



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA

**“Evaluación de la viabilidad del ovocito, foliculogénesis y niveles
hormonales por la exposición al temefos en un modelo *in vivo* de ratones
hembra”**

T E S I S

Que presenta

Q.F.B. ANDREA LIZETTE CARO HERBERT

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE TOXICOLOGÍA

Directora de tesis:

Dra. María Isabel Hernández Ochoa

Este trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Toxicología Reproductiva Femenina del Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), bajo la dirección de la Dra. María Isabel Hernández Ochoa. Este trabajo de tesis se financió por medio de la beca de maestría No. CVU 1076915 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a Andrea Lizette Caro Herbert.

Dedicatoria

Para mi frijolito.

Agradecimientos

Agradezco infinitamente a la Dra. María Isabel Hernández Ochoa por su apoyo y disposición durante toda mi estancia en su grupo de investigación, por sus constantes consejos para mejorar este trabajo. Gracias por su gran amabilidad y paciencia.

A mis asesores, la Dra. María Betzabet Quintanilla Vega y al Dr. Edmundo Bonilla González por sus grandes consejos, sugerencias y aportes para concluir este trabajo de la mejor manera posible.

A la Dra. Sihomara Patricia García Zepeda por su apoyo técnico durante la realización de este proyecto y por su compañía, consejos y vivencias compartidas durante la etapa de experimentación y escritura de esta tesis.

Al Lic. Alfredo Alvarado Ramírez por su apoyo técnico en el laboratorio.

Al personal de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio del CINVESTAV (UPEAL), la MVZ María Antonieta López López y al Prof. Jorge Fernández Hernández. A la C. Irma Zavala Mejía por el apoyo en la solicitud de animales de laboratorio. A los MVZ Ricardo Gaxiola Centeno, Rafael Leyva Muñoz, Benjamín Emmanuel Chávez Álvarez, Carlos G. Sam Miranda y Alberto Rojo García por su apoyo en el manejo y cuidados de los animales en el bioterio.

A Patricia Cabrera Mata y a la Lic. Lucina González de la Torre por el apoyo secretarial.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante mis estudios de maestría.

A la Dra. Aurora Elizabeth Rojas, la Dra. Yael Yvette Bernal Hernández, el Dr. Francisco Alberto Verdín-Betancourt y el M. en C. Miguel Alfonso Ruíz-Arias por recibirme con los brazos abiertos y apoyarme durante mi estancia en el laboratorio de Contaminación y Toxicología de la Universidad Autónoma de Nayarit para la evaluación de la actividad de acetilcolinesterasa.

A mis compañeros de laboratorio, el M. en C. Cristian Martín Zamora González por su apoyo técnico desde el inicio de la etapa experimental, por enseñarme aquellos trucos de obtención de muestras y manejo de animales, y al Q. F. B. Eduardo Rojas Prado por su compañía y ayuda en el laboratorio.

Al M. en C. David Sebastián Hernández Toledano por su apoyo en la obtención de algunas de las micrografías en el ensayo de comunicación entre COC.

Al CINVESTAV por abrirme sus puertas y permitirme estudiar una maestría donde pude desarrollarme como estudiante y seguir cultivando mis conocimientos.

A los miembros del Colegio de Profesores el Departamento de Toxicología, por su disposición, desde los cursos propedéuticos, a compartirnos su conocimiento y herramientas para formarnos como maestros en ciencias en la especialidad de toxicología.

Al Comité de estudiantes del Departamento de Toxicología, José Arturo Jiménez Chávez, Andrea Cázares Morales, Marvin Josue Paz Sabillón y Aylín Larrañaga Parrado, por su apoyo en el transcurso de la maestría.

A mis compañeros y amigos de generación que hicieron de mi estancia en el Departamento de Toxicología algo divertido que me dejó muchos recuerdos y muchas risas. A mis amigos del grupo secreto, Yumara, Erick y Adrián, espero nuestra amistad nunca termine, se han convertido en mi familia de Ciudad de México.

A Joselly, Fernanda, Nancy y Melanie que aguantaron todas mis frustraciones, me escucharon y me hicieron compañía en cada etapa de mi vida como estudiante o durante toda su vida y ahora, aunque miles de kilómetros nos separan no han parado de hacerlo.

A la Sra. Luz Eréndira Jasso Arias, quien me apoyó durante el inicio de esta etapa y me abrió las puertas de su hogar.

A Khaleesi que estuvo a mi lado (literalmente) durante el confinamiento por la pandemia, las clases en línea y la escritura de esta tesis, sin importar que disminuyeran los paseos por las tardes o los juegos con su vaca.

A mi esposo Diego, quien ha estado a mi lado desde antes de poder llamarme química, quien ha creído en mi todo el tiempo y me ha dado la motivación necesaria para construir juntos nuestro futuro ideal.

Y finalmente a mis padres, María de los Ángeles Herbert Hernández y Rubén Caro Pacheco, por haberme dado la oportunidad de seguir estudiando y cumplir cada uno de mis sueños. Les agradezco de corazón toda su dedicación y paciencia a lo largo de mi vida. Gracias por dejarme volar, sé que la distancia no es fácil, pero valdrá la pena, los quiero muchísimo.

¡GRACIAS A TODOS POR TRANSFORMAR CADA MOMENTO EN APRENDIZAJE!

Resumen

El temefos es el plaguicida organofosforado más utilizado en campañas de salud pública para el control de vectores de enfermedades como dengue, Zika y chikungunya, a pesar de haber sido prohibido por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US. EPA) desde el año 2011. Entre los efectos tóxicos del temefos se encuentran malformaciones en la descendencia de hembras expuestas durante el embarazo y toxicidad sobre la fertilidad masculina. Resultados de nuestro laboratorio han demostrado el potencial del temefos para disminuir el crecimiento de los folículos antrales en un modelo *in vitro*, así como de reducir el número de ovocitos liberados en ratones hembra estimuladas con hormonas exógenas, sugiriendo que este plaguicida puede causar problemas de ovulación. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la exposición *in vivo* a temefos sobre algunos procesos fisiológicos que participan en la ovulación. Ratones hembra CD1 (32 días de edad; n=5 por grupo) fueron expuestas *p.o.* a dosis diarias de temefos (0, 15 y 150 µg/kg/día) durante cuatro ciclos estrales. Durante la exposición al temefos se determinó la ciclicidad estral para evaluar indirectamente su efecto sobre el ciclo reproductivo. Se contaron las poblaciones de folículos ováricos para evaluar el efecto sobre la foliculogénesis. Como parámetros generales de toxicidad se evaluaron la ganancia de peso corporal y la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) los días 0, 1, 5, 10 y al final del tratamiento. No se observaron diferencias significativas en la ciclicidad estral, ganancia de peso corporal, ovulación, niveles hormonales o en la viabilidad de los ovocitos entre el grupo control y los grupos expuestos al temefos. La actividad de la AChE disminuyó significativamente al día 1 de exposición en el grupo tratado con 150 µg/kg/día de temefos comparado con el grupo control (control= 4.11 U/g Hb; tratado= 1.65 U/g Hb). El grupo tratado con 15 µg/kg/día de temefos aumentó significativamente en 73.7% el número de folículos antrales ováricos comparado con el grupo control, sugiriendo que los pasos previos a la ovulación podrían afectarse. Adicionalmente, se evaluó la comunicación de las células del cúmulo hacia el ovocito mediante la incubación de los complejos ovocitos célula del cúmulo con el fluorocromo calceína-AM. Los ovocitos colectados del grupo tratado con 15 µg/kg/día mostraron una disminución significativa de 74.9% en la intensidad de la fluorescencia de calceína-AM comparada con los ovocitos del grupo control, sugiriendo que el temefos induce el cierre de la comunicación entre las células del cúmulo y los ovocitos. En conjunto, nuestros resultados sugieren que la exposición subcrónica a 15 µg/kg/día de temefos en ratones hembra CD1 altera la foliculogénesis y posiblemente la maduración del ovocito, los cuales son eventos importantes para una ovulación exitosa. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para evaluar los posibles mecanismos de toxicidad.

Abstract

Temephos is the most widely used organophosphate pesticide in public health campaigns to control vectors of diseases such as dengue, Zika and chikungunya, despite it was banned by the United States Environmental Protection Agency (US. EPA) since 2011. Malformations in the offspring from females exposed during pregnancy, DNA damage in HepG2 cells and toxicity on male fertility are among the toxic effects of temephos. Results from our laboratory have shown the potential of temephos to decrease antral follicle growth in an *in vitro* model, as well as to reduce the number of released oocytes in hormonally-stimulated female mice, suggesting that temephos may impair ovulation. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of *in vivo* exposure to temephos on some physiological processes involved in ovulation. Female CD1 mice (32 days old; n=5 per group) received *p.o.* daily doses of 0, 15, and 150 µg/kg/day of temephos for 4 estrous cycles. During exposure to temephos, estrous cyclicity was determined to indirectly assess its effect on the reproductive cycle. Ovarian follicle populations were counted to assess the effect on folliculogenesis. As general toxicity parameters, body weight gain and acetylcholinesterase (AChE) activity were evaluated on days 0, 1, 5, 10 and at the end of treatment. No significant differences in estrous cyclicity, body weight gain, ovulation, hormone levels, or oocyte viability were observed between the control group and the temephos-exposed groups. AChE activity was significantly decreased in the 150 µg/kg/day treated group at day 1 of exposure compared to the control group (control= 4.11 U/g Hb; treated= 1.65 U/g Hb). The group treated with 15 µg/kg/day of temephos significantly increased the number of ovarian antral follicles by 73.7% compared to the control group, suggesting that steps prior to ovulation could be affected. Additionally, we evaluated whether *in vivo* exposure to temephos alters cumulus cell communication to the oocyte by incubating oocyte-cumulus cell complexes with the fluorochrome calcein-AM. Oocytes collected from the 15 µg/kg/day treated group showed a significant 74.9% decrease in calcein-AM fluorescence intensity compared to those from the control group, suggesting that temephos closes communication between cumulus cells and oocytes. Taken together, our results suggest that subchronic exposure to 15 µg/kg/day of temephos in female CD1 mice impairs folliculogenesis and possibly oocyte maturation, which are crucial events for successful ovulation. However, additional studies are required to assess possible mechanisms of toxicity.

Índice	Página
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Resumen.....	vi
Abstract.....	vii
Índice de tablas y figuras.....	xi
Lista de Abreviaturas.....	xii
1. Introducción.....	1
1.1 Reproducción femenina	1
1.1.1 Formación de los ovarios	2
1.1.2 Foliculogénesis.....	2
1.1.2.1 Comunicación intercelular entre células de la granulosa y el ovocito	3
1.1.3 Crecimiento y maduración del ovocito.....	4
1.1.4 Ovulación	5
1.1.5 Atresia y formación del cuerpo lúteo	6
1.2 Plaguicidas organofosforados.....	6
1.2.1 Generalidades sobre el temefos.....	8
1.2.1.1 Propiedades fisicoquímicas del temefos.....	9
1.2.1.2 Toxicocinética del temefos.....	9
1.2.1.3 Toxicidad del temefos	11
1.2.1.3.1 Toxicidad del temefos en el sistema reproductivo masculino	12
1.2.1.3.2 Toxicidad del temefos en el sistema reproductivo femenino.....	13
1.3 Justificación	14
1.4 Hipótesis	15
1.5 Objetivo general.....	15
1.5.1 Objetivos particulares	15
2. Metodología.....	16

2.1 Materiales y reactivos	16
2.2 Estrategia experimental	16
2.3 Actividad de la AChE	18
2.3.1 Principio.....	18
2.3.2 Procedimiento.....	18
2.4 Obtención de complejos ovocito-célula del cúmulo	19
2.4.1 Principio.....	19
2.4.2 Procedimiento.....	19
2.5 Niveles hormonales.....	19
2.5.1 Principio.....	19
2.5.2 Procedimiento.....	20
2.6 Ciclo estral	20
2.6.1 Principio.....	20
2.6.2 Procedimiento.....	20
2.7 Foliculogénesis y ovulación	21
2.7.1 Principio.....	21
2.7.2 Procedimiento.....	21
2.8 Viabilidad de los ovocitos.....	23
2.8.1 Principio.....	23
2.8.2 Procedimiento.....	24
2.9 Ensayo de comunicación entre uniones Gap en los COC	24
2.9.1 Principio.....	24
2.9.2 Procedimiento.....	25
2.10 Análisis estadístico.....	25
3. Resultados.....	26
3.1 Ganancia de peso corporal durante la exposición a temefos.....	26
3.2 Actividad de la acetilcolinesterasa durante la exposición a temefos.....	26
3.3 Niveles hormonales después de la exposición a temefos.....	27
3.4 Ciclicidad estral durante la exposición a temefos	28
3.5 Número de folículos y cuerpos lúteos después de la exposición a temefos ...	30
3.6 Viabilidad de los ovocitos después de la exposición a temefos.....	31

3.6.1 Comunicación entre las uniones del COC después de la exposición a temefos.....	32
4. Discusión.....	34
4.1 Efecto del temefos sobre la ganancia de peso corporal.....	34
4.2 Efecto del temefos sobre la actividad de la AChE	34
4.3 Efecto del temefos sobre los niveles de hormonas esteroideas y gonadotropinas	36
4.4 Efecto del temefos sobre la ciclicidad estral	36
4.5 Efecto del temefos sobre la foliculogénesis y ovulación	37
4.6 Efecto del temefos sobre la viabilidad de los ovocitos	38
4.6.1 Efecto del temefos sobre la comunicación entre los COC por medio de uniones Gap	39
5. Conclusiones.....	41
6. Perspectivas.....	42
7. Referencias.....	43

Índice de tablas y figuras	Pag
Figura 1. Etapas del desarrollo folicular.	3
Figura 2. Maduración del ovocito.....	5
Figura 3. Estructura general de los compuestos organofosforados	7
Figura 4. Estructura química del temefos.....	8
Figura 5. Vía de biotransformación propuesta para el temefos	10
Figura 6. Estrategia experimental.....	17
Figura 7. Imágenes representativas de frotis vaginales de ratonas tratadas.	21
Figura 8. Ganancia de peso corporal.....	26
Figura 9. Actividad de AChE corregida por Hb	27
Figura 10. Niveles hormonales de estrógenos y gonadotropinas.....	28
Figura 11. Días de duración entre fases del ciclo estral.....	29
Figura 12. Prueba de tendencia.	29
Figura 13. Conteo folicular.....	30
Figura 14. Número de cuerpos lúteos	31
Figura 15. Porcentaje de ovocitos viables.....	32
Figura 16. Fluorescencia de calceína-AM	33
Tabla 1. Tinción con hematoxilina y eosina.....	23

Lista de Abreviaturas

AChE: Acetilcolinesterasa
AM: Acetoximetil
AMPc: adenosín monofosfato cíclico
ANOVA: Análisis de Varianza
BPS: Bisfenol S
BuChE: Butirilcolinesterasa
CENAPRECE: Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades
COC: Complejo ovocito-células del cúmulo
CYP: Citocromo
DHEA-S: Dehidroepiandrosterona
DL₅₀: Dosis letal 50
DMSO: Dimetil sulfóxido
DNTB: Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
E2: Estradiol en sangre
eCG: Gonadotropina Coriónica equina
ECL: Electroquimioluminiscencia
EE: Error estándar
EPA: Agencia de Protección Ambiental
FPM: Factor promotor de la maduración
FSH: Hormona folículo estimulante
GMPc: Guanosín monofosfato cíclico
Hb: Hemoglobina
IP: Ioduro de propidio
LH: Hormona luteinizante
MEM- α : Medio α mínimo esencial
OF: Organofosforado
OMS: Organización Mundial de la Salud
PKA: Proteína cinasa dependiente de AMPc
SIDP: 4,4'-sulfinildifenol
SODP: 4,4'-sulfonidifenol
SOP: Síndrome de ovario poliquístico
TDP: 4,4'-tiodifenol
Tem-dox-SO₂: Temefos-dioxón-sulfona
Tem-SO: Temefos -sulfóxido

1. Introducción

1.1 Reproducción femenina

Uno de los modelos mamíferos más utilizados para el estudio de la reproducción femenina es el ratón, esto debido a su fácil manejo, y su corto ciclo reproductivo (Mircea *et al.*, 2010). El ciclo reproductivo de las hembras de mamíferos (excluidos los primates) se denomina ciclo estral y está caracterizado por las etapas de proestro, estro (fase donde la hembra se encuentra receptiva hacia el macho), metaestro y diestro (Achiraman *et al.*, 2010). Este ciclo tiene una duración media de 4-5 días en ratonas y conlleva a cambios morfológicos en los ovarios, útero y vagina debido a cambios hormonales que ayudan al comienzo de la pubertad en las hembras sexualmente maduras. Se divide en dos fases, la fase folicular donde se forman los folículos, y la fase lútea que es la fase posterior a la ovulación donde se forma el cuerpo lúteo. La hormona folículo estimulante (FSH) estimula el crecimiento y desarrollo de los folículos ováricos al promover el crecimiento de las células de la granulosa y la secreción de estrógenos por los ovarios. Por otro lado, la hormona luteinizante (LH) favorece el crecimiento del folículo en etapas tardías, induce la ovulación y forma el cuerpo lúteo después de la ovulación. El estradiol actúa como una molécula de retroalimentación entre los ovarios y las neuronas hipotálamicas que estimula la liberación de FSH y LH (Hu *et al.*, 2008). Por último, el estradiol (E2) actúa como hormona reproductiva, es responsable del crecimiento y desarrollo de la vagina, útero y órganos vitales para el transporte del óvulo, maduración del cigoto y la implantación, y tiene su pico de concentración más alto durante la liberación de los óvulos, disminuyendo rápidamente después de que ocurre la ovulación. Durante el proestro, las concentraciones de estradiol sérico son más altas, al igual que las concentraciones de FSH y LH. Estas hormonas se producen en las células de la pituitaria y se secretan a la sangre para regular la esteroidogénesis y jugar un papel importante los procesos de foliculogénesis y ovulación (Aritonang *et al.*, 2017).

