



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

Unidad Zacatenco

Departamento de Toxicología

**“Efectos reproductivos por exposición intrauterina a dosis bajas de
clorpirifos en ratones hembra y macho F1”**

Tesis que presenta:

QFB. Eduardo Rojas Prado

Para obtener el grado de Maestro en Ciencias

En la especialidad de Toxicología

Co-directoras:

Dra. María Betzabet Quintanilla Vega

Dra. María Isabel Hernández Ochoa

Ciudad de México

Agosto, 2022

Este trabajo se desarrolló en los Laboratorios 5 y 29 del Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la co-dirección de la Dra. Ma. Betzabet Quintanilla Vega y la Dra. Ma. Isabel Hernández Ochoa. Este proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), proyecto Ciencia de Frontera 2019 (FORDECYT-PRONACES/3265538/2020) otorgado a la Dra. María Isabel Hernández Ochoa. Eduardo Rojas Prado recibió la beca de maestría (CVU No. 956699) por parte del CONACyT.

Dedicatoria

A mi madre María Prado Abarca, por ser el pilar más importante en mi vida y demostrarme su amor incondicional, por motivarme, aconsejarme y brindarme su total confianza. *¡Te quiero mucho mamá!*

A Dios por permitirme llegar a este momento tan importante de mi formación profesional. Por los triunfos y momentos difíciles que me han enseñado a valorarlo cada día más. A él que nunca me ha dejado solo y que jamás me ha fallado. *¡Gracias!*

A toda mi familia, por demostrarme su cariño y confiar plenamente en mí.
¡Los quiero mucho!

A mis compañeros de generación: Andrea, Yumara, Erick, Aylín, Pablo y Adrián. Por acompañarme durante esta nueva etapa en mi vida y hacer más amenas las clases. *¡Gracias!*

**El éxito ocurre cuando tus sueños son más grandes que tus excusas.
¡Si emociona pensarlo, imagínate hacerlo!**

Agradecimientos

A la Dra. María Betzabet Quintanilla Vega por brindarme la oportunidad de formar parte del equipo de trabajo del Laboratorio 5, por sus valiosas aportaciones, consejos y dedicación a este trabajo de tesis.

A la Dra. María Isabel Hernandez Ochoa por brindarme la oportunidad de formar parte del equipo de trabajo del Laboratorio 29, por enseñarme las técnicas necesarias para mi proyecto y por los valiosos aportes a este trabajo de tesis.

A mis asesores, Dra. Carmen Adriana Mendoza Rodríguez, Dr. Adolfo Sierra Santoyo, les agradezco sus contribuciones, observaciones y comentarios que ayudaron a mejorar este trabajo.

A los investigadores del Departamento de Toxicología del CINVESTAV, por su contribución en mi formación académica durante mis estudios de maestría.

A la Dra. Sihomara Patricia García Zepeda, por el acompañamiento y apoyo brindado en el trabajo experimental referente a reproducción femenina, por sus enseñanzas, consejos y amistad.

A la M. en C. Ma. de Jesús Solís Heredia, por el apoyo brindado para la realización del trabajo experimental referente a reproducción masculina, por sus enseñanzas, consejos y amistad.

A la Lic. Lucina González de la Torre, por el acompañamiento y apoyo brindado durante mis estudios de maestría, por sus consejos y por facilitarme toda la parte administrativa.

Al M. en C. Cristian Martin Zamora González, por el acompañamiento y enseñanza necesarias para la realización del trabajo experimental, por el apoyo con el manejo de animales de laboratorio, vías de exposición y extracción de muestras biológicas, por ser un buen compañero de laboratorio, pero sobre todo por brindarme su incondicional amistad.

A la QFB. Andrea Lizette Caro Herbert, por todo el apoyo durante la realización del trabajo experimental y por ser una buena compañera y amiga de laboratorio.

A mis compañeras de Laboratorio Aylin Larrañaga Parrado, Gabriela Mishell Moreno Bustamante y Ailemys Curbelo Valiente, por su apoyo durante la realización del trabajo experimental.

