed., pp. 477-482). University of Hawaii.

Stornelli, M. A., Corrada, Y., & Gobello, M. C. (1999). Evaluación del semen canino. *XVI*, 630-635.

Suwannarin, N., Prapamontol, T., Isobe, T., Nishihama, Y., Hashimoto, Y., Mangklabruks, A., Pantasri, T., Chantara, S., Naksen, W., & Nakayama, S. F. (2021). Exposure to Organophosphate and Neonicotinoid Insecticides and Its Association with Steroid Hormones among Male Reproductive-Age Farmworkers in Northern Thailand. *Int J Environ Res Public Health*, 18(11).

<https://doi.org/10.3390/ijerph18115599>

Syngenta. (2017). *Actara 25 WG Ficha técnica.*

<https://www.syngenta.com.mx/product/crop-protection/insecticida/actarar-25-wg>

Syngenta, M. (2019). *Hoja de Seguridad.* <https://www.syngenta.com.mx/>

Tan, Y., Zhang, Q., Zhao, C., Wang, X., Li, J., Wang, D., & Zhou, Y. (2016). Residues of Neonicotinoid Pesticides in Vegetables and Fruit and Health Risk Assessment of Human Exposure via Food Intake. *11*, 67 - 81.

Terali, K. (2018). An evaluation of neonicotinoids' potential to inhibit human cholinesterases: Protein-ligand docking and interaction profiling studies. *84*, 54–63.

Thompson, D. A., Lehmler, H. J., Kolpin, D. W., Hladik, M. L., Vargo, J. D., Schilling, K. E., LeFevre, G. H., Peeples, T. L., Poch, M. C., LaDuca, L. E., Cwiertny, D. M., & Field, R. W. (2020). A critical review on the potential impacts of neonicotinoid insecticide use: current knowledge of environmental fate, toxicity, and implications for human health. *Environ Sci Process Impacts*, *22*(6), 1315-1346. <https://doi.org/10.1039/c9em00586b>

Vidal, J. D., & Whitney, K. M. (2014). Morphologic manifestations of testicular and epididymal toxicity. *Spermatogenesis*, *4*(2). <https://doi.org/10.4161/21565562.2014.979099>

Wang, X., Anadón, A., Wu, Q., Qiao, F., Ares, I., Martínez-Larrañaga, M. R., Yuan, Z., & Martínez, M. A. (2018). Mechanism of Neonicotinoid Toxicity: Impact on Oxidative Stress and Metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, *58*, 471-507. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010617-052429>

- Wessler, I., & Kirkpatrick, C. J. (2008). Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol*, *154*(8), 1558-1571.  
<https://doi.org/10.1038/bjp.2008.185>
- Wessler, I., Panter, H., Bittinger, F., Kriegsmann, J., Kirkpatrick, C. J., Kawashima, K., & Kilbinger, H. (2001). Subcellular location of choline acetyltransferase (ChAT) and acetylcholine (ACh) in human. In (Vol. 363, pp. R23). New York, USA: NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY.
- Wessler, I. K., & Kirkpatrick, C. J. (2017). Non-neuronal acetylcholine involved in reproduction in mammals and honeybees. *J Neurochem*, *142 Suppl 2*, 144-150.  
<https://doi.org/10.1111/jnc.13953>
- WHO. (2021). *World Health Organization laboratory manual for the examination and processing of human semen* (Sixth ed., Vol. 117). World Health Organization.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.12.012>
- Xu, L., Hu, Y., Zhu, Q., Liao, C., & Jiang, G. (2022). Several typical endocrine disrupting chemicals in human urine from general population in China: Regional and demographic related differences in exposure risk.
- Xu, M., Zhang, Z., Li, Z., Kan, S., Liu, Z., Wang, D., Liu, Q., & Zhang, H. (2021). Profiles of neonicotinoid insecticides and characteristic metabolites in paired urine and blood samples: Partitioning between urine and blood and implications for human exposure. In. *Science of the Total Environment*.
- Zhang, D., & Lu, S. (2022). Human exposure to neonicotinoids and the associated health risks: A review. *Environ Int*, *163*, 107201.  
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107201>

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>

Zuscikova, L., Bazany, D., Greifova, H., Knizatova, N., Kovacik, A., Lukac, N., & Jambor, T. (2023). Screening of Toxic Effects of Neonicotinoid Insecticides with a Focus on Acetamiprid: A Review. *Toxics*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/toxics11070598>

## 13 Anexos

<b>Anexo 1 Tinción hematoxilina-eosina de tejido testicular (modificado por Vanessa 03/julio/2024)</b>	
En un vaso de muestras, desparafinar 3 laminillas por 35 minutos a 80° en la estufa, para iniciar la tinción desfasar 10 minutos entre laminillas	
Xilol	5 minutos
Xilol	5 minutos
OH 96	5 minutos
OH 70	5 minutos
H2O potable	5 minutos
H2O destilada	5 minutos
Hematoxilina	30 segundos
H2O destilada	1 minuto “sumergir y sacar la laminilla constantemente”
Eosina	15 segundos
H <sub>2</sub> O destilada	1 minuto, “sumergir y sacar la laminilla constantemente”
OH 70	3 segundos
OH 100	3 segundos

Xilol	5 segundos
Montar con Entellan	Una vez montadas, dejar secar dos días para observarlas al microscopio de campo claro 400x

**Anexo 2.** Índice de maduración de Johnsen (Johnsen, 1970).

Score	
10	Espermatogénesis completa con gran cantidad de espermatozoides (más de 6). Epitelio germinal organizado y con espesor regular dejando una luz abierta
9	Espermatogénesis completa con poca cantidad de espermatozoides (5 o menos) Epitelio germinal desorganizado, con marcado desprendimiento o cierre del lumen.
8	No hay más de 10 espermatozoides maduros, presencia de espermátidas maduras en diferenciación.
7	Sin espermatozoides. Gran cantidad de espermátidas sin signos de diferenciación (más de 6)
6	Sin espermatozoides. Presencia de pocas espermátidas (5 o menos por tubo)

5	Sin espermatozoides. Gran cantidad de espermatoцитos presentes (más de 6)
4	Pocos espermatoцитos presentes (5 o menos por tubo)
3	Presencia solamente de espermatogonias
2	Sin presencia de células germinales, solamente presencia de células de Sertoli
1	No hay ningún tipo de células en el túbulo seminífero



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00194

Matrícula: 2223802017

EFFECTO DEL TIAMPTOXAM EN EL TESTICULO Y ESPERMATOZOIDES DE EPIDIDIMO DE RATA.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 26 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  
DRA. MARIA DEL CARMEN MARTINEZ VALENZUELA  
DRA. IRMA JIMENEZ MORALES  
DRA. PAOLA BERENICE ORTIZ SANCHEZ

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

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: VANESSA GUADALUPE SOLIS VIDAL



VANESSA GUADALUPE SOLIS VIDAL  
ALUMNA

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.

REVISÓ

MTRA. ROSALBA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA

VOGAL

DRA. MARIA DEL CARMEN MARTINEZ  
VALENZUELA

VOGAL

DRA. IRMA JIMENEZ MORALES

SECRETARIO

DRA. PAOLA BERENICE ORTIZ SANCHEZ