1.1.1 Formación de los ovarios

El ovario es un tejido dinámico que se forma alrededor del día 10.5 de gestación en los ratones (Tingen *et al.*, 2009). Las células germinales son indispensables en el desarrollo de los ovarios durante la gestación, ya que migran desde el epitelio del saco vitelino, que es una estructura que se encuentra dentro del saco gestacional, hacia la cresta genital recibiendo el nombre de “ovogonias”. Estos conjuntos celulares comienzan a proliferar, siendo reguladas por procesos como la mitosis, meiosis y atresia. Al pasar alrededor del día 13.5 de gestación, algunas células entran a la profase de la primera división meiótica para formar los ovocitos y aproximadamente al día 17.5 de vida fetal se inicia la ruptura del nido de ovogonias, comenzando la formación de folículos primordiales, donde algunos de ellos crecerán y se desarrollarán hasta la ovulación (Pepling, 2006; Strauss III y Williams, 2014). Por otro lado, el ovario se encuentra rodeado de células epiteliales, que en conjunto forman el mesotelio ovárico que se compone de células planas o cúbicas que presentan cilios y microvellosidades y que se posan en una membrana que cubre el tejido conectivo, su función va desde el transporte de material hasta la reparación de defectos superficiales resultantes de la ovulación. Asimismo, se encuentran las células del estroma, que sirven como aislantes en el interior del ovario, separando los folículos y los cuerpos lúteos de las estructuras cercanas (Strauss III y Williams, 2014).

1.1.2 Folliculogénesis

Antes de nacer, las hembras nacen con una reserva limitada de folículos primordiales, que contienen a los ovocitos rodeados por una capa de células de la granulosa aplanadas. Después de nacer, el ovario de ratón contiene de 10-15 mil ovocitos que después de dos días completan la profase de la primera división meiótica (Rankin *et al.*, 2000). El crecimiento folicular (figura 1) comienza cuando los folículos primordiales salen de su estado de reposo y las células de la granulosa cambian de forma aplanada a forma cuboidal al mismo tiempo que comienzan su proliferación. Al mismo tiempo, las células de la teca se diferencian para definir el exterior del folículo, comenzando el agrandamiento del ovocito y la formación de la zona pelúcida para crear una matriz que rodea al ovocito, formando el folículo primario (Rankin *et al.*, 2000; Strauss III y

Williams, 2014). A medida que se desarrolla el folículo secundario las células de la granulosa comienzan a desarrollar receptores de FSH, estrógenos y andrógenos, mientras que las células de la teca adquieren receptores de LH y son capaces de sintetizar hormonas esteroideas; es en este momento que los ovocitos que crecen dentro de los folículos son dependientes de gonadotropinas (Strauss III y Williams, 2014). En la etapa preantral tardía las células proliferan en respuesta a la FSH y se forma una cavidad antral entre las células, que facilita la liberación del complejo ovocito-célula del cúmulo (COC) durante la ovulación, es aquí donde el ovocito deja de crecer y se prepara para reanudar la meiosis. Después, la zona pelúcida separa al ovocito de las células de la granulosa, manteniendo su comunicación por medio de uniones Gap para nutrir al ovocito y controlar su detención y división en la meiosis (Eppig *et al.*, 1997; Hernández-Ochoa *et al.*, 2013; Strauss III y Williams, 2014; Acuña-Hernández *et al.*, 2018).

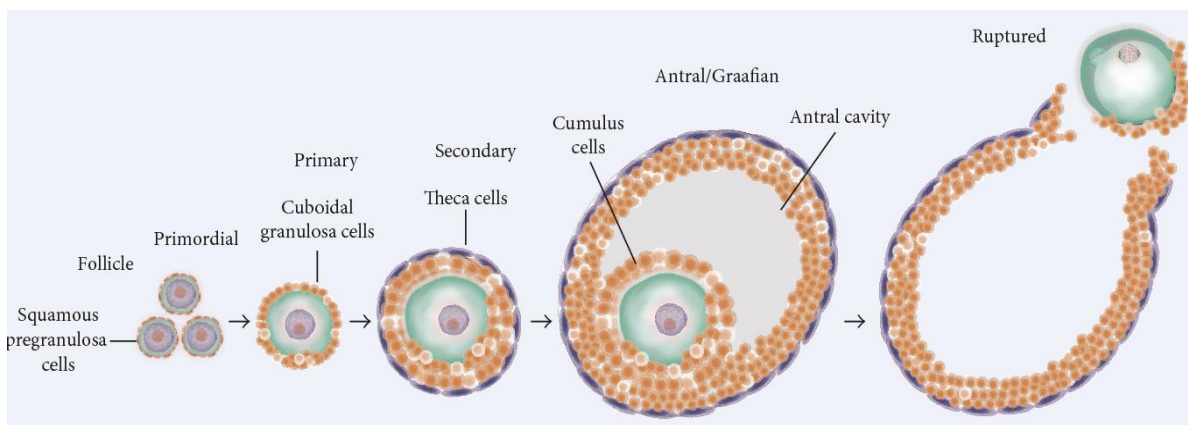


Figura 1. Etapas del desarrollo folicular (Mihalas *et al.*, 2017).

1.1.2.1 Comunicación intercelular entre células de la granulosa y el ovocito

Las células de la granulosa y el ovocito se encuentran en comunicación constante a través de una red de uniones Gap que son de suma importancia para el metabolismo, intercambio y transporte de moléculas entre células vecinas. Estas uniones se extienden desde el citoplasma de las células de la granulosa, pasando a través de la zona pelúcida, y llegando hasta la membrana plasmática del ovocito (Li y Albertini, 2013; Strauss III y Williams, 2014).

Las uniones Gap están compuestas por proteínas hexaméricas llamadas conexinas, siendo de las más importantes la conexina-37 (que comunica a las células de la granulosa y al ovocito) y la conexina-43 (que comunica células de la granulosa). El aumento en los niveles de FSH durante el desarrollo folicular induce la expresión de conexina-43 en las células de la granulosa, mientras que al final del ciclo, el aumento en los niveles de LH provoca su fosforilación, cerrando la comunicación entre los COC antes de la ovulación (Strauss III y Williams, 2014).

1.1.3 Crecimiento y maduración del ovocito

El ovocito es una célula metabólicamente activa, capaz de sintetizar proteínas que ayudan a un óptimo crecimiento y desarrollo bidireccional a través de las uniones Gap. El crecimiento y diferenciación del ovocito comienza a la par del crecimiento del folículo secundario y esto está dado por la adquisición de competencia meiótica, que ocurre al incrementar los niveles de proteínas involucradas con el ciclo celular como el factor promotor de la maduración (FPM) que induce la reanudación de la meiosis. El FPM es un heterodímero de dos proteínas (ciclina B y cinasa-1 dependiente de ciclina (CDK1)) que están presentes en los ovocitos completamente desarrollados, sin embargo, antes del incremento en los niveles de LH su actividad está restringida por adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y guanosín monofosfato cíclico (GMPc), que son segundos mensajeros en vías de transducción de señales. En los ovocitos detenidos en profase I de la meiosis, el GMPc de las células de la granulosa ingresa al ovocito a través de las uniones Gap (Strauss III y Williams, 2014; Acuña-Hernández *et al.*, 2018), y una vez en el ovocito el GMPc inhibe la fosfodiesterasa 3A AMPc (PDE3A), evitando la descomposición de AMPc en los ovocitos. Este AMPc en los ovocitos mantiene la detención meiótica por la actividad de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA), que a su vez fosforila al menos tres proteínas (WEE1B, MYT1 y CDC25B) lo que da como resultado la inhibición de la actividad de FPM y la prevención de la reanudación de la meiosis hasta la elevación en los niveles de LH que inicia una serie de eventos en el folículo antral maduro que resultan en la activación de FPM y la fosforilación de las conexinas, cerrando las uniones Gap después de la entrada de

GMPc al ovocito, provocando la reanudación espontánea de la meiosis al liberar el ovocito del folículo (Strauss III y Williams, 2014).

La maduración nuclear del ovocito (figura 2) es visible morfológicamente al momento de la ruptura de la vesícula germinal como resultado de la ruptura de las láminas nucleares. La cromatina se condensa y se mueve hacia la región cortical formando el huso meiótico I, la meiosis I continúa su progresión con la extrusión del primer cuerpo polar que contiene la mitad del contenido cromosómico del ovocito, deteniendo su ciclo celular en la metafase de la meiosis II, entonces el ovocito es denominado ovocito secundario, esto ocurre antes de la liberación del ovocito durante la ovulación (Erickson, 1996; Strauss III y Williams, 2014; Mihalas *et al.*, 2017; Acuña-Hernández *et al.*, 2018). Los eventos clave río abajo de la activación del receptor LH en las células foliculares son la disminución de GMPc en las células del cúmulo y el cierre de las uniones Gap, que resulta en la descomposición de AMPc y la pérdida de la actividad PKA para inhibir FPM (Strauss III y Williams, 2014).

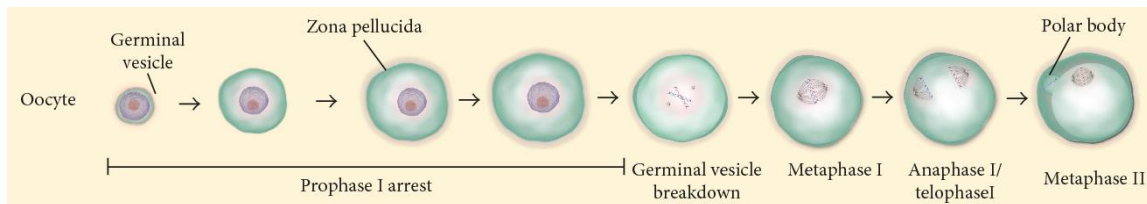


Figura 2. Maduración del ovocito (Mihalas *et al.*, 2017).

1.1.4 Ovulación

Hacia la mitad del ciclo estral, el aumento en los niveles de E2 propicia un pico en los niveles de LH, que puede ser detectado por las células de la granulosa y teca como resultado del aumento de AMPc y la activación de cascadas de transducción de señales como inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP3), lo que desencadena la reanudación de la meiosis y la liberación del ovocito (Strauss III y Williams, 2014). Una vez que el folículo libera el ovocito, las células de la granulosa y la teca se diferencian en el cuerpo lúteo (Erickson, 1996; Mihalas *et al.*, 2017; Acuña-Hernández *et al.*, 2018). A su vez, el aumento en los niveles de LH retardan el crecimiento de los folículos más pequeños (Strauss III y Williams, 2014).

1.1.5 Atresia y formación del cuerpo lúteo

La atresia ocurre en todas las etapas del desarrollo folicular, y es reflejo de la ausencia de factores esenciales para la formación o maduración folicular. En los folículos en crecimiento que experimentan atresia, las células de la granulosa apoptóticas comienzan a acumularse, lo que comienza la señalización para la muerte celular programada de los folículos que no terminaron en ovulación. Al mismo tiempo, después de la ovulación, el folículo roto se reorganiza en el cuerpo lúteo, donde la hemorragia en la cavidad ovulatoria asociada con la ruptura folicular está acompañada de la penetración de capilares y fibroblastos del estroma circundante, lo que ayuda a que algunos componentes de la sangre como lipoproteínas de baja densidad (LDL), proporcionen el colesterol para la producción de progesterona y se restablezcan los niveles de LH (Strauss III y Williams, 2014).

1.2 Plaguicidas organofosforados

Los plaguicidas organofosforados (OF) son utilizados mundialmente en la industria de la agricultura para proteger cultivos, así como el control de plagas y malezas debido a su fácil accesibilidad y alta toxicidad (Pereska *et al.*, 2019). El uso de estos plaguicidas aumentó después de la eliminación gradual de los organoclorados a principios de la década de 1970 (Balalian *et al.*, 2021). Estos plaguicidas incluyen una gran variedad de compuestos con diferente toxicidad, propiedades físicas, químicas y biológicas. Los OF tienen diversas acciones dependiendo de sus sustituyentes R_1 , R_2 y X, teniendo mayor toxicidad aquellos compuestos donde X es un grupo electronegativo fuerte como un haluro, cianuro o tiocianato (Singh *et al.*, 2015). La estructura general de los OF se muestra en la figura 3.

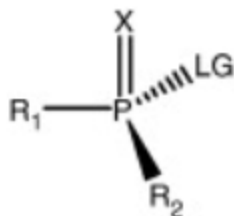


Figura 3. Estructura general de los compuestos organofosforados. X: Oxígeno o azufre; LG: Grupo saliente (por sus siglas en inglés); R₁ y R₂: alquil, alcoxi, alquiltio o grupos amino (Singh *et al.*, 2015).

La exposición en seres humanos puede ser a través de la dieta, la aplicación de pesticidas en interiores residenciales, exposiciones ocupacionales, agrícolas y a través de la pulverización en áreas rurales (Balalian *et al.*, 2021). Entre los síntomas de intoxicación aguda por OF en seres humanos incluyen síntomas muscarínicos, nicotínicos, del sistema nervioso central (SNC), crisis colinérgicas, parálisis respiratoria, hipertensión e incluso la muerte a exposiciones altas por insuficiencia respiratoria resultante de la parálisis de los músculos respiratorios y depresión del centro respiratorio cerebral. Mientras que, bajo una exposición crónica puede haber desarrollo de efectos como hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, cardiotoxicidad, neurotoxicidad, embriotoxicidad y fertilidad reducida. Algunos otros mecanismos de toxicidad implicados son el estrés oxidante, genotoxicidad y procesos de inflamación crónica (Jokanović *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2015). Entre los efectos en el sistema reproductivo, existe evidencia de una disminución del peso al nacer después de la exposición gestacional a OF en ratas (Balalian *et al.*, 2021).

Asimismo, su mecanismo principal de toxicidad es la inhibición irreversible de las colinesterasas como acetilcolinesterasa (AChE) y otras esterasas relacionadas con la sinapsis muscarínica y nicotínica, lo que resulta en una toxicidad asociada a altas concentraciones de acetilcolina y la sobreestimulación del receptor (Singh *et al.*, 2015).

1.2.1 Generalidades sobre el temefos

El fosforotionato de O, O, O', O'-tetrametil-o, o'-tio-di-p-fenileno (figura 4), mejor conocido como temefos y comercializado bajo el nombre de Abate®, fue introducido por primera vez en los Estados Unidos en el año de 1965 por American Cyanamid Company para una serie de usos, incluyendo cítricos, collares de mascotas y control de mosquitos. Mas adelante, en agosto de 1981, American Cyanamid abandonó todos los usos excepto el uso de larvicida de mosquitos en aguas no potables. En 1997, el registro técnico de temefos fue transferido a Clarke Mosquito Control Products, Inc. La Agencia ha revocado todas las tolerancias alimentarias para el temefos (US. EPA, 2000).

El temefos es el plaguicida OF que se utiliza en el 52% de los trabajos de fumigación y mundialmente en campañas de salud pública como larvicida para el control de vectores transmisores de enfermedades como *Aedes aegypti*, el cual tiene una gran habilidad de adaptación a las condiciones climáticas y es portador de algunos arbovirus como el dengue, Zika y chikungunya (Melo-Santos, *et al.*, 2010).

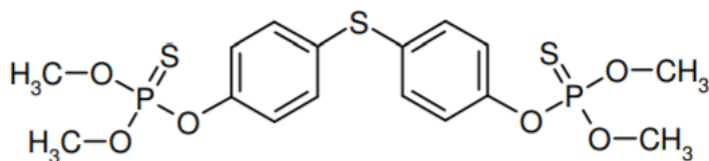


Figura 4. Estructura química del temefos.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda al temefos como insecticida para el control de vectores en concentraciones no superiores a 1 mg/L en agua potable, la cual coincide con la concentración de 20 g de temefos en 200 L de agua potable recomendada por el Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE; NOM-032-SSA2-2014). De acuerdo con la EPA, el temefos es el único OF con uso larvicida (US. EPA, 2001b). Este OF se utiliza en campañas de abatización, depositándolo en tanques o recipientes de agua, y agua cerca de los brotes de mosquitos, además de emplearlo en fumigaciones (George *et al.*, 2015). Hasta la fecha no se cuenta con un biomarcador para la evaluación de su exposición o estudios de exposición al temefos o sus metabolitos en los seres

humanos, lo que limita su evaluación de riesgo en esta especie (Martínez-Mercado *et al.*, 2022), sin embargo, existen propuestas de su vía de biotransformación *in silico* en humanos (Reyes-Chaparro *et al.*, 2020) que abordaremos en las secciones siguientes.