Al técnico Ángel Barrera Hernández y al técnico Gerardo Martínez Aguilar por su disponibilidad y apoyo para la realización del trabajo experimental.

Agradezco a la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL), el que me hayan proporcionado los animales de laboratorio necesarios para esta tesis y brindarme el uso de las instalaciones para el mantenimiento de los animales de laboratorio. En especial al Veterinario Rafael Leyva Muñoz, por todo su acompañamiento y apoyo en lo referente al manejo de animales de laboratorio.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado a través de la beca de Maestría No. 956699.

CONTENIDO

	Página
Índice de tablas	VII
Índice de figuras	VIII
Abreviaturas	IX
Resumen	X
Abstract	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Plaguicidas organofosforados (OF)	1
1.2. Clorpirifos (CPF)	2
1.2.1. Características fisicoquímicas del CPF	2
1.2.2. Toxicocinética del CPF (ADME)	3
1.2.2.1. Absorción	3
1.2.2.2. Distribución	4
1.2.2.3. Metabolismo	4
1.2.2.4. Excreción	5
1.2.3. Mecanismo de toxicidad del CPF	6
1.2.5. Efectos tóxicos del CPF	6
1.2.5.1. Carcinogenicidad y genotoxicidad	6
1.2.5.2. Efectos endocrinos del CPF	7
1.2.5.3. Efectos del CPF en la reproducción masculina	8
1.2.5.4. Efectos del CPF en la reproducción femenina	7
1.2.6. Efectos del CPF en la progenie	9
1.3. Justificación	13
1.4. Hipótesis	13
1.5. Objetivo general	14
1.6. Objetivos particulares	14
2. MATERIAL Y MÉTODOS	15
2.1. Diseño experimental	15
2.2. Modelo animal	15
2.3. Exposición de los animales	17
2.4. Actividad de la AChE	17
2.4.1. Fundamento	17
2.4.2. Procedimiento	17
2.5. Parámetros generales neonatales	18
2.6. Efectos reproductivos en la descendencia femenina (F1)	18
2.6.1. Ciclicidad estral	18
2.6.2. Histología	18
2.6.2.1. Fundamento	18
2.6.2.2. Procedimiento	18
2.6.3. Conteo folicular	19
2.7. Efectos reproductivos en la descendencia masculina (F1)	19
2.7.1. Obtención de espermatozoides y calidad espermática	19
2.7.2. Concentración	19
2.7.3. Motilidad	20
2.7.4. Morfología	20

2.7.5. Viabilidad.....	20
2.7.6.1. Fundamento	20
2.7.6.2. Procedimiento	21
2.8. Análisis estadístico.....	21
3. RESULTADOS	22
3.1. Efecto del CPF en hembras gestantes (F0)	22
3.1.1. Efecto en la actividad de la AChE	22
3.1.2. Efecto en el peso durante el periodo gestacional.....	22
3.1.3. Efecto en los parámetros reproductivos de las hembras gestantes	23
3.2. Efectos reproductivos del CPF en las hembras F1	24
3.2.1. Efecto en el peso corporal y relativo de los órganos.....	24
3.2.2. Efecto en la distancia anogenital y en la apertura vaginal	24
3.2.3. Efecto en el ciclo estral y en el conteo folicular	26
3.3. Efectos reproductivos del CPF en los machos F1.....	26
3.3.1. Efecto en el peso corporal y relativo de los órganos.....	26
3.3.2. Efecto del CPF en la distancia anogenital y en la calidad espermática	26
3.3.3. Efecto del CPF en la estructura de la cromatina espermática.....	28
4. DISCUSIÓN	31
4.1. Efecto del CPF en hembras gestantes (F0)	31
4.1.1. Efecto en la actividad de la AChE y en el peso durante el periodo gestacional.....	31
4.1.2. Efecto en los parámetros reproductivos de las hembras gestantes	31
4.2. Efectos reproductivos del CPF en las hembras F1	33
4.2.1. Efecto en el peso corporal y relativo de los órganos.....	33
4.2.2. Efecto en la distancia anogenital, apertura vaginal, ciclicidad estral y conteo folicular.....	33
4.3. Efectos reproductivos del CPF en machos F1	35
4.3.1. Efecto en el peso corporal y relativo de los órganos.....	35
4.3.2. Efecto del CPF en la distancia anogenital y en la calidad espermática	36
4.3.3. Efecto del CPF en la estructura de la cromatina espermática.....	37
5. CONCLUSIONES	39
En hembras gestantes (F0).....	39
En hembras F1.....	39
En machos F1	39
6. PERSPECTIVAS.....	40
4. REFERENCIAS.....	41

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Efectos endocrinos por exposición a CPF.	8
Tabla 2. Efectos en la reproducción masculina por exposición a CPF.	9
Tabla 3. Efectos en la reproducción femenina por exposición a CPF.	11
Tabla 4. Efectos en la progenie por exposición a CPF.	12
Tabla 5. Efecto de la exposición a CPF en los parámetros reproductivos de las hembras gestantes.	23
Tabla 6. Efecto de la exposición a CPF en el peso de las hembras F1 desde el destete hasta el día del sacrificio.	24
Tabla 7. Efecto de la exposición a CPF en el peso relativo de los órganos de las hembras F1.	25
Tabla 8. Efecto de la exposición a CPF en la distancia anogenital y la apertura vaginal en hembras F1.	25
Tabla 9. Efecto de la exposición a CPF en el conteo folicular de las hembras F1.	27
Tabla 10. Efecto de la exposición a CPF en el peso de los machos F1 desde el destete hasta el día del sacrificio.	28
Tabla 11. Efecto de la exposición a CPF en el peso relativo de órganos de los machos F1.	29

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura química del CPF	3
Figura 2. Vía metabólica del CPF	5
Figura 3. Diseño experimental.	16
Figura 4. Actividad de la AChE eritrocitaria en ratones hembra expuestas a 5 mg/kg/día de CPF (DG 7-15)	22
Figura 5. Peso corporal de las hembras expuestas a 5 mg/kg/día durante el periodo gestacional (DG 7-15)	23
Figura 6. Alteración del ciclo estral en las hembras expuestas a 5 mg/kg/día durante el periodo gestacional (DG 7-15)	27
Figura 7. Efecto en la distancia anogenital de los machos F1 provenientes de hembras expuestas a 5 mg/kg/día durante el periodo gestacional (DG 7-15)	29
Figura 8. Efecto en los parámetros de calidad espermática en machos provenientes de hembras expuestas a 5 mg/kg/día durante el periodo gestacional (DG 7-15)	30
Figura 9. Efecto en la integridad del ADN y la estructura espermáticos en machos provenientes de hembras expuestas a 5 mg/kg/día durante el periodo gestacional (DG 7-15).	30

ABREVIATURAS

AChE- Acetilcolinesterasa

ADME- Administración, Distribución, Metabolismo y Excreción (y/o eliminación)