1.2.1.1 Propiedades fisicoquímicas del temefos

El temefos se encuentra en forma de cristales sólidos y tiene un peso molecular de 446.46 g/mol, una presión de vapor de 7.17×10^{-6} Pa a 25 °C, punto de fusión de 30-30.5 °C, solubilidad de 30 µg/L a 25 °C y un coeficiente de partición octanol-agua (K_{ow}) de 80,900 ($\log K_{ow} = 4.91$) (US. EPA, 2001a).

1.2.1.2 Toxicocinética del temefos

Las principales vías de exposición al temefos son la vía oral cuya fuente de exposición es a través de tanques de agua de uso doméstico, la vía inhalatoria cuya fuente de exposición es a través de actividades ocupacionales durante la fabricación y aplicación del temefos, y la vía dérmica (OMS, 2010; EPA, 2000). La administración por vía oral de temefos en un vehículo de aceite de sésamo en un modelo de rata indica que el temefos se absorbe rápidamente, estimando un porcentaje de absorción dérmica de 38%, oral del 40% e inhalatoria del 100% (Blinn, 1969). A pesar de no haber estudios sobre el metabolismo del temefos en humanos, estudios *in silico* sugieren que el temefos requiere una activación metabólica dada por el citocromo (CYP) P450, siendo P2B6, 2C9 y 2C19 las isoformas principales involucradas. También se pueden llevar a cabo reacciones de fase I como s-oxidación, desulfuración oxidativa y desfosforilación además de la formación de metabolitos intermediarios, permitiendo el paso al metabolismo de fase II para su glucoronidación y excreción. Como dato adicional, el metabolismo dependiente de CYP demuestra su capacidad para formar oxones, que probablemente serían los causantes de la toxicidad del temefos en mamíferos (Reyes-Chaparro *et al.*, 2020).

En un estudio reciente se administró una dosis de 300 mg/kg de temefos por vía oral, utilizando como vehículo solución salina y detectando metabolitos como el 4,4'-tiodifenol (TDP), temefos -sulfóxido (Tem-SO), temefos-dioxón-sulfona (Tem-dox-SO₂), temefos-oxón-sulfóxido (Tem-oxón-SO), temefos-oxón (Tem-oxón) y temefos-

sulfona monohidrolizado (Tem-SO₂-OH) (principal metabolito en sangre) tanto en sangre como en tejidos (figura 5). Además, se calcularon los parámetros toxicométricos del temefos en sangre, obteniendo una constante de absorción (k_{abs}) de 1.812 h⁻¹, la vida media de absorción ($t_{1/2\ abs}$) de 0.38 h, una concentración máxima (C_{max}) de 10.4 µg/mL y un tiempo máximo (t_{max}) de 2 h, una constante de eliminación (k_{elim}) de 0.078 h⁻¹ y una vida media de eliminación ($t_{1/2\ elim}$) de 8.6 h, siendo detectado incluso después de 36 h (Verdín-Betancourt *et al.*, 2021). También encontraron que el temefos se distribuye eficientemente en el hígado, riñón y cerebro dentro de las primeras 4 h, y se acumula en el tejido graso después de 36 h (Verdín-Betancourt *et al.*, 2021). Años atrás ya se había descrito que el temefos se distribuye en la grasa, hígado, intestino y riñones, siendo acumulado principalmente en el tejido graso y metabolizándose hacia Tem-SO, TDP, 4,4'-sulfinildifenol (SIDP), and 4,4'-sulfonidifenol (SODP) o bisfenol S (BPS). Mientras que su biotransformación de fase II se trata de reacciones de glucoronidación o sulfatación de sus metabolitos como TDP, SIDP y BPS, lo que facilita su excreción por medio de la orina y las heces (Blinn, 1969).

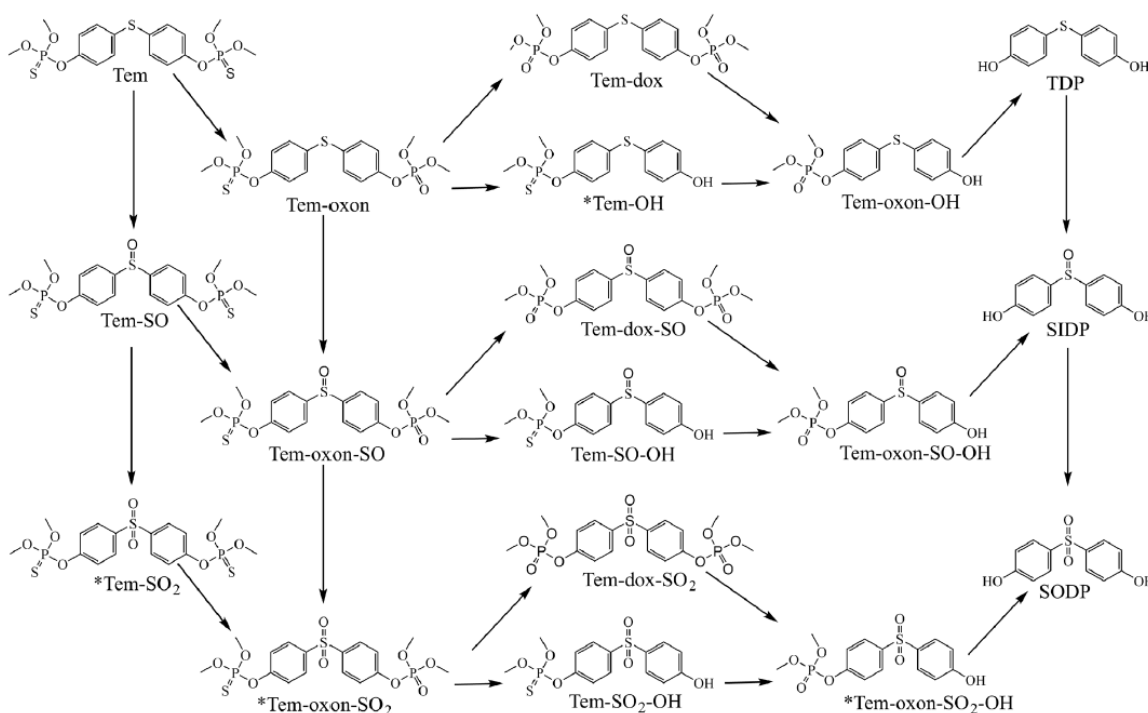


Figura 5. Vía de biotransformación propuesta para el temefos (Verdín-Betancourt *et al.*, 2021).

1.2.1.3 Toxicidad del temefos

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US. EPA, por sus siglas en inglés) indica que el temefos tiene una toxicidad aguda de baja a moderada, comparada con otros insecticidas OF, encontrándose dentro de la clase II para toxicidad aguda oral, con una dosis letal 50 (DL₅₀) de 444 mg/kg por vía oral de acuerdo con estudios de inhibición de la AChE, y está clasificado como productos de uso final ligeramente tóxicos, es decir, en la clase III (US. EPA, 2000). De acuerdo con la OMS, la clasificación del temefos es III, es decir, ligeramente peligroso, con una DL₅₀ superior a los 4000 mg/kg de peso por vía oral de acuerdo con síntomas clínicos de intoxicación (Lewis *et al.*, 2016; OMS, 2011a).

Se ha descrito la DL₅₀ para el temefos en algunas especies. En la rata, los valores de la DL₅₀ del temefos administrado por vía oral se han descrito en un rango de 1,300 a 4,000 mg/kg, en el ratón de 2,062 a 4,700 mg/kg, en conejos de 2,000 a 2,378 mg/kg, y en las aves de 183 a 500 mg/kg, situando a esta especie como la más sensible al larvicida. También se ha descrito que la DL₅₀ del temefos en la rata por la exposición dérmica se encuentra en un rango de 200 a 4,000 mg/kg, siendo más baja que la DL₅₀ por vía oral, mientras que por vía inhalatoria es de 4.79 mg/l (Renshaw y Bobbis, 2006).

Se sabe que uno de los principales mecanismos de toxicidad producidos por los plaguicidas OF es mediante la inhibición de AChE, que, al unirse el OF al sitio activo de la AChE, ésta no será capaz de hidrolizar la acetilcolina, acumulando este neurotransmisor afectando el funcionamiento del impulso nervioso (Main, 1964). Diversos estudios han demostrado que metabolitos del temefos como el Tem-dox-SO₂, entre otros, inhiben potentemente la actividad de la AChE eritrocitaria (Verdín-Betancourt *et al.*, 2019). El metabolito Tem-dox-SO₂ no solo surge por la biotransformación del temefos en el cuerpo, sino que se forma al agregar el temefos al agua clorada, donde es oxidado para formar productos más estables (Kamel *et al.*, 2009). La actividad de la AChE se inhibió hasta en un 67% en 4 h y en un 47% después de 48 h, en exposiciones agudas de temefos (una dosis única de 300 mg/kg) en ratas hembra adultas *Sprague-Dawley*. Por otro lado, después de exposiciones repetidas

(300 mg/kg/día durante 5 días) su actividad puede inhibirse hasta en un 100% después de 48 h (Ferguson *et al.*, 1985). Interesantemente, el tratamiento en ratonas con 15, 150 y 1500 µg/kg de temefos disuelto en aceite de maíz libre de tocoferol no modificó la actividad de la AChE ni de butirilcolinesterasa (BuChE) antes, durante o después del tratamiento (Alfaro-Pedraza *et al.*, 2017). Es posible que las diferencias observadas con relación al efecto sobre la actividad de la AChE dependan de la dosis, especie y temporalidad de la determinación.

Se han realizado algunos estudios de toxicidad del temefos. Un estudio en ratonas evaluó si el temefos a dosis 0.0043 mg/kg y 0.043 mg/kg por vía oral durante el periodo gestacional induce teratogénesis reportando un aumento del peso relativo de los riñones de las madres gestantes, malformaciones esternas en la descendencia y la presencia del temefos en la placenta, incluso después de su metabolización. Sin embargo, los parámetros relativos de la función reproductiva tales como número de implantes, fetos vivos, fetos muertos, viabilidad fetal, peso placentario, peso fetal, entre otros, no se afectaron (Vani *et al.*, 2018). Otro estudio *in vitro* reportó efectos citostáticos en linfocitos humanos, por medio de un disminuido porcentaje de células binucleadas e índice de división celular y un aumento en el número de células apoptóticas. Asimismo, se encontraron efectos genotóxicos, específicamente daño en el ADN de células HepG2 (células de hepatoma), las cuales tienen capacidad metabólica, sugiriendo que algunos metabolitos formados son genotóxicos (Benitez-Trinidad *et al.*, 2015). En un estudio poblacional donde se evaluaron marcadores de exposición se encontró que el 33.3% de la población estudiada se trató de mujeres en edad reproductiva, donde el 71.1% presentó una exposición moderada a plaguicidas y el 21.7% presentó biomarcadores de exposiciones altas (Álvarez, 2016). Sin embargo, aún no se han realizado estudios sobre los efectos del temefos en la fertilidad de las mujeres.

1.2.1.3.1 Toxicidad del temefos en el sistema reproductivo masculino

El tratamiento *in vitro* con temefos 100 µM mostró alteraciones en la motilidad y la cinemática de los espermatozoides, disminuyendo la capacitación de los espermatozoides, los niveles intracelulares de trifosfato de adenosina (ATP), la tasa

de fertilización y el desarrollo embrionario temprano (Kim *et al.*, 2020). En otro estudio realizado por Ramos-Flores y col. (2021) en ratas expuestas a la dosis de temefos recomendada por la OMS (100 mg/kg/día) durante 5-7 días inhibió en un 70% la actividad de la AChE a partir del día 3, mientras que la motilidad espermática disminuye 12.5% a los 5 días y hasta 30% a los 7 días. Además, la viabilidad espermática se redujo 5.7 y 10% a los 5 y 7 días, respectivamente. Adicionalmente, a los 5 días se alteró el desarrollo embrionario y la fertilización de los espermatozoides disminuyó en 30% y la lipoperoxidación se vio aumentada 10% después de 7 días. En otro estudio se determinó que el metabolito SODP, cuya estructura molecular es similar al BPS, disminuye los niveles de testosterona en peces cebra macho (*Danio rerio*) después de tratamientos con 10 y 100 µg/L durante 75 días (Ji *et al.*, 2013). Finalmente, en estudios con sanguijuelas expuestas a 0.005, 0.01, 0.1, 0.15 y 0.2 mg/L de temefos durante 6, 8, 12 y 24 h observaron baja calidad espermática y espermatozoides con el citóforo interrumpido y vacuolado (Singhal y Davis, 1996).

1.2.1.3.2 Toxicidad del temefos en el sistema reproductivo femenino

Se han realizado estudios *in vivo* en distintas especies. En estudios en ratas *Sherman* con tratamientos de 22.5 mg/kg/día de temefos durante 48 días a través del alimento no hubo efectos en el tamaño, viabilidad o daños congénitos en las crías de las camadas, sin embargo, al exponer a las crías a 5.4 mg/kg/día durante 8 semanas y se encontraron malformaciones en el esqueleto y daños viscerales (Gaines *et al.*, 1967). En peces *guppy* (*Poecilia reticulata*), el tratamiento con temefos emulsificado a concentraciones de 0.25, 0.5, 1 y 1.5 ppm en 40 L de agua durante dos meses resultó en una reducción en el desarrollo de los huevos además de partos prematuros (Yasuno *et al.*, 1980). En patos silvestres expuestos a 0.045 y 0.45 mg/kg/día de temefos en el alimento se observó un aumento en el tiempo de eclosión de los huevos (Franson *et al.*, 1963). En caracol (*Lymnaea natalensis*) una concentración de 0.1 g/L de temefos en agua tuvo un efecto ovicida y a 0,04 mg/L retrasó el alcance de la etapa adulta (Edward y Sogbesan, 2007). En sapos (*Bufo melanosticus*) expuestos a 0.0625, 0.125, 0,25, 0.5 y 1 ppm de temefos en el agua se observó una reducción en la supervivencia de los renacuajos de manera dosis dependiente (Harischandra *et al.*,

2012). En estudios en sanguijuelas expuestas a 0.005, 0.01, 0.1, 0.15 y 0.2 mg/L de temefos durante 6, 8, 12 y 24 h se observó una disminución en el número de ovocitos maduros y en el índice de fecundación (Singhal y Davis, 1996). Por último, la exposición al metabolito del temefos SODP provocó una disminución en la producción de huevos y un aumento en el tiempo de eclosión en peces cebrá hembra (*Danio rerio*) (Ji *et al.*, 2013).

En estudios *in vitro* de nuestro laboratorio se ha encontrado que los folículos antrales ováricos cultivados con temefos 10 μ M tienen un crecimiento significativamente menor que en el grupo control, lo que sugiere que el temefos puede tener efectos de alteración endocrina potencial en el ovario (Millán-Mejía *et al.*, 2016). En otro estudio también de nuestro laboratorio se reportó que el tratamiento en ratonas con 15, 150 y 1500 μ g/kg/día de temefos disuelto en aceite de maíz libre de tocoferol no altera el peso corporal ni la ciclicidad estral, sin embargo, disminuyó el número de ovocitos liberados y el número de cigotos de 2 células a las dosis de 150 y 1500 μ g/kg/día, además de encontrar tasas altas de blastómeros fragmentados. Esos resultados llevaron a la conclusión de que la exposición *in vivo* a temefos deteriora la ovulación, la fertilización y la calidad del cigoto (Alfaro-Pedraza *et al.*, 2018). Sin embargo, se desconocen los mecanismos de toxicidad involucrados para causar los citados efectos adversos.

1.3 Justificación

El temefos es el insecticida OF más usado a nivel mundial, siendo aplicado por el 53% de los trabajadores en campañas de salud pública enfocadas a la prevención de enfermedades como dengue, Zika y chikungunya, transmitidas por el mosquito *Aedes aegypti*. Se encuentra dentro de la clasificación III (plaguicidas moderadamente tóxicos) de acuerdo con la OMS, así como en la categoría II para toxicidad aguda oral y dérmica de acuerdo con la US. EPA. Estudios epidemiológicos sugieren que aproximadamente 71% de las mujeres en edad reproductiva presenta una exposición moderada y un 21% presenta una exposición alta a plaguicidas.

Se ha demostrado que el temefos tiene efectos citostáticos, apoptóticos, genotóxicos y teratogénicos. Además, en nuestro laboratorio se ha evaluado su potencial toxicológico en órganos diana como el sistema reproductor femenino, encontrando en estudios *in vitro* que el temefos retrasa el crecimiento de los folículos antrales ováricos y en estudios *in vivo* que reduce el número de ovocitos, el desarrollo del cigoto y la capacidad fértil femenina. No obstante, aún no se establecen los mecanismos por los cuales el temefos altera el proceso ovulatorio en ratones de sexo femenino. Por lo tanto, en el presente trabajo se evaluó si algunos procesos fisiológicos que participan en la ovulación podrían ser potencialmente alterados como consecuencia de la exposición a temefos.

1.4 Hipótesis

La exposición *in vivo* a temefos inducirá toxicidad en el ovario, alterando procesos involucrados en la ovulación como la foliculogénesis y los niveles de hormonas sexuales.

1.5 Objetivo general

Evaluar el efecto de la exposición *in vivo* a temefos sobre la viabilidad de los ovocitos, la foliculogénesis y los niveles de hormonas en ratones hembra.

1.5.1 Objetivos particulares

En ratones hembra expuestos a 0, 15 y 150 µg/kg/día de temefos durante cuatro ciclos estrales:

- Evaluar el número de folículos y de cuerpos lúteos en cortes histológicos.
- Evaluar la viabilidad de los ovocitos.
- Evaluar la comunicación entre el ovocito y las células del cúmulo.
- Determinar los niveles hormonales de estradiol, LH, FSH, testosterona, progesterona y prolactina.
- Evaluar la ciclicidad estral.
- Determinar la actividad de la AChE.

2. Metodología

2.1 Materiales y reactivos

El temefos (pureza de 97.3%) se obtuvo de Chem-Service® (PA, USA), el aceite de maíz libre de tocoferol se obtuvo de MP biomedical (Ilikirch, France). La gonadotropina coriónica equina (eCG) (Novormon 5000) se obtuvo de Procows, Zoetis México (Ciudad de México). El tritón x100, etopropazina, hialuronidasa, floxina B, hematoxilina, eosina Y, Ioduro de propidio, Hoechst 44432, glicerol, dimetil sulfóxido (DMSO) y sigmacote® se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). El ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), yoduro de acetiltiocolina, formaldehido, etanol, xilol, sulfato de aluminio, potasio dodecahidratado y ácido acético glacial se obtuvieron de JT Baker (PA, USA). El agua destilada se obtuvo de Argentopura (Cuauhtémoc, Ciudad de México). El medio α mínimo esencial (MEM- α) Advanced MEM (1X) fue obtenido de Gibco (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). El vectashield® se obtuvo de Laboratorios Vector (Burlingame, CA, USA). La calceína-AM (39, 69-Di (O acetil)- 29, 79 [N, N-bis (carboximetil) amino-metil]-fluoresceína, tetraacetoxi metil éster) se obtuvo de Molecular probes (Eugene, OR, USA). El óxido de mercurio fue obtenido de Fermont (Monterrey, Nvo. León).

2.2 Estrategia experimental

Se obtuvieron ratones hembra CD1 de cuatro semanas de edad de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV-IPN. Los animales tuvieron acceso al alimento y agua de bebida *ad libitum* y fueron sometidos a procedimientos experimentales de acuerdo con los lineamientos internacionales para el uso y cuidado de animales de laboratorio, conforme al protocolo No. 047-15 aprobado por el Comité de Investigación para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del CINVESTAV-IPN (CICUAL). Se formaron dos grupos de experimentación conformados por tres subgrupos cada uno. Cada subgrupo contó con cinco animales seleccionados de forma aleatoria (Figura 6).

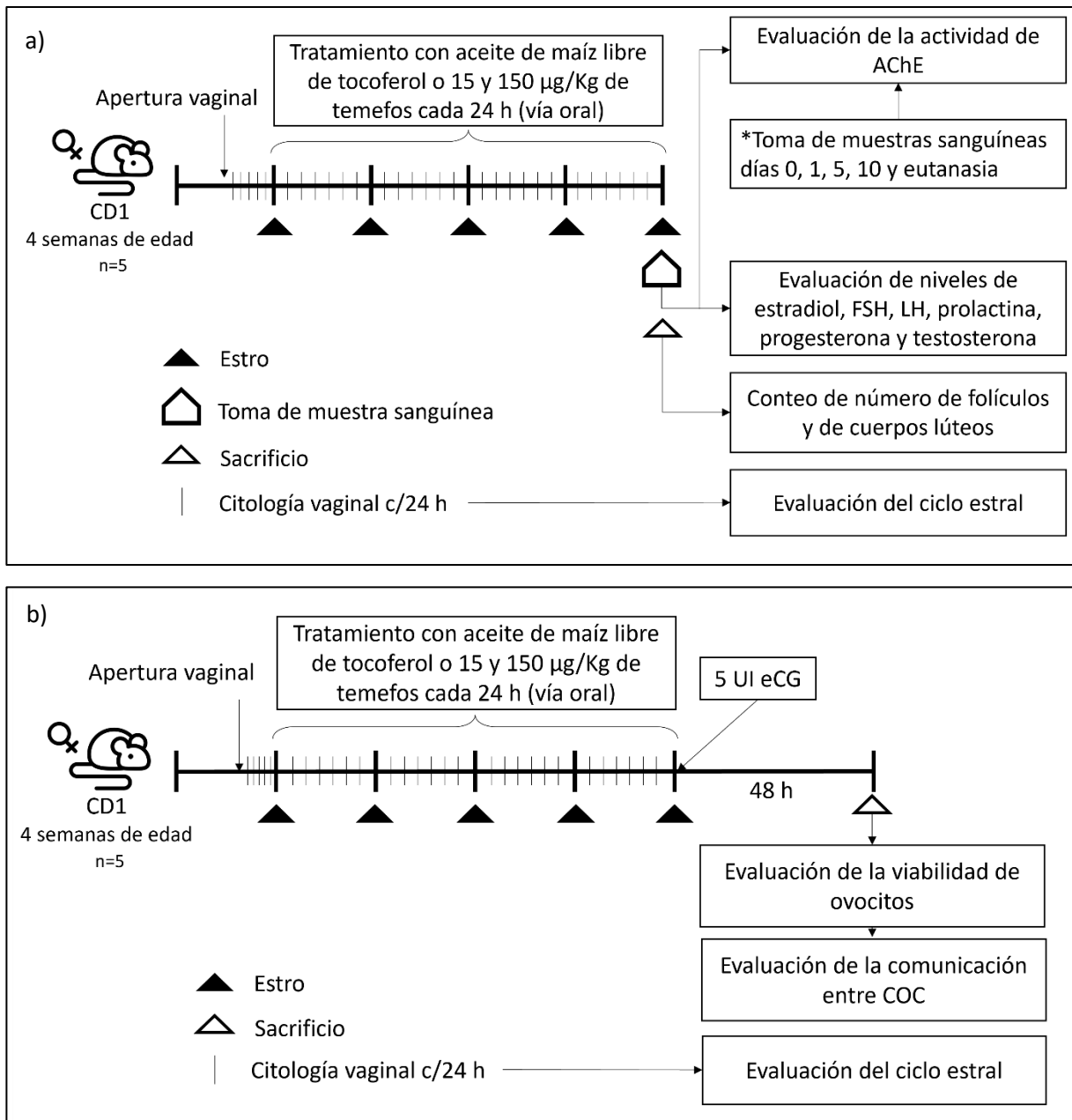


Figura 6. Estrategia experimental. a) Tratamiento para evaluar la foliculogénesis, ovulación, actividad de la AChE y niveles hormonales. b) Tratamiento para evaluar la viabilidad de los ovocitos. FSH: Hormona folículo estimulante; LH: Hormona luteinizante. AChE: Acetilcolinesterasa; eCG: gonadotropina coriónica equina; COC: células del cúmulo-ovocito.

En el primer grupo se monitoreó diariamente la apertura vaginal y, una vez observada, se realizaron citologías vaginales cada 24 horas para evaluar la ciclicidad estral; una vez presentado el primer estro, las ratonas fueron dosificadas con aceite de maíz libre de tocoferol (control), 15 ó 150 µg/kg/día de temefos por vía oral por deposición en la boca (volumen máximo de 20 µL) durante cuatro ciclos estrales. Estas dosis se

obtuvieron a partir de un estudio realizado en ratas que recibieron 5.4 mg/kg/día de temefos por vía oral y mostraron efectos teratogénicos en las crías. Por lo que se calculó la proporción de la DL₅₀ de rata equivalente a 5.4 mg/kg/día y tomando esa misma proporción para la DL₅₀ del ratón, obteniendo una dosis de 1.5 mg/kg por día. Sin embargo, esta dosis causó efectos muy severos, por lo que se decidió disminuir las dosis a 150 y 15 µg/kg/día (McNerney *et al.*, 1968; OMS, 2011b; Alfaro-Pedraza, 2017). Se les tomaron muestras sanguíneas al día 0 (antes de comenzar la exposición), día 1, 5 y 10 por medio de punción de la cola. El día del sacrificio se realizó punción cardiaca y posteriormente se colectaron los ovarios para evaluar la foliculogénesis y la ovulación. El segundo grupo recibió las mismas dosis de exposición indicadas para el primer grupo; al finalizar el tratamiento estas hembras fueron administradas con 5 UI de eCG vía *i.p.* y sacrificadas a las 48 horas posteriores para colectar los ovocitos y evaluar su viabilidad.

2.3 Actividad de la AChE

2.3.1 Principio

La AChE se evaluó por medio del método Ellman, donde se utiliza yoduro de acetilcolina para generar tiocolina por acción de la AChE, y esta reacciona con un cromóforo como DNTB para generar un compuesto color amarillo llamado ácido 5-tio-2-nitrobenzoico y finalmente se mide la absorbancia de la muestra a 436 nm en un espectrofotómetro (Ellman *et al.*, 1961).

2.3.2 Procedimiento

Se tomaron muestras sanguíneas a partir de la vena cava de la cola a los días 0, 1, 5, 10 y sacrificio, estas muestras se diluyeron 1:1000 con el reactivo de hemólisis Tritón x-100 al 0.03% preparado con buffer de fosfatos para obtener un volumen final de 1 mL. Este volumen se agregó a la mezcla de reacción, compuesta por 1 mL de buffer de fosfatos 0.1 M (pH= 7.4), 50 µL de DNTB 10 mM preparado con buffer de fosfatos y 5 µL de etopropazina 6 mM (inhibidor de la actividad de BuChE) preparada con HCl 12 mM. Esta mezcla se incubó durante 10 min a 37°C, después se agregaron 25 µL

de yoduro de acetiltiocolina 28.4 mM e inmediatamente se monitoreó la absorbancia a una longitud de onda de 436 nm cada minuto durante 3 min mediante un espectrofotómetro *Spectronic Genesys 10Bio* de Thermo Scientific (Wisconsin, USA). La actividad enzimática de AChE se corrigió por el contenido de Hb y se reportó como U/g Hb, esto permite expresar el valor de la AChE con mayor precisión y así descartar la variable del tamaño de muestra como consecuencia de un cambio en la cantidad de eritrocitos (Rendón-von Osten *et al.*, 2004).

2.4 Obtención de complejos ovocito-célula del cúmulo

2.4.1 Principio

La gonadotropina exógena eCG tiene propiedades similares a la FSH, promoviendo el crecimiento y desarrollo de los folículos antrales hacia folículos preovulatorios, los cuales poseen al ovocito-células del cúmulo (COC) que puede aislarse a través de la punción mecánica del folículo con pinzas ultrafinas (Gardner y Lane, 2004).

2.4.2 Procedimiento

En el grupo de experimentación 2, después del tratamiento con temefos o aceite de maíz libre de tocoferol, las ratonas se administraron con 5 UI de eCG vía *i.p.* durante el estro; 48 horas después se realizó la eutanasia mediante dislocación cervical, extrayendo el complejo ovario-oviducto y retirando la grasa e irrigaciones venosas. Posteriormente se extrajeron los COC pinchando el ovario para la evaluación de la viabilidad y la comunicación entre uniones Gap de los COC.

2.5 Niveles hormonales

2.5.1 Principio

Los niveles hormonales se evaluarán empleando el ensayo de electroquimioluminiscencia (ECL) que es una técnica que mezcla la electroquímica como fuente de excitación y la espectrofotometría como técnica de detección (Núñez-Bajo y Fernández, 2020). Se trata de un análisis clínico con alta sensibilidad y selectividad, donde surge una emisión de luz a partir de especies generadas en los

electrodos que experimentan reacciones de transferencia de electrones para formar estados excitados que emiten luz (Richter, 2008).

2.5.2 Procedimiento

Se evaluaron los niveles de estradiol, FSH, LH, testosterona, progesterona y prolactina después de la exposición a temefos y a aceite de maíz libre de tocoferol (control) por medio de la recolección de muestras sanguíneas por punción cardiaca durante el diestro y se solicitó su evaluación por servicio en los “Laboratorios Especializados en la salud” por medio de ECL en el equipo COBAS e 411.

2.6 Ciclo estral

2.6.1 Principio

El ciclo estral en roedores se evalúa mediante citología vaginal; en el proestro (maduración folicular y preovulatoria) se pueden observar células epiteliales nucleadas de manera individual o en hojas, así como un número viable de leucocitos. En el estro (ovulación) se observan células planas cornificadas y pocos leucocitos. En el metaestro (fase luteogénica) se observa la filtración de leucocitos, células cornificadas y pequeñas células epiteliales nucleadas. Por último, en el diestro (fase luteogénica y crecimiento folicular) se observan abundantes leucocitos y células epiteliales nucleadas (Cooper *et al.*, 1992; McLean *et al.*, 2012).

2.6.2 Procedimiento

Se tomaron muestras diarias por medio de lavados vaginales para evaluar por microscopía óptica la etapa del ciclo estral en el que se encuentran las ratonas. El procedimiento consiste en la introducción de solución salina en la vagina con la punta de una pipeta de transferencia, posteriormente, la solución salina obtenida se depositó en un portaobjetos y se observó en un microscopio Olympus BX61 (Olympus, Tokio, Japón) a 10x para identificar la etapa del ciclo estral de acuerdo con las características.

Las muestras se clasificaron según las células observadas: células epiteliales nucleadas y un número viable de leucocitos (proestro), células planas cornificadas (estro), leucocitos, células cornificadas y pequeñas células epiteliales nucleadas (metaestro) y abundantes leucocitos y algunas células epiteliales nucleadas (diestros) (figura 7) (Cooper *et al.*, 1992; McLean *et al.*, 2012).

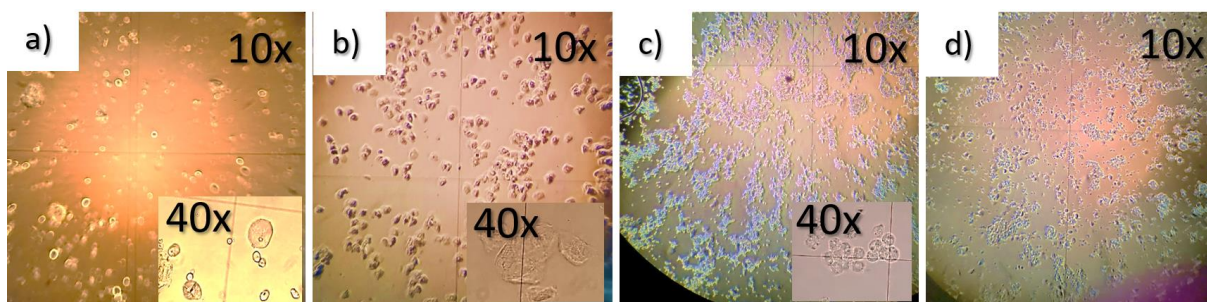


Figura 7. Imágenes representativas de frotis vaginales de ratonas tratadas. a) Proestro; células epiteliales nucleadas y leucocitos; b) Estro: células planas cornificadas; c) Diestro: abundantes leucocitos y algunas células epiteliales nucleadas; D) Metaestro: leucocitos, células cornificadas y pequeñas células epiteliales nucleadas.

2.7 Foliculogénesis y ovulación

2.7.1 Principio

La foliculogénesis se evaluó por medio del conteo de folículos primordiales, primarios, preantrales y antrales, mientras que la ovulación se evaluó por medio del conteo de cuerpos lúteos, ambos en cortes histológicos de ovario. Esta técnica se basa en seleccionar secciones del ovario y fijarlas en parafina para obtener imágenes del tejido (Cormack, 1987). Los cortes pueden ser teñidos con colorantes ácidos y básicos para dar un contraste de colores que permita diferenciar los tejidos, un ejemplo es la hematoxilina, que es un colorante básico que tiñe de color morado los componentes celulares de naturaleza ácida, mientras que la eosina es un colorante ácido que tiñe de rosa los componentes celulares básicos.