ADN- *Ácido desoxirribonucleico*

ARN- *Ácido ribonucleico*

CB- Carbamatos

CPF- Clorpirifos

CPF oxón- Clorpirifos oxón

CYP- Citocromo P450

DEP- Dietilfosfato

DETP- Dietil-tiofosfato

DG- Día Gestacional

DL50- Dosis Letal Cincuenta

DPN- Día Postnatal

ELISA- Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzimas

EPA- Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos

FSH- Hormona Folículo Estimulante

LH- Hormona Luteinizante

OF- Organofosforados

OMS- Organización Mundial de la Salud

PAPs- Plaguicidas Altamente Peligrosos

PON1- Paraoxonasa 1

RA- Receptor de Andrógenos

RIA- Radioinmuno Ensayo Directo

SNC- Sistema Nervioso Central

TCP- 3,5,6-tricloro-2-piridinol

TMP- 3,5,6-tricloro-2-metoxipiridina

Resumen

La exposición a plaguicidas altamente peligrosos (PAPs) es un problema de salud pública y ambiental a nivel mundial. Dentro de estos plaguicidas se encuentra el clorpirifos (CPF), insecticida organofosforado (OF) clasificado como moderadamente tóxico y utilizado actualmente para el control de vectores transmisores del virus del dengue, Zika y chikungunya. La exposición a CPF se ha relacionado con defectos en el sistema reproductor masculino, incluida la reducción del peso testicular y número de espermatozoides. En la reproducción femenina se han reportado efectos como la reducción del peso ovárico y de la producción de folículos, interrupción del ciclo estral e infertilidad. Existe poca información sobre los efectos ocasionados en la progenie por la exposición al CPF. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos a nivel reproductivo ocasionados por la exposición intrauterina a una dosis baja de CPF (5 mg/kg/día) en ratones hembra y macho CD1 (F1). Para ello, se expusieron ratones hembra (F0) de 6-7 semanas de edad del día gestacional (DG) 7-15 y se cuantificó la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE; biomarcador de toxicidad y exposición). Al momento del parto se evaluaron los parámetros neonatales: número de crías nacidas vivas y muertas y sexo. Cuando las hembras F1 presentaron la apertura vaginal se realizó el seguimiento del ciclo estral y al llegar al segundo estro fueron sacrificadas, se extrajeron los órganos (ovarios, riñones, bazo, páncreas, hígado, cerebro y pituitaria) y se realizó el conteo folicular. Los machos F1 se monitorearon hasta la semana 11, se sacrificaron, se extrajeron los órganos (testículos, riñones, bazo, páncreas, hígado, cerebro y pituitaria) y los espermatozoides de la cola del epidídimo-conducto deferente para evaluar la calidad espermática e integridad del ADN espermático. La actividad de la AChE disminuyó (43.6%) en las hembras gestantes (F0) 24 horas post-tratamiento (DG 16). No se observaron efectos en los parámetros reproductivos, incluyendo el tiempo de gestación, número de crías en el parto y proporción de machos y hembras; tampoco se observó diferencia en el peso corporal durante la gestación. En las hembras F1 no se observó diferencia en el peso corporal o relativo de los órganos, ni en la distancia anogenital, pero si en el promedio del día en el que se presentó la apertura vaginal. Se observó una diferencia en el número de días en la fase de estro, pero no en el conteo folicular. Por su parte, en los machos F1 no se observó diferencia en el peso corporal ni en la distancia anogenital, pero si se observó una disminución en el peso relativo de los testículos y un aumento del hígado. Se observó una disminución en la motilidad (8%) y viabilidad (4%) espermáticas. No se presentaron diferencias significativas en el índice de fragmentación del ADN (%DFI) o en la condensación de la cromatina (%HDS) de los espermatozoides. Con nuestros resultados podemos resumir que la exposición a 5 mg/kg/día de CPF durante el periodo gestacional (DG 7-15) genera efectos reproductivos adversos en las hembras F1, incluyendo retraso en el inicio de la pubertad y alteraciones en la ciclicidad estral. Mientras que, en los machos F1 se presentó una disminución en el peso relativo de los testículos y alteración en los parámetros de calidad espermática. Estos resultados sugieren que la exposición intrauterina al CPF tiene efectos generacionales adversos sobre la función reproductiva de los críos hembra y macho (F1), comprometiendo la salud de la progenie.

Abstract

Exposure to highly hazardous pesticides (HHPs) is a global public health and environmental problem. Among these pesticides is chlorpyrifos (CPF), an organophosphate insecticide (OP) classified as moderately toxic and currently used for the control of vectors transmitting the dengue, Zika and chikungunya virus. Exposure to CPF has been linked to defects in the male reproductive system, including reduced testicular weight and sperm count. In female reproduction, effects such as reduction of ovarian weight and follicle production, interruption of the estrous cycle and infertility have been reported. There is little information on the effects of CPF exposure on progeny. The aim of this study was to evaluate the reproductive effects caused by intrauterine exposure to low doses of CPF (5 mg/kg/day) in female and male CD1 (F1) mice. To do this, female mice (F0) 6-7 weeks of age of gestational day (GD) 7-15 were exposed and the activity of AChE (biomarker of toxicity and exposure) was quantified. At the time of delivery, neonatal parameters were evaluated: number of offspring born alive and dead and sex. When the F1 females presented vaginal opening, the estrous cycle was monitored and when they reached the second estrus they were sacrificed, organs (ovaries, kidneys, spleen, pancreas, liver, brain and pituitary) were removed, and the follicular count was performed. F1 males were monitored until week 11, they were sacrificed, organs (testicles, kidneys, spleen, pancreas, liver, brain, and pituitary) were removed, and spermatozoa were collected from the epididymis-vas deferens tail to assess sperm quality and sperm DNA integrity. AChE activity decreased (43.6%) in pregnant females (F0) 24 hours post-treatment (GD 16). Exposure to CPF caused no effect on reproductive parameters, including gestation time, number of offspring at birth, as well as on the ratio of males to females; no difference in body weight was observed during gestation. In the F1 females, a difference in the number of days in the estrus phase was observed, but not in the follicular count. No difference was observed in the body or organ relative weights, nor in the anogenital distance, but in the average of the day when the vaginal opening was presented. On the other hand, in F1 males, there was no difference in body weight or anogenital distance, but a decrease in the relative weight of the testicles and liver. A decrease in sperm motility (8%) and viability (4%) was observed. No significant differences were observed on the DNA fragmentation index (%DFI) or chromatin condensation (%HDS) in spermatozoa. With our results, we can summarize that exposure to 5 mg/kg/day of CPF during the gestational period (GD 7-15) generates adverse reproductive effects in F1 females, including delay in the onset of puberty and alterations in estral cyclicity. Whereas in F1 males, a decrease in the relative weight of the testicles and alteration in sperm quality parameters were observed. These results suggest that intrauterine exposure to CPF has adverse generational effects on the reproductive function of female and male (F1) offspring, compromising the health of progeny.

1. INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas se definen como cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinada a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluidos los vectores de enfermedades humanas o animales, especies no deseadas de plantas o animales que causen daños durante o interfieran de otra manera con la producción, procesamiento, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos. Estos productos pueden obtenerse por extracción de las plantas o ser sintéticos (WHO, 2003). La exposición a plaguicidas altamente peligrosos (PAPs) es una preocupación a nivel mundial por los riesgos que representan para la salud y el ambiente. La exposición gestacional a contaminantes ambientales, incluyendo los PAPs, tiene efectos en el desarrollo y más aún, son el origen de algunas enfermedades en la edad adulta de la progenie. Este “origen fetal de la enfermedad” es de gran preocupación hoy en día, pues está explicando el desarrollo de enfermedades degenerativas y reproductivas, entre otras (Bejarano et al., 2017). Los reportes de la organización mundial de la salud (OMS) muestran que anualmente a nivel mundial, hay aproximadamente un millón de intoxicaciones accidentales y dos millones de intoxicaciones provocadas (suicidios), de las cuales aproximadamente 200,000 terminan en la muerte (WHO, 2003). Los principales grupos de compuestos asociados con la intoxicación por plaguicidas son los piretroides, los organofosforados (OF), los carbamatos (CB) y los organoclorados (Eddleston et al., 2002). En México, varios plaguicidas organofosforados (OF) son considerados PAPs (Bejarano et al., 2017).