2.7.2 Procedimiento

Se obtuvo el ovario izquierdo de cada ratón y se fijó en una solución dietricks (250 ml de formaldehído al 40%, 712.5 ml de etanol al 100%, 1537.5 ml de H₂O y 50 ml de ácido acético glacial) durante al menos 72 h hasta su evaluación. Primeramente, se

realizaron algunos pasos de deshidratación de los tejidos (etanol al 70% 1 h, etanol al 96% por una h dos veces y etanol al 100% por una h dos veces, etanol-xilol (v:v) por una h dos veces) y diafanización (xilol 100% por una h dos veces); una vez que el ovario se observó translúcido, se sumerge en parafina para su solidificación (90 min en parafina y dos h en otro contenedor con parafina a 58-60 °C). Después, el ovario se colocó en un molde metálico para montar el tejido en el caset, se vertió parafina y se dejó solidificar para realizar los cortes. Posteriormente los ovarios se cortaron en secciones consecutivas de 8 μ m con ayuda de un microtomo (Yidi-2235, Jinhua Yidi Medical Appliance Co., LTD, China), las cuales se montaron sobre portaobjetos y se incubaron a 60 °C durante dos días para desparafinarlas. A continuación, las muestras se tiñeron con hematoxilina y eosina-floxina B conforme al procedimiento especificado en la tabla 1 y después del paso 22 se les colocó una gota de resina para fijar las muestras con un cubreobjetos y dejarla secar hasta su evaluación.

Finalmente se contaron las poblaciones de folículos en cada una de las secciones, específicamente los folículos primordiales, primarios, preantrales y antrales, según su apariencia morfológica que se describe a continuación. Los folículos primordiales son aquellos rodeados de una capa (puede ser incompleta) de células de la granulosa de forma aplanada o cúbica, los folículos primarios son aquellos rodeados de células de la granulosa de forma cúbica y que cuenten con menos de dos capas de estas, los folículos secundarios aquellos que tenían dos o más capas de células de la granulosa sin espacio antral y los folículos antrales tenían el espacio antral o antro. Sólo se tomaron en cuenta los folículos que contenían ovocitos con un núcleo visible y los folículos contados por ovario se multiplicaron por 10 para estimar el número total de folículos.

También se observaron y contabilizaron los cuerpos lúteos en función de su apariencia morfológica, evitando el doble conteo de un cuerpo lúteo siguiéndolos individualmente a lo largo de todos los cortes histológicos. Todos los cortes se analizaron sin el conocimiento del tratamiento al que fueron expuestos.

Tabla 1. Tinción con hematoxilina y eosina.

1. Xilol I	5 min	12. Solución de Scott	10 seg
2. xilol II	5 min	13. Agua corriente	1 min
3. Etanol absoluto I	1 min	14. Etanol 80%	1 min
4. Etanol absoluto II	1 min	15. Eosina-Floxina B	30 seg
5. Etanol 96% I	1 min	16. Etanol 96% I	1 min
6. Etanol 96% II	1 min	17. Etanol 96% II	
7. Agua corriente	1 min	18. Etanol absoluto I	1 min
8. Hematoxilina de Harris	7 min	19. Etanol absoluto II	1 min
9. Agua corriente	1 min	20. Xilol-Etanol absoluto	1 min
10. Etanol-Acido (v:v)	30 seg	21. Xilol I	1 min
11. Agua corriente	1 min	22. Xilol II	1 min

-Hematoxilina de Harris: 100 gr de sulfato de aluminio y potasio dodecahidratado (alumbre de potasio) por cada 5 gr de hematoxilina, 2.5 gr de óxido de mercurio, disueltos en 1 L de agua destilada. Antes de utilizarse se le agregó ácido acético glacial para llegar a una dilución al 4% y de 5 mL etanol absoluto.

-Alcohol ácido: alcohol absoluto y ácido clorhídrico al 1%.

-Solución de Scott: 1.2 gr de bicarbonato de sodio y 12 gr de sulfato de magnesio, disueltos en 600 mL de agua destilada.

-Eosina-floxina B: 50 mL de solución stock de eosina (1 gr disuelto en 100 mL de agua destilada), 5 mL de solución stock de floxina B (1 gr disuelto en 100 mL de agua destilada), 390 mL de etanol al 95% y 4 mL de ácido acético glacial (agregar este último compuesto antes de comenzar a utilizar esta solución de trabajo).

2.8 Viabilidad de los ovocitos

2.8.1 Principio

La viabilidad celular se define como la identificación de células vivas o muertas en una muestra total. Uno de los métodos más directos para cuantificar la viabilidad celular es la medición de cambios en la permeabilidad de la membrana con colorantes fluorescentes. El ensayo de tinción diferencial (DNS) propuesto para esta metodología utiliza dos intercaladores de ADN fluorescente, Hoechst 44432 e ioduro de propidio (IP). El hoechst atraviesa fácilmente las membranas plasmáticas uniéndose a pares de base A-T para teñir el ADN de las células vivas, por el contrario, la membrana de las células muertas pierde la capacidad de permeabilidad selectiva, permitiendo el

paso del IP intercalándolo entre las bases de ADN y ARN, marcando únicamente las células muertas (Lema *et al.*, 2011).

2.8.2 Procedimiento

Pasadas 48 horas desde la estimulación de las ratonas con eCG, los animales se sometieron a eutanasia por medio de dislocación cervical y se procedió a extraer el complejo ovario-oviducto en MEM- α . Posteriormente se pincharon los ovarios con pinzas nº 5 para obtener los COC, los cuales se colocaron en portaobjetos excavados cubiertos con sigmacote® que contenían 50 μ L de hialuronidasa al 1% durante 12 min, realizando pipeteos vigorosos y constantes para retirar las células de la cúmula de los ovocitos. En caso de que las células de la cúmula no hubieran sido retiradas en su totalidad, se pasaban los COC a medio libre de hialuronidasa y se manipulaban con la punta de una aguja de insulina o con unas pinzas nº 5. Una vez liberados los ovocitos se aspiraron con una pipeta para ovocitos y se lavaron dos veces con MEM- α . Posteriormente se incubaron los ovocitos en IP (10 μ g/mL) durante 10 min, al finalizar los ovocitos se lavaron dos veces con MEM- α y se procedió a la segunda incubación con Hoechst 33342 (10 μ g/mL) en 90% de glicerol durante 10 min. Los ovocitos sin lavar se montaron en una gota de 10 μ L de glicerol-PBS (v:v) con 3 μ L de vectashield®. Sobre la muestra se colocó un cubreobjetos al que previamente se le colocó una capa delgada de esmalte para uñas en las orillas y se recubrieron las orillas de la muestra con esmalte para evitar que la muestra se deshidratara. La muestra se protegió de la luz y se observó en el microscopio de fluorescencia (Olympus BX61, Tokio, Japón).

2.9 Ensayo de comunicación entre uniones Gap en los COC

2.9.1 Principio

La comunicación entre los COC por medio de las uniones Gap se evaluó utilizando calceína-AM, el cual es un compuesto no fluorescente, que al separarse del acetoximetil (AM) por esterasas intracelulares inespecíficas produce una fluorescencia (Centro Nacional de Información Biotecnológica, 2021). La transferencia del acetoximetil (AM) desde las células del cúmulo al ovocito para evaluar la comunicación

intercelular de uniones Gap se observa mediante microscopía de fluorescencia (Domínguez *et al.*, 2019).

2.9.2 Procedimiento

Después de obtener los COC se utilizó el método propuesto por Sasseville' *et al.* (2009), donde 10-15 COC se tomaron por cada determinación, se lavaron 2 veces con 100 μ L de MEM- α libre de rojo de fenol y posteriormente se incubaron en 100 μ L de calceína-AM (50 μ g de calceína-AM en 950 μ L de DMSO) durante 15 min. Pasado este tiempo se pasaron a un medio libre de calceína-AM y de rojo de fenol, donde se incubaron durante 25 min para permitir el intercambio de tinte entre las células del cúmulo y el ovocito. Finalmente, los COC se lavaron para eliminar la calceína-AM restante, se desnudaron con ayuda de una aguja de insulina y se observaron bajo el microscopio de fluorescencia (Olympus BX61, Tokio, Japón).

2.10 Análisis estadístico

Para analizar las diferencias entre la viabilidad del ovocito, foliculogénesis, niveles hormonales y actividad de AChE entre el grupo control y los grupos expuestos, se realizó una prueba de normalidad de Kolmogórov-Smirnov y bajo una distribución normal se realizó la prueba de ANOVA de una/dos vías (dependiendo de los datos) seguido de una prueba *post-hoc* de Turkey. Bajo una distribución no normal, se realizó la prueba Kruskal-Wallis seguido de una prueba *post-hoc* de Dunnet. Los resultados se presentan como la media \pm error estándar (EE), considerando un valor p menor a 0.05 como significativo. Los análisis estadísticos y graficas se realizaron con el software estadístico Graphpad Prisma versión 8.

3. Resultados

3.1 Ganancia de peso corporal durante la exposición a temefos

Se evaluó la ganancia de peso corporal de los animales a través del registro del peso en gramos cada tres días. Los resultados obtenidos (figura 8) mostraron que, aunque todos los grupos tuvieron un aumento de peso en el transcurso de los días, y se observó una tendencia de mayor aumento de peso en el grupo tratado con 150 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ de temefos, no hubo diferencias significativas en el aumento de peso entre los grupos. Esto indica que el temefos no altera la ganancia de peso corporal en las dosis y el tiempo de exposición evaluados.

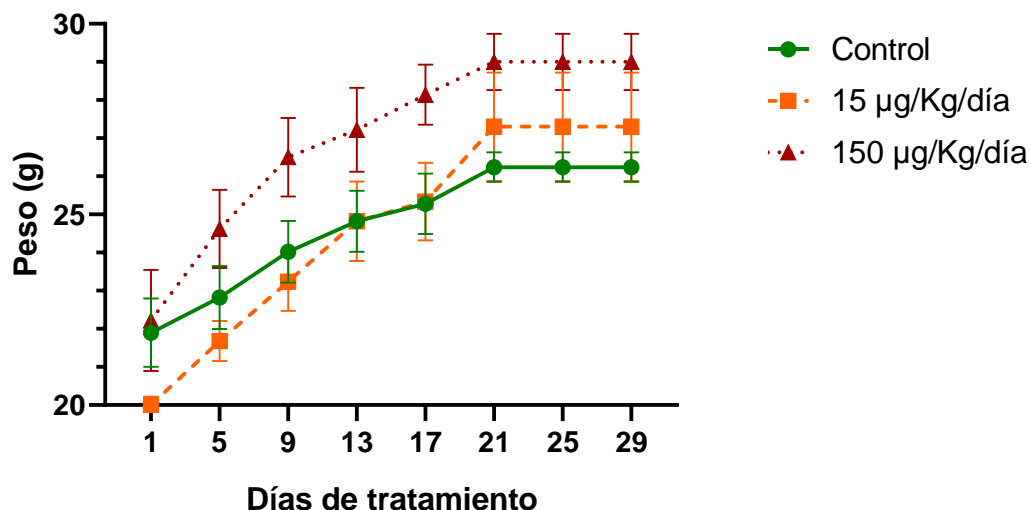


Figura 8. Ganancia de peso corporal durante el tratamiento con aceite de maíz libre de tocoferol o temefos por cuatro ciclos estrales. Los datos representan la media \pm EE (n= 5 animales por grupo). No se observaron diferencias significativas (ANOVA de dos vías, post hoc Turkey).

3.2 Actividad de la acetilcolinesterasa durante la exposición a temefos

Se evaluó la actividad enzimática de AChE como parámetro de toxicidad general, por medio del método Ellman (1961), seguido de una corrección por la cantidad de hemoglobina (Hb) presente en cada muestra, reportando la actividad de AChE como U/g de Hb. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 9, se observó un aumento significativo en la actividad de AChE en el grupo control a los días 1 y 5 del

tratamiento. Además, el grupo tratado con 150 µg/kg/día de temefos durante cuatro ciclos estrales tuvo una disminución significativa de 59.8% con respecto al grupo control al día 1 de tratamiento.

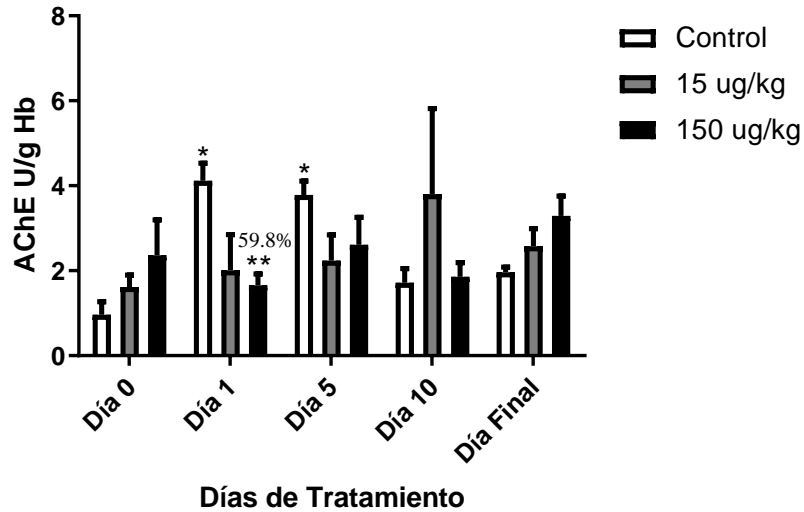


Figura 9. Actividad de AChE corregida por Hb durante el tratamiento con aceite de maíz libre de tocoferol o temefos por 4 ciclos estrales. Los datos representan la media \pm EE (n= 5 animales por grupo). * $p > 0.05$ día 1 vs día 0 ** $p > 0.05$ control vs 150 µg/kg de acuerdo con una prueba de normalidad de Kolmogórov-Smirnov, seguido de un análisis de varianza (ANOVA de dos vías) y una prueba de comparación múltiple de Turkey.

3.3 Niveles hormonales después de la exposición a temefos

Al terminar el tratamiento con el aceite de maíz (control) o las dos distintas dosis de temefos, se realizaron citologías vaginales para identificar el primer diestro que se presentaba y realizar el sacrificio de los animales. Después de la eutanasia se obtuvieron muestras sanguíneas por punción cardiaca y se evaluaron los niveles hormonales. Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas en los niveles hormonales de FSH, LH, E2, progesterona, prolactina o testosterona total (figura 10).

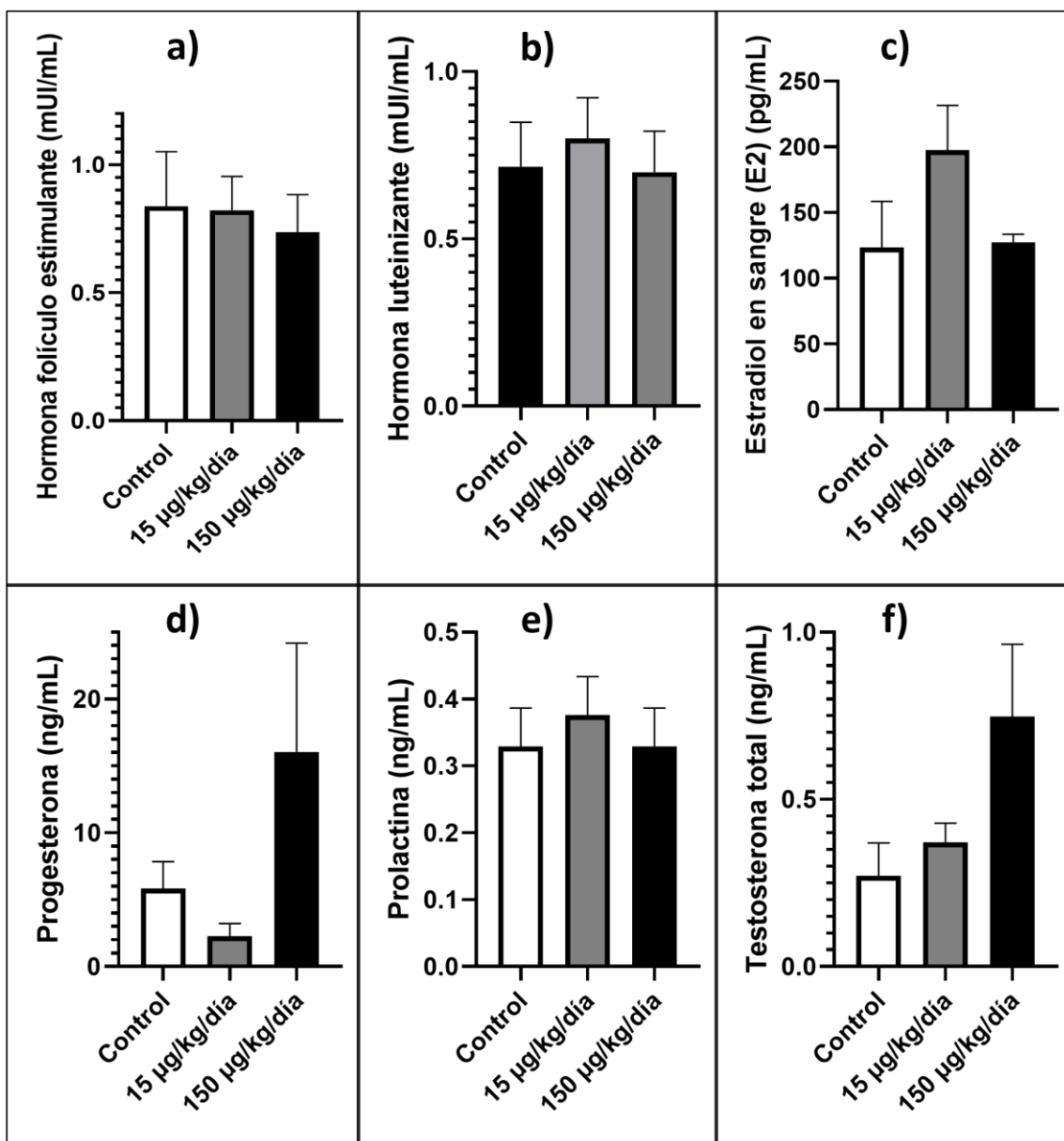


Figura 10. Niveles hormonales de estrógenos y gonadotropinas. a) Hormona folículo estimulante; b) Hormona luteinizante; c) Estradiol en sangre (E2); d) Progesterona; e) Prolactina; f) Testosterona total. Los datos representan la media \pm EE (n= 5 animales por grupo). Los datos de FSH, LH y prolactina presentaron una distribución no normal y se evaluaron con la prueba estadística Kruskal-Wallis seguido de una prueba de comparación múltiple de Dunnet. Los datos de estradiol en sangre (E2), progesterona y testosterona total presentaron distribución normal y se analizaron por medio de una ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparación múltiple de Turkey. No se observaron diferencias significativas.

3.4 Ciclicidad estral durante la exposición a temefos

El número de días en los cuales las hembras se encontraban en cada fase del ciclo estral se evaluó para establecer el posible efecto del temefos sobre el ciclo

reproductivo. Los grupos de tratamiento no mostraron diferencias significativas en los días que los ratonas estuvieron en cada etapa del ciclo estral (figura 11). Sin embargo, se observó una aparente tendencia positiva dependiente de la dosis en los días en que las ratonas estaban en metaestro, por lo que se realizó una prueba de regresión lineal obteniendo un valor p de 0.5304, indicando que los días en que las ratonas se encontraban en metaestro no era dosis dependiente (figura 12). Estos resultados sugieren que el temefos no afecta la ciclicidad estral.

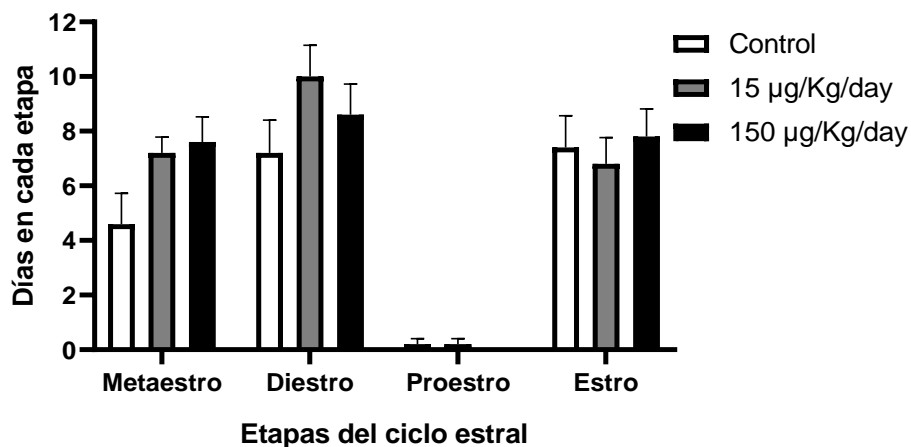


Figura 11. Días de duración entre fases del ciclo estral durante el tratamiento con aceite de maíz libre de tocoferol o temefos por 4 ciclos estrales. Los datos representan la media \pm EE (n= 5 animales por grupo). No se observan diferencias significativas conforme a una prueba de normalidad de Kolmogórov-Smirnov, seguido de un análisis de varianza (ANOVA de dos vías) y una prueba de comparación múltiple de Turkey.

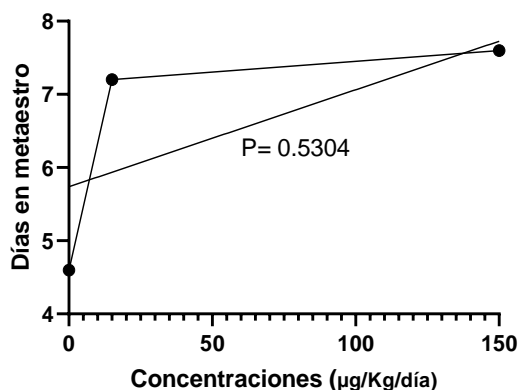


Figura 12. Prueba de tendencia para los días en que las ratonas se encontraban en metaestro. Los datos representan la media \pm EE (n= 5 animales por grupo).

3.5 Número de folículos y cuerpos lúteos después de la exposición a temefos

Después del tratamiento con aceite de maíz libre de tocoferol o temefos (15 y 150 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$) durante cuatro ciclos estrales, se realizó el conteo de las poblaciones de folículos y el número de cuerpos lúteos en cortes histológicos para evaluar la foliculogénesis y ovulación, respectivamente. La figura 13 representa la población folicular presente en las muestras y se observa que no se alteró el desarrollo de los folículos primordiales, primarios o secundarios. Sin embargo, la dosis de 15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ de temefos tuvo como consecuencia el aumento de 73% en el número de folículos antrales.

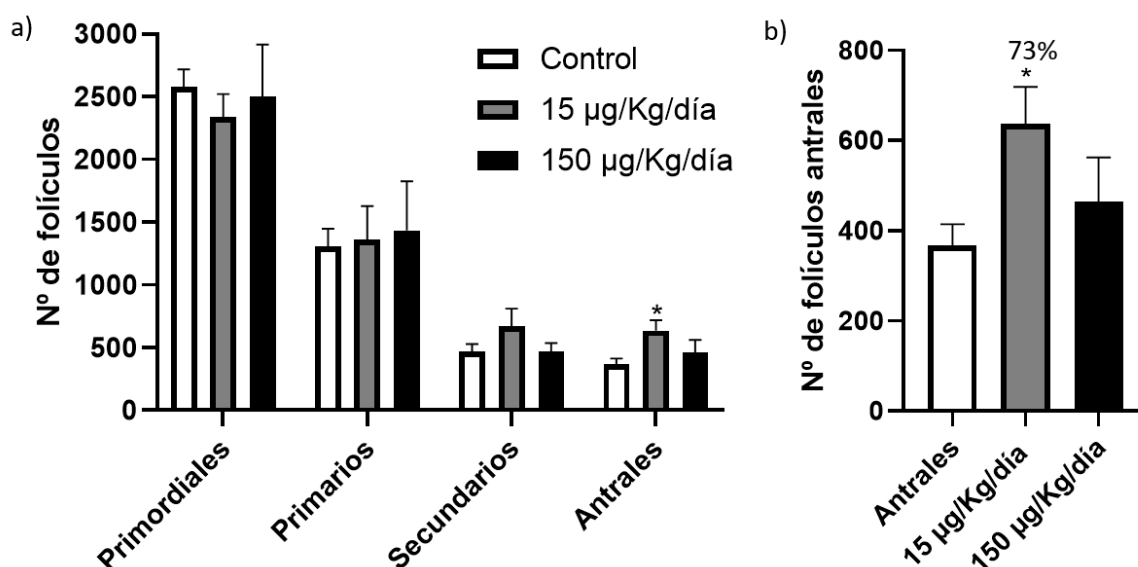


Figura 13. Conteo folicular en ratones hembra después del tratamiento con aceite de maíz libre de tocoferol o temefos durante cuatro ciclos estrales; a) conteo de las poblaciones de folículos; b) conteo de folículos antrales. Los datos representan la media \pm EE ($n=5$ animales por grupo). * $p > 0.05$ de acuerdo a una prueba de normalidad de Kolmogórov-Smirnov, seguido de un análisis de varianza (ANOVA de dos vías) y una prueba de comparación múltiple de Turkey.

En los mismos cortes histológicos realizamos el conteo de cuerpos lúteos (figura 14) y no se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y los tratados con las dos distintas dosis de temefos utilizadas, lo que sugiere que el temefos no altera la ovulación.

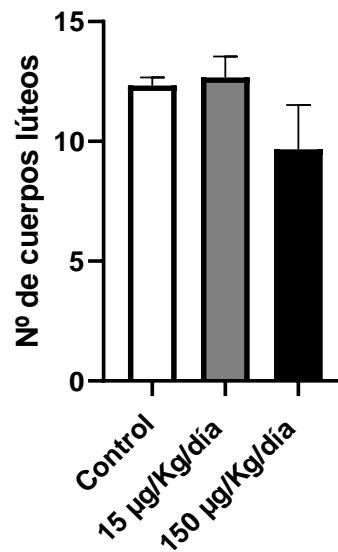


Figura 14. Número de cuerpos lúteos en ratones hembra después del tratamiento con aceite de maíz libre de tocoferol o temefos durante cuatro ciclos estrales. Los datos representan la media \pm EE (n= 3 animales por grupo). (ANOVA de una vía, post hoc Turkey).

3.6 Viabilidad de los ovocitos después de la exposición a temefos

La evaluación de la viabilidad se realizó mediante la incubación con IP, el cual tiñe los ovocitos no viables de color rojo y Hoechst 33342 que tiñe los ovocitos viables de color azul. Después del tratamiento con aceite de maíz libre de tocoferol o temefos (15 y 150 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$) durante 4 ciclos estrales, se administraron 5 UI de eCG para estimular el crecimiento de los folículos y 48 horas después sometimos a las ratonas a eutanasia para obtener los COC. No se observaron diferencias significativas en la viabilidad de los ovocitos de hembras tratadas con temefos (figura 15), lo que podría indicar que las dosis utilizadas no son citotóxicas.

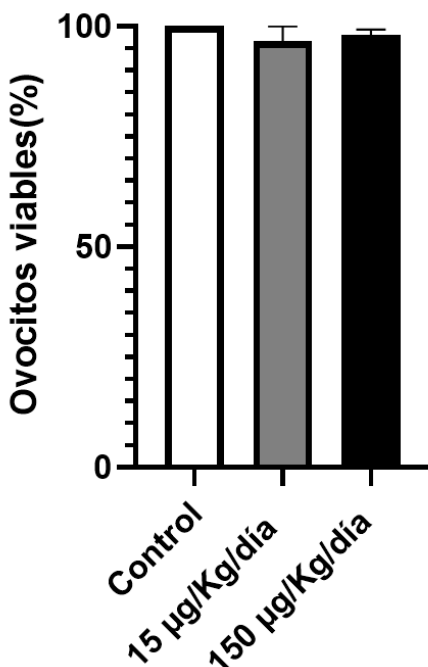


Figura 15. Porcentaje de ovocitos viables después del tratamiento con aceite de maíz libre de tocoferol o temefos durante 4 ciclos estrales. Los datos representan la media \pm EE (n= 5 animales por grupo [48, 50 y 51 ovocitos por animal]). No se observan diferencias significativas (Kruskal-Wallis, post hoc Dunnet).

3.6.1 Comunicación entre las uniones del COC después de la exposición a temefos

Se evaluó la comunicación de las células del cúmulo hacia el ovocito por medio de uniones Gap (figura 16). En los COC obtenidos del grupo tratado con 15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ de temefos durante cuatro ciclos estrales se observó una reducción de 75% en la intensidad de la fluorescencia y, contrario a lo esperado, el grupo tratado con 150 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ de temefos durante cuatro ciclos estrales tuvo una intensidad de la fluorescencia significativamente mayor respecto al grupo tratado con 15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ de temefos (figura 16a). Interesantemente, en el grupo tratado con 150 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ de temefos se observaron anomalías citoplasmáticas como vacuolas e inclusiones citoplasmáticas (figura 16b). Los resultados sugieren que la dosis de 15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ de temefos causa el cierre prematuro de las uniones Gap entre el ovocito y las células del cúmulo.

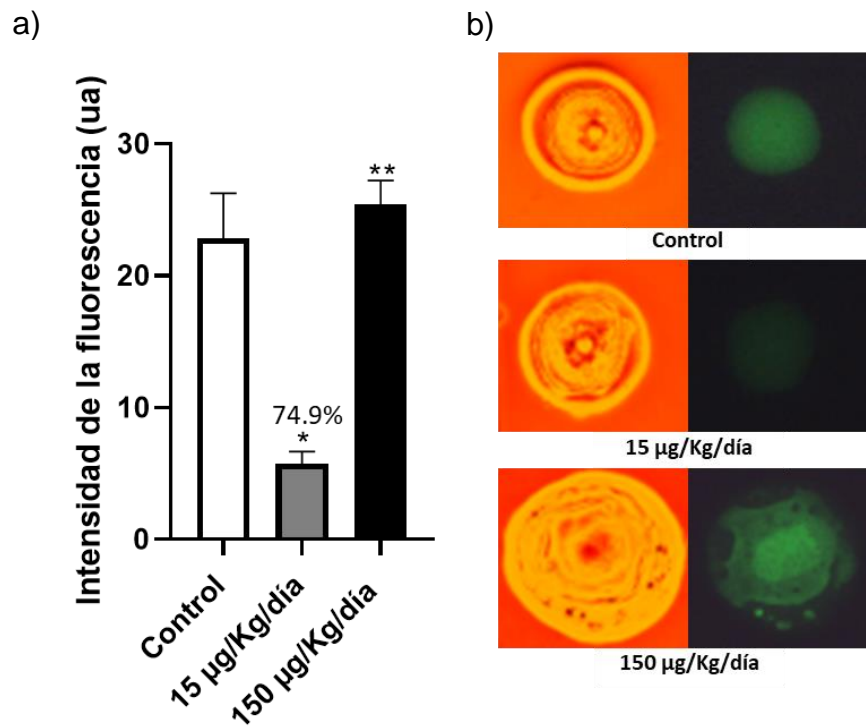


Figura 16. Fluorescencia de calceína-AM en ovocitos después del tratamiento. a) Intensidad de la fluorescencia de calceína-AM; b) Imágenes representativas de ovocitos teñidos con calceína-AM obtenidos después del tratamiento con aceite de maíz libre de tocoferol o temefos durante 4 ciclos estrales. Los datos representan la media \pm EE (n=5 animales por grupo [47 ovocitos por animal]). * $p < 0.0001$ Control vs 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$; ** $p < 0.0001$ 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ vs 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Kruskal-Wallis, post hoc Dunnet).

4. Discusión

4.1 Efecto del temefos sobre la ganancia de peso corporal

Nuestros resultados mostraron que la ganancia de peso corporal de los animales fue similar entre el grupo control y los tratados con temefos. Nuestros resultados concuerdan con los de Alfaro-Pedraza (2017) quien observó que la exposición al temefos no altera la ganancia de peso corporal bajo el mismo esquema de exposición. Por el contrario, el tratamiento con otros OF como el fosfamidón a dosis de 2.6, 3.9, y 5.2 mg/kg/día por 30 días redujo significativamente el aumento de peso corporal de los ratones albinos suizos (Sreelakshmi y Kaliwal, 2007), mientras que el tratamiento con 0.1 y 2.5 mg/kg de clorpirifos mediante intubación en ratas *Wistar* durante ocho semanas no alteró significativamente el peso corporal final, ni el aumento de peso corporal neto (Nishi y Hundal, 2013). Es posible que las dosis de temefos utilizadas en nuestro estudio no causen toxicidad general, sin embargo, se requieren estudios adicionales para comprobar esta hipótesis.

4.2 Efecto del temefos sobre la actividad de la AChE

Se evaluó la actividad de la AChE a los días 0, 1, 5, 10 y el día de la eutanasia y se reportó como U/g de Hb. Este parámetro se evaluó anteriormente en el laboratorio bajo el mismo esquema de exposición, sin embargo, al no encontrar diferencias significativas en la actividad de la AChE a los días 0, 14 y 21 (Alfaro-Pedraza, 2017) se propuso evaluar este parámetro en periodos más cortos de tiempo. Sorprendentemente, los animales del grupo control tuvieron un aumento significativo en la actividad de la AChE al día 1 y 5 de tratamiento. En un estudio reciente de Ramos-Flores *et al.*, (2021) evaluaron la actividad de la AChE a los 0, 1, 3, 5 y 7 días post-tratamiento en ratas macho *Wistar* sin reportar modificaciones en los controles. A diferencia de nuestro estudio, el estudio de Ramos-Flores *et al.* utilizó solución salina como vehículo para administrar al grupo control. Algunos estudios que han utilizado aceite de maíz como vehículo han reportado un aumento en los niveles de la actividad de la AChE. Por ejemplo, en otro estudio realizado en ratas macho albinas se administró aceite de maíz al grupo control y simultáneamente se expusieron a los

animales a distintos tipos de estrés, observando el aumento en la actividad enzimática en tejido cerebral (Samad *et al.*, 2022). De igual manera, en estudios de peces dorada (*Sparus Aurata*) tratados con aceite de maíz, la actividad de la AChE se vio aumentada después de 24 horas desde la administración (Albendín *et al.*, 2021). En conjunto, nuestros resultados y los descritos por otros autores sugieren que el aceite de maíz podría aumentar la eficiencia catalítica, y, en consecuencia, una mayor afinidad enzima- sustrato o síntesis *de novo* de acetilcolina (Mullen *et al.*, 2007).