1.1. Plaguicidas organofosforados (OF)

Los plaguicidas OF representan > 50% del uso total de insecticidas en todo el mundo. La mayoría de los OF son organotiofosfatos que requieren activación metabólica mediante desulfuración oxidativa para formar los oxones correspondientes; esta bioactivación está mediada por varias enzimas del citocromo P450 (CYP) (Jokanovick, 2001). Los OF se pueden absorber a través de la piel, pulmones y tracto gastrointestinal, inhiben la actividad de las acetilcolinesterasas (AChE) en el cerebro y en el sistema nervioso periférico, incluida la colinesterasa sérica (butirilcolinesterasa [BuChE], también conocida como pseudocolinesterasa) (Hofmann et al., 2009),

convirtiéndolas en enzimas no funcionales al fosforilar el grupo hidroxilo presente en el sitio activo de la enzima. La función de la AChE es hidrolizar la acetilcolina, la cual es un neurotransmisor que se une a los receptores muscarínicos y nicotínicos, por lo que su inhibición genera la acumulación de acetilcolina resultando en una sobreestimulación de las neuronas colinérgicas, provocando de esta manera un síndrome colinérgico que es característico de la intoxicación por OF (Marrero et al., 2017).

1.2. Clorpirifos (CPF)

1.2.1. Características fisicoquímicas del CPF

El CPF es un plaguicida OF clorado de amplio espectro, con el nombre IUPAC: O, O-dietil-O-(3,5,6-tricloro-2-piridinil)-fosforotioato, de peso molecular de 350.6 y fórmula química, $C_9H_{11}Cl_3NO_2PS$ (Figura 1) (Watts, 2012), no es persistente y se utiliza como plaguicida principalmente en comunidades agrícolas y urbanas. Pertenece a una clase de compuestos orgánicos llamados aril tiofosfatos y su estructura contiene el ácido tiofosfórico como grupo funcional. El CPF es un polvo cristalino de incoloro a blanco, con olor a mercaptano (tiol) y tiene baja solubilidad en agua (Rathod y Garg, 2017); sin embargo, es fácilmente soluble en aceite de maíz, benceno, dimetilsulfóxido (DMSO), metanol, acetona, xileno, cloruro de metileno, Tween 20, entre otros (Smith et al., 2009). A pesar de haber sido prohibido para uso residencial en 2001 por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés) y la eliminación gradual en la Unión Europea (UE), sigue siendo ampliamente utilizado en el mundo. Está disponible comercialmente con varios nombres: Dursban, Lorsban, Equity, Suscon, Empire20 y Whitmire PT270. El CPF (o sus metabolitos) es una de las sustancias más detectadas en el suelo y los seres humanos. Su detección en agua, frutas, verduras y cereales sugiere que la población en general ingiere de forma crónica dosis muy bajas (ANSES, 2013).

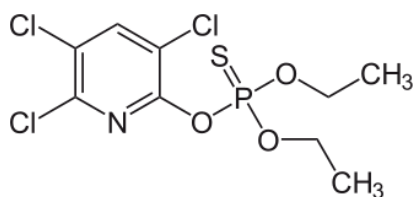


Figura 1. Estructura química del CPF.

1.2.2. Toxicocinética del CPF (ADME)

La exposición ocupacional al CPF puede ocurrir durante la mezcla, la aplicación por aspersión, la limpieza de equipos o la eliminación de contenedores, mientras que la población en general está expuesta a través de la deriva de la aspersión, los residuos presentes en los alimentos tratados y el agua potable o la exposición indirecta del medio ambiente. Las vías de exposición al CPF incluyen ingestión, inhalación y dérmica. Las exposiciones dietéticas (a niveles traza) de CPF en productos alimenticios parecen ser la principal fuente de exposición no ocupacional, tanto en el pasado como en el presente (Eaton et al., 2008). La DL_{50} oral aguda oscila entre 66 y 195 mg/kg de peso corporal (Kopjar et al., 2018). La NOAEL en ratas es de 1 mg/kg/día (Szabo et al., 1988), mientras en el caso de los seres humanos, se calculó en 0.5 mg/kg/día (Nolan et al., 1984).

1.2.2.1. Absorción

El CPF se puede absorber a través de la mucosa gastrointestinal, el epitelio pulmonar y