Los animales tratados con 150 µg/kg/día de temefos presentaron una disminución del 60% en la actividad de la AChE a las 24 horas después de la primera administración con respecto al grupo control (control= 4.11 U/g Hb; tratado= 1.65 U/g Hb), que es consistente con lo observado anteriormente con la administración a otros OF como el dimetoato a una dosis de 20 mg/kg, que inhibió 75.3% la actividad de la AChE 24 horas después de su administración vía *i. p.* en peces dorada (Albendín *et al.*, 2021). Por otro lado, en estudios realizados en ratas, la dosis única de 300 mg/kg de temefos inhibió la AChE un 67% en 4 horas y en 47% en 48 horas, mientras que la misma dosis administrada diariamente logró inhibirla en un 100% a las 48 horas (Ferguson *et al.*, 1985), y la dosis de 100 mg/kg/día inhibió 70% la actividad de la AChE en tres días (Ramos-Flores *et al.*, 2021), lo que podría indicar que las ratas son una especie más susceptible al efecto del temefos. Sin embargo, estos estudios se realizaron en ratas macho, y al encontrar en los resultados el aumento de la actividad de la AChE en los grupos controles hace pensar en la posibilidad de una cuestión de sensibilidad del sexo. La susceptibilidad en machos se demostró por Levinskas (1965), que expuso a ratas macho y hembra a 2, 6, 18 y 350 ppm de temefos en el alimento durante 92 días, donde la AChE se vio inhibida en los machos en las primeras dos semanas con 18 ppm de temefos, mientras que en las hembras la inhibición de la AChE se observó hasta las nueve semanas de tratamiento. Más adelante se observó este mismo efecto de sensibilidad sexo-dependiente con OF como el clorpirifos a dosis de 80 mg/kg/día, observando mayor actividad enzimática de la AChE en las hembras (Das *et al.*, 2001), lo que también podría explicar el resultado obtenido en el grupo control, de un aumento en la actividad de la AChE.

4.3 Efecto del temefos sobre los niveles de hormonas esteroideas y gonadotropinas

En nuestro estudio observamos que el tratamiento con las dosis utilizadas del temefos no altera los niveles hormonales de FSH, LH, estradiol, progesterona, prolactina y testosterona. Sin embargo, en experimentos *in vitro* realizados en el laboratorio con anterioridad evaluaron los niveles hormonales de E2, testosterona, dehidroepiandrosterona (DHEA-S) y androstenediona y demostraron que, la exposición a 2 M de temefos en un sistema *in vitro*, aumenta significativamente los niveles de androstenediona (Millán-Mejía, 2016). El aumento en los niveles de androstenediona se ha relacionado con la formación de quistes foliculares (Okutsu *et al.*, 2010). En nuestro estudio no se observó la presencia de quistes en los ovarios (resultados no descritos), por lo cual sugerimos que futuros estudios deben explorar posibles mecanismos de toxicidad involucrados en el aumento de folículos antrales causados por la exposición a temefos. La evaluación de los niveles de estrógenos y gonadotropinas se ha evaluado bajo tratamientos con otros OF como el clorpirifos, y se ha demostrado que una dosis de 1 mg/kg/día durante 100 días en ratas adultas *Sprague-Dawley* disminuye significativamente los niveles de E2, progesterona y LH (Ventura *et al.*, 2016). Los altos niveles de andrógenos (hiperandrogenismo) en las hembras se relacionan con anomalías a nivel del eje hipotálamo-pituitario-ovárico y con síndrome de ovario poliquístico (SOP), que se caracteriza por la falta de ovulación, alteraciones en el ciclo estral, entre otras afecciones (Beydoun *et al.*, 2012; Walters, 2020). En conjunto, nuestros resultados sugieren que la exposición a las dosis utilizadas de temefos no causa alteraciones endocrinas, no obstante, para confirmar esto fue necesario estudiar el efecto del temefos sobre la ovulación y sobre la ciclicidad estral, que se discutirá más adelante, además, aún es necesario evaluar los niveles de andrógenos como androstenediona o DHEA-S para descartar un cambio en los niveles hormonales.

4.4 Efecto del temefos sobre la ciclicidad estral

En nuestro estudio encontramos que el tratamiento con temefos por vía oral a dosis de 0, 15 y 150 µg/kg/día no altera la ciclicidad estral, lo que coincide con los datos

obtenidos por Alfaro-Pedraza (2017) bajo el mismo esquema de exposición. Sin embargo, en estudios de reprotoxicidad femenina donde se utilizaron otros OF como el clorpirifos, se encontraron cambios significativos en la ciclicidad estral, específicamente, se observó un metaestro prolongado y un proestro acortado bajo una dosis de 2,5 mg/kg/día de clorpirifos durante ocho semanas (Nishi y Hundal, 2013). Por otro lado, el OF fosfamidón a dosis de 2.6, 3.9 y 5.2 mg/kg/día disminuyó los días en que las ratonas estaban en proestro, estro y metaestro, y, por el contrario, aumentó los días en que las ratonas estaban diestro a dosis de 1.3, 2.6, 3.9 y 5.2 mg/kg/día de fosfamidón durante 30 días (Sreelakshmi y Kaliwal, 2007). De acuerdo con los resultados obtenidos, podríamos descartar un efecto disruptor endocrino causado por el temephos a nivel de ciclicidad estral, ya que se ha reportado que un diestro prolongado y la disminución en el número de ciclos estrales pueden ocurrir debido a la disminución de la secreción de estrógenos, lo que a su vez disminuye la secreción de FSH (Sreelakshmi y Kaliwal, 2007), efecto que no se observó en este proyecto. Finalmente, la disminución del peso corporal y la interrupción del ciclo estral se han asociado con la exposición continua de bajo nivel a pesticidas en seres humanos, animales de laboratorios y animales de granja (Tiemann, 2008). Por lo tanto, es necesario continuar estudiando los efectos del temephos a dosis más altas y bajo tiempos de exposición más grandes para descartar un posible efecto crónico.

4.5 Efecto del temefos sobre la foliculogénesis y ovulación

En el análisis de los cortes histológicos de ovario entramos que las poblaciones de folículos primordiales, primarios o secundarios no se ven alterados. Importantemente, el número de folículos antrales presentes en los ovarios de aquellas ratonas tratadas con 15 µg/kg/día de temefos durante cuatro ciclos estrales aumentó un 73% con respecto al grupo control. Sin embargo, la cantidad de cuerpos lúteos, que se traduce en el número de ovocitos ovulados, no se vio alterado en ninguno de los grupos de tratamiento con respecto al grupo control. En estudios *in vitro* se ha demostrado que el temefos 10 nM inhibe el crecimiento de los folículos antrales a partir del día 6 de exposición (Millán-Mejía *et al.*, 2016), lo que nos da como pauta para pensar que si bien, los folículos se están desarrollando hasta folículos antrales, probablemente no

se estén ovulando a causa de la inhibición de su crecimiento. Este efecto se evaluó por Alfaro-Pedraza (2017) donde en ratonas superovuladas expuestas a 150 y 1500 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ de temefos durante cuatro ciclos estrales tenían una disminución significativa en el número de ovocitos ovulados. El aumento en los niveles hormonales se ha relacionado con la reducción en el crecimiento de folículos antrales, reduciendo también la ovulación (Hernández-Ochoa *et al.*, 2013), además, el aumento en los niveles de androstenediona se relaciona con la formación de quistes foliculares (Okutsu *et al.*, 2010). Es importante señalar que los niveles de androstenediona aumentaron significativamente después de la exposición a temefos 2 mM (Millán-Mejía *et al.*, 2016). Finalmente, el aumento en el número de folículos antrales puede indicar que se está disminuyendo la atresia o muerte celular, que se ha asociado con el síndrome de ovario poliquístico y el hiperandrogenismo (Oktem *et al.*, 2013). Hasta ahora, estos efectos podrían indicar un efecto similar al del SOP, sin embargo, aún son necesarios más estudios como el conteo de folículos atrésicos y los niveles de andrógenos como la androstenediona.

4.6 Efecto del temefos sobre la viabilidad de los ovocitos

Después del tratamiento, se obtuvieron los COC de las ratonas para evaluar la calidad del ovocito en términos de viabilidad utilizando los colorantes IP y Hoechst 44432. No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de ovocitos viables de cada grupo de tratamiento, lo que sugiere que las dosis utilizadas de temefos no son citotóxicas. En contraste con estos resultados, la exposición *in vitro* a otros OF como malatión (0, 5, 1, 10, 25, 50 y 100 μM) y diazinón (0, 25, 50 y 100 μM) en ovocitos porcinos disminuyó tanto la viabilidad como el nivel de maduración de los ovocitos, teniendo una relación negativa dosis-dependiente. Es decir, conforme aumentaba la concentración de los OF disminuía la viabilidad y en mayor medida la maduración de los ovocitos (Casas *et al.*, 2010), que es de suma importancia para una correcta activación y una fertilización efectiva (Campaña *et al.*, 2001). Aún es necesario estudiar la maduración de los ovocitos a las dosis empleadas de temefos.

4.6.1 Efecto del temefos sobre la comunicación entre los COC por medio de uniones Gap

Uno de los hallazgos más importantes de este estudio fue la disminución de la fluorescencia de calceína-AM en los COC obtenidos de ratonas tratadas con 15 µg/kg/día de temefos durante cuatro ciclos estrales y que no habían llevado a cabo el proceso de ovulación, lo que sugiere que la exposición al temefos cierra prematuramente las uniones Gap. Esta hipótesis se apoya en estudios previos que han demostrado que el aumento en los niveles de LH durante la ovulación induce la fosforilación de las conexinas y en consecuencia desencadena el cierre en la comunicación entre los COC antes de la ovulación (Strauss III y Williams, 2014). Para estudiar mejor esta hipótesis se tendrá que evaluar más adelante el efecto del temefos en la fosforilación de conexina-37 en las uniones Gap de los COC. Nuestro estudio es el primero en evaluar el efecto del temefos sobre la comunicación de los COC, por lo que no podemos comparar los resultados con otros trabajos. Sin embargo, un estudio previo en nuestro laboratorio reportó que la exposición al disruptor endócrino bisfenol A (BPA) induce una disminución en el paso de la fluorescencia desde las células del cúmulo hacia el ovocito, que coincidía con la reanudación de la meiosis sin haber recibido el estímulo de la LH. En ese estudio también se demostró que la progresión de la meiosis del ovocito se interrumpía en anafase y telofase (Acuña-Hernández *et al.*, 2018). Ese estudio apoya nuestra hipótesis de que el temefos podría causar el cierre prematuro de las uniones Gap y, en consecuencia, desencadenar la reanudación prematura de la meiosis que podría ser interrumpida en fases intermedias. Alfaro-Pedraza (2017) demostró la reducción en la tasa de fertilización bajo la exposición *in vivo* a temefos, lo que podría ser consecuencia de la ovulación de ovocitos inmaduros, no obstante, aún es necesario el estudio de la maduración para confirmar esta hipótesis.

Otro hallazgo importante e inesperado en este proyecto fue que en el grupo tratado con 150 µg/kg/día, a pesar de no observarse una disminución significativa de la fluorescencia de calceína-AM, es decir, que el temefos no provocó el cierre prematuro de las uniones Gap, algunos de los ovocitos parecen tener anomalías como

vacuolas e inclusiones citoplasmáticas, que están relacionadas con la baja tasa de fertilización y embarazos de alto riesgo en humanos (Rienzi *et al.*, 2011). Durante la fase de crecimiento del ovocito pueden ocurrir alteraciones morfológicas, tales como una incompleta elaboración de la zona pelúcida, incremento en la cantidad de organeros, pérdida de centriolos y el cambio en la distribución de los organelos. Es importante recalcar que la morfología adecuada del ovocito es importante para una correcta segregación cromosómica (Strauss III y Williams, 2014). También es necesario evaluar el estado de fosforilación de las conexinas en las uniones Gap de los COC bajo esta dosis.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que la exposición al temefos altera las últimas fases de la foliculogénesis, a través de un aumento en el número de folículos antrales y una disminución en la comunicación células del cúmulo-ovocito. Aunque la exposición al temefos no altera la ovulación, sugerimos que sí daña la calidad del ovocito. Son necesarios más estudios para determinar si estos efectos son consecuencia del compuesto padre (temefos) o sus metabolitos.

5. Conclusiones

- La exposición subcrónica al temefos no altera la ganancia de peso corporal, el ciclo reproductivo, la ovulación o los niveles hormonales de estrógenos y gonadotropinas en ratones hembra CD1.
- La exposición subcrónica a 150 µg/kg/día de temefos causa un efecto neurotóxico agudo, inhibiendo la actividad de AChE un 59.8% después de las primeras 24 horas de tratamiento.
- La exposición subcrónica a 15 µg/kg/día de temefos en ratones hembra CD1 altera la foliculogénesis y causa el cierre de las uniones Gap en los COC.
- Se requieren estudios adicionales para evaluar la cantidad de folículos atrésicos y el estado de maduración de los ovocitos de ratonas expuestas a temefos.

6. Perspectivas

- Determinar los niveles hormonales de andrógenos como androstenediona y DHEA-S después del tratamiento con 0, 15 y 150 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ de temefos en animales sin estímulo de gonadotropinas exógenas.
- Evaluar la cantidad de folículos atrésicos en cortes histológicos en ovarios de ratonas sin estímulo de gonadotropinas exógenas después del tratamiento con 0, 15 y 150 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ de temefos.
- Evaluar la fosforilación de conexina-37 en los COC obtenidos de ratonas CD1 tratadas con 0, 15 y 150 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ de temefos.
- Evaluar la progresión de la meiosis de los ovocitos después del tratamiento con 15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ de temefos.
- Determinar los metabolitos del temefos en el ovario después del tratamiento con 0, 15 y 150 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ de temefos.

7. Referencias

- Achiraman, S., Ponmanickam, P., Ganesh, D. S., y Archunan, G. (2010). Detection of estrus by male mice: synergistic role of olfactory-vomer nasal system. *Neuroscience Letters*, 477(3), 144–148.
- Acuña-Hernández, D. G., Arreola-Mendoza, L., Santacruz-Márquez, R., García-Zepeda, S. P., Parra-Forero, L. Y., Olivares-Reyes, J. A., y Hernández-Ochoa, I. (2018). Bisphenol A alters oocyte maturation by prematurely closing gap junctions in the cumulus cell-oocyte complex. *Toxicology and applied pharmacology*, 344, 13–22.
- Albendín, M. G., Manuel-Vez, M. P., y Arellano, J. M. (2021). *In vivo* cholinesterase sensitivity of gilthead seabream (*Sparus aurata*) exposed to organophosphate compounds: Influence of biological factors. *Ecological Indicators*, 121(107176), 107176. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.107176>
- Alfaro-Pedraza, E. (2017). Efectos de la exposición a temefos sobre la fertilización y la calidad del cigoto en un modelo *in vivo*. Ciudad de México: *Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Unidad Zacatenco. Departamento de Toxicología*.
- Alfaro-Pedraza, E., Parra-Forero, L. Y., Mojica-Villegas, M. A., Herrera-Moreno, J.F., Rojas-García, A. E., y Hernández-Ochoa, I. (2018). Temephos Impairs Ovulation, Oocyte fertilization, and Zygote Quality in an *In Vivo* Model. Conference: 57th Annual Meeting of the Society of Toxicology. At: Henry B. González Convention Center, San Antonio, Texas
- Álvarez, 2016. Evaluación del polimorfismo genético CYP2D6*4 y su asociación en biomarcadores de daño reproductivo y, neurotoxicidad en fumigadores expuestos a plaguicidas. Universidad Autónoma de Nayarit 2-5, 23-26.
- Aritonang, T. R., Rahayu, S., Sirait, L. I., Karo, M. B., Simanjuntak, T. P., Natzir, R., ... Kamelia, E. (2017). The role of FSH, LH, estradiol, and progesterone hormone on estrus cycle of female rats. *International Journal of Sciences, Basic and Applied Research*, 35(1), 92–100.

Balalian, A. A., Liu, X., Herbstman, J. B., Daniel, S., Whyatt, R., Rauh, V., Calafat, A. M., Wapner, R., y Factor-Litvak, P. (2021). Prenatal exposure to organophosphate and pyrethroid insecticides and the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and size at birth in urban pregnant women. *Environmental Research*, 201(111539), 111539.

Benitez-Trinidad, A. B., Herrera-Moreno, J. F., Vázquez-Estrada, G., Verdín-Betancourt, F. A., Sordo, M., Ostrosky-Wegman, P., ... Rojas-García, A. E. (2015). Cytostatic and genotoxic effect of temephos in human lymphocytes and HepG2 cells. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 29(4), 779–786.

Beydoun, H. A., Beydoun, M. A., Wiggins, N., y Stadtmauer, L. (2012). Relationship of obesity-related disturbances with LH/FSH ratio among post-menopausal women in the United States. *Maturitas*, 71(1), 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2011.10.010>

Blinn, R., 1969. Metabolic fate of Abate insecticide in the rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 17, 118-122.

Casas, E., Bonilla, E., Ducolomb, Y., y Betancourt, M. (2010). Differential effects of herbicides atrazine and fenoxaprop-ethyl, and insecticides diazinon and malathion, on viability and maturation of porcine oocytes *in vitro*. *Toxicology in Vitro*, 24 (1). 224-230. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.09.004>

CENAPRECE. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades. (2013). http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/guia_control_larvario.pdf

Centro Nacional de Información Biotecnológica (2021). Resumen de compuestos de PubChem para CID 390986, Calceína AM. Obtenido el 5 de julio de 2021 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Calcein-AM>

Cooper, R. L., Goldman, J. M., Vandenbergh, J. G. (1992). Monitoring of the estrous cycle in the laboratory rodent by vaginal lavage. *Methods in Toxicology: female reproductive toxicology*. Edit. Heindel J.J and Chapin. 45-56.

Cormack, D. H. (1987). *Ham's Histology*, Ninth Edition. J.B. Lippincott Company.

Das, A., Dikshit, M., y Nath, C. (2001). Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. *Life Sciences*, 68(13), 1545–1555.

[https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(01\)00950-x](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(01)00950-x)

Domínguez, A., Salazar, Z., Betancourt, M., Ducolomb, Y., Casas, E., Fernández, F., Bahena, I., Salomón, A., Teteltila, M., Martínez, R., Chaparro, A., Cuapio, P., Salazar-López, C., y Bonilla, E. (2019). Effect of perfluorodecanoic acid on pig oocyte viability, intracellular calcium levels and gap junction intercellular communication during oocyte maturation *in vitro*. *Toxicology in Vitro*, 58. 224-229. doi:

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.03.041>

Edward, J., y Sogbesan, O. (2007). Toxicity Effect of Temephos on *Bulinus globosus* and *Lymnaea natalensis*. *Advances in Biological Research* 1, 130-133.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Jr., Feather-Stone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7. 88-95.

Eppig, J. J., Chesnel, F., Hirao, Y., O'Brien, M. J., Pendola, F. L., Watanabe, S., y Wigglesworth, K. (1997). Oocyte control of granulosa cell development: how and why. *Human Reproduction*, 12(11 Suppl), 127–132.

Erickson, G. F. (1996). Physiologic basis of ovulation induction. *Seminars in Reproductive Endocrinology*, 14(4), 287–297.

Ferguson, P. W., Medon, P. J., y Nasri, E. (1985). Temephos (Abate) metabolism and toxicity in rats. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 14(2), 143–147.

Franson, J. C., Spann, J. W., Heinz, G. H., Bunck, C., y Lamont, T. (1983). Effects of dietary ABATE® on reproductive success, duckling survival, behavior, and clinical pathology in game-farm mallards. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 12, 529-534.

Gaines, T. B., Kimbrough, R., y Laws Jr, E.R. (1967). Toxicology of Abate in laboratory animals. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 14, 283- 288.

Gardner, D. K., Lane, M. (2004). Culture of the Mammalian Preimplantation Embryo. En: Gardner, D.K., Lane, M., Watson, A.J. A laboratory guide to the mammalian embryo. *Oxford University Press*: New York, USA. 41-61.

George, L., Lenhart, A., Toledo, J., Lazaro, A., Han, W. W., Velayudhan, R., ... Horstick, O. (2015). Community-effectiveness of temephos for dengue vector control: A systematic literature review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(9), e0004006.

Harischandra, H., Karunaratne, S., y Rajakaruna, R. (2012). Effect of mosquito larvicide Abate® on the developmental stages of the Asian common toad, *Bufo melanostictus*. *Ceylon Journal of Science*, 40, 2.

Hernández-Ochoa, I., Gao, L., Peretz, J., Basavarajappa, M. S., Bunting, S. L., Karman, B. N., Paulose, T., y Flaws, J. A. (2013). Follicle-stimulating hormone responsiveness in antral follicles from aryl hydrocarbon receptor knockout mice. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 11(1), 26.
<https://doi.org/10.1186/1477-7827-11-26>

Hu, L., Gustofson, R. L., Feng, H., Leung, P. K., Mores, N., Krsmanovic, L. Z., y Catt, K. J. (2008). Converse regulatory functions of estrogen receptor-alpha and -beta subtypes expressed in hypothalamic gonadotropin-releasing hormone neurons. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 22(10), 2250–2259.

Ji, K., Hong, S., Kho, Y., y Choi, K. (2013). Effects of bisphenol S exposure on endocrine functions and reproduction of zebrafish. *Environmental Science & Technology* 47, 8793-8800.

Jokanović, M., Kosanović, M., Brkić, D., y Vukomanović, P. (2011). Organophosphate induced delayed polyneuropathy in man: an overview. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 113(1), 7–10.

Kamel, A., Byrne, C., Vigo, C., Ferrario, J., Stafford, C., Verdin, G., Siegelman, F., Knizner, S., Hetrick, J. (2009) Oxidation of selected organophosphate pesticides

during chlorination of simulated drinking water. *Water Res*, 43:522–534. doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.10.038>

Kim, S. H., Bae, J. W., Kim, D. H., Jeong, D. J., Ha, J. J., Yi, J. K., y Kwon, W. S. (2020). Detrimental effects of temephos on male fertility: An *in vitro* study on a mouse model. *Reproductive Toxicology*, 96, 150–155.

Lema, C., Varela-Ramírez, A., y Aguilera, R. J. (2011). Differential nuclear staining assay for high-throughput screening to identify cytotoxic compounds. *Current Cellular Biochemistry*, 1(1), 1–14.

Levinskas, G.J.S., C.B., 1965. CL 52,160: ninety-day feeding to albino rats. Unpublished Environmental Health Laboratory N°65-18.

Lewis, K. A., Tzilivakis, J., Warner, D. and Green, A. (2016) An international database for pesticide risk assessments and management. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 22(4), 1050-1064. doi: 10.1080/10807039.2015.1133242

Li, R., y Albertini, D. F. (2013) The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 14 (3). 141-152. doi: 10.1038/nrm353

Main, A. R. (1964). Affinity and phosphorylation constants for the inhibition of esterases by organophosphates. *Science*, 144, 992-993.

Martínez-Mercado, J. P., Sierra-Santoyo, A., Verdín-Betancourt, F. A., Rojas-García, A. E., y Quintanilla-Vega, B. (2022). Temephos, an organophosphate larvicide for residential use: a review of its toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 52(2), 113–124. <https://doi.org/10.1080/10408444.2022.2065967>

McLean, A. C., Valenzuela, N., Fai, S., Bennett, S. A. (2012). Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *Journal of Visualized Experiments: Jove*, 4, 389.

McNerney, J. M., Ribelin, W. E. y Levinskas, G. J. (1968). Abate mosquito larvicide: successive generation studies in rats, Unpublished report No. 68-9 (BASF Registration

Document No TM-430-001) from American Cyanomid Company. Central Medical Department Wayne, New Jersey, USA. Submitted to WHO by BASF., pp. 47-49.

Melo-Santos, M. A., Varjal-Melo, J. J., Araújo, A. P., Gomes, T. C., Paiva, M. H., Regis, L. N., . . . Ayres, C. F. (2010). Resistance to the organophosphate temephos: Mechanisms, evolution, and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. *Acta Tropica*, 113(2), 180-189. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.10.015>

Mihalas, B. P., Redgrove, K. A., McLaughlin, E. A., y Nixon, B. (2017). Molecular mechanisms responsible for increased vulnerability of the ageing oocyte to oxidative damage. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1–22.

Millán-Mejía, L., García-Zepeda, S. P., y Hernández-Ochoa, I. (2016). Temephos decreases ovarian antral follicle growth in an *in vitro* system. *Toxicology letters*, 259, S236. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.07.567>

Mircea, C. N., Lujan, M. E., Jaiswal, R. S., Singh, J., Adams, G. P., y Pierson, R. A. (2009). Ovarian imaging in the mouse using ultrasound biomicroscopy (UBM): a validation study. *Reproduction, Fertility, and Development*, 21(4), 579–586. <https://doi.org/10.1071/RD08295>

Mullen, G. P., Mathews, E. A., Vu, M. H., Hunter, J. W., Frisby, D. L., Duke, A., Grundahl, K., Osborne, J. D., Crowell, J. A., y Rand, J. B. (2007). Choline transport and *de novo* choline synthesis support acetylcholine biosynthesis in *Caenorhabditis elegans* cholinergic neurons. *Genetics*, 177(1), 195–204. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.074120>

Nishi, K., y Hundal, S. S. (2013). Chlorpyrifos induced toxicity in reproductive organs of female Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 62, 732–738. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.10.006>

Núñez-Bajo, E., y Fernández Abedul, M. T. (2020). Electrochemiluminescence of tris (1,10-phenanthroline) ruthenium(II) complex with multipulsed amperometric detection.

En M. T. Fernandez Abedul (Ed.), *Laboratory Methods in Dynamic Electroanalysis* (pp. 329–338). *Elsevier*.

Oktem, O., Guzel, Y., Taskiran, C., Ince, U., Palaoglu, E., y Urman, B. (2013). Higher androgen and estrogen output and less follicular atresia can be induced in healthy ovaries by culturing them with sera from PCOS patients: is PCOS really of intraovarian origin? *Fertility and Sterility*, 100(3), S39–S40. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.07.1797>

Okutsu, Y., Itoh, M. T., Takahashi, N., y Ishizuka, B. (2010). Exogenous androstenedione induces formation of follicular cysts and premature luteinization of granulosa cells in the ovary. *Fertility and Sterility*, 93(3), 927–935. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.10.064>

Organización Mundial de la Salud. (2011) a. WHO SPECIFICATIONS AND EVALUATIONS FOR PUBLIC HEALTH PESTICIDES; TEMEPHOS. Recuperado de <https://www.who.int/pq-vector-control/prequalified-lists/TEMEPHOS.pdf?ua=1>

Organización Mundial de la Salud. (2011) b. Public health impact of pesticides used in agriculture.

Pepling, M. E. (2006). From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *Genesis* 44: 622-632.

Pereska, Z., Chaparoska, D., Bekarovski, N., Jurukov, I., Simonovska, N., y Babulovska, A. (2019). Pulmonary thrombosis in acute organophosphate poisoning- Case report and literature overview of prothrombotic preconditioning in organophosphate toxicity. *Toxicology Reports*, 6, 550–555.

Ramos-Flores, Á., Camacho-Hernández, I., Sierra-Santoyo, A., Solís-Heredia, M. de J., Verdín-Betancourt, F. A., Parra-Forero, L. Y., López-González, M. de L., Hernández-Ochoa, I., y Quintanilla-Vega, B. (2021). Temephos decreases sperm quality and fertilization rate and is metabolized in rat reproductive tissues at low-dose exposure. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 184(1), 57–66. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfab100>

Rankin, T., Soyak, S., y Dean, J. (2000). The mouse zona pellucida: folliculogenesis, fertility and pre-implantation development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 163(1–2), 21–25.

Rendón von Osten, J., Epomex, C., Tinoco-Ojanguren, R., Soares, A. M. V. M., & Guilhermino, L. (2004). Effect of pesticide exposure on acetylcholinesterase activity in subsistence farmers from Campeche, Mexico. *Archives of Environmental Health*, 59(8), 418–425. <https://doi.org/10.3200/AEOH.59.8.418-425>

Renshaw, W., y Bobbis, A. (2006). Temephos. En: Joint by FAO and WHO, with the support of the international programme on chemical safety/joint meeting of the FAO panel of experts on pesticide residues in food and the environment and WHO core assessment group. Pesticide residues in food.

Reyes-Chaparro, A., Verdín-Betancourt, F. A., y Sierra-Santoyo, A. (2020). Human biotransformation pathway of temephos using an *in-silico* approach. *Chemical Research in Toxicology*, 33(11), 2765–2774. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.0c00105>

Richter, M. M. (2008). ELECTROCHEMILUMINESCENCE. En F. S. Ligler y C. R. Taitt (Eds.), *Optical Biosensors* (pp. 317–384). Elsevier.

Rienzi, L., Vajta, G., y Ubaldi, F. (2011). Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature. *Human Reproduction Update*, 17(1), 34–45. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmq029>

Samad, N., Imran, A., Bhatti, S. A., Imran, I., Alqahtani, F., Alasmari, A. F., y Sivandzade, F. (2022). Vitamin D2 protects acute and repeated noise stress induced behavioral, biochemical, and histopathological alterations: Possible antioxidant effect. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(1), 601–609. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.09.018>

Sasseville', M., Gagnon, M.C., Guillemette, C., Sullivan, R., Gilchrist, R.B., y Richard, F.J. (2009). Regulation of gap junctions in porcine cumulus-oocyte complexes:

contributions of granulosa cell contact, gonadotropins, and lipid rafts. *Mol. Endocrinol.* 23 (5), 700–710. <http://dx.doi.org/10.1210/me.2008-0320>

Secretaría de Salud. (2014). *Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2014*. Recuperado de: http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/NOM_032_SSA2_2014.pdf

Singh, N., Karpichev, Y., Tiwari, A. K., Kuca, K., y Ghosh, K. K. (2015). Oxime functionality in surfactant self-assembly: An overview on combating toxicity of organophosphates. *Journal of Molecular Liquids*, 208, 237–252.

Singhal, R. N., y Davies, R. W. (1996). Effects of an organophosphorus insecticide (Temephos) on gametogenesis in the leech *Hirudinaria manillensis* (Hirudinidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 67, 100-101.

Sreelakshmi, T. S., y Kaliwal, B. B. (2007). Phosphamidon induced effects on estrous cycle, ovarian, and uterine biochemical parameters in Swiss albino mice. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 87(3), 204–210. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.07.011>

Strauss, J.F., Williams, C. J. (2014). Chapter 9: The ovarian life cycle. En Strauss, J.F., Barbieri, R. L. (Ed.), *Yen & Jaffe's reproductive endocrinology: Physiology, pathophysiology, and clinical management (expert consult - online and print)* (pp. 157–191). W B Saunders.

Tiemann, U. (2008). *In vivo* and *in vitro* effects of the organochlorine pesticides DDT, TCPM, methoxychlor, and lindane on the female reproductive tract of mammals: a review. *Reproductive Toxicology* (Elmsford, N.Y.), 25(3), 316–326. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2008.03.002>

Tingen, C., Kim, A., y Woodruff, T. K. (2009). The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. *Molecular Human Reproduction* 15: 795- 803.

United States Environmental Protection Agency. (2000). Temephos RED. Recuperado el 15 de julio de 2021, de *Epa.gov website*:

https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/red_PC-059001_1-Jun-00.pdf

United States Environmental Protection Agency. (2001a). Registration Eligibility Decision for Temephos. Recuperado el 15 de julio de 2021, de Epa.gov website: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/200007UJ.PDF?Dockkey=200007UJ.PDF>

United States Environmental Protection Agency. (2001b). Temephos Facts. Recuperado el 16 de julio de 2021, de Epa.gov website: <https://n9.cl/dfz0s>

Vani, J. M., de Carvalho Schweich, L., de Oliveira, K. R. W., Auharek, S. A., Cunha-Laura, A. L., Antonioli-Silva, A. C. M. B., ... Oliveira, R. J. (2018). Evaluation of the effects of the larvicides temephos on reproductive performance, embryofetal development and DNA integrity of Swiss mice. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 148, 22–27.

Ventura, C., Nieto, M. R. R., Bourguignon, N., Lux-Lantos, V., Rodriguez, H., Cao, G., Randi, A., Cocca, C., y Núñez, M. (2016). Pesticide chlorpyrifos acts as an endocrine disruptor in adult rats causing changes in mammary gland and hormonal balance. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 156, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.10.010>

Verdín-Betancourt, F. A., Figueroa, M., López-González, M. de L., Gómez, E., Bernal-Hernández, Y. Y., Rojas-García, A. E., y Sierra-Santoyo, A. (2019). *In vitro* inhibition of human red blood cell acetylcholinesterase (AChE) by temephos-oxidized products. *Scientific Reports*, 9(1), 14758.

Verdín-Betancourt, F. A., Figueroa, M., Soto-Ramos, A. G., de Lourdes López-González, M., Castañeda-Hernández, G., Bernal-Hernández, Y. Y., Rojas-García, A. E., y Sierra-Santoyo, A. (2021). Toxicokinetics of temephos after oral administration to adult male rats. *Archives of Toxicology*, 95(3), 935–947. <https://doi.org/10.1007/s00204-021-02975-8>

Walters, K. A. (2020). Polycystic ovary syndrome: Is it androgen or estrogen receptor? *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, 12, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2020.01.003>

WHO, World Health Organization. (2010). The Who Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009, pp1-60. Disponible en: [https://doi.org/ISBN 978 92 4 1547963](https://doi.org/ISBN%20978%204%201547963)

Yasuno, M., Hatakeyama, S. y Miyashita, M. (1980). Effects on reproduction in the guppy (*Poecilia reticulata*) under chronic exposure to temephos and fenitrothion. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, 25, 29–33. doi: <https://doi.org/10.1007/BF01985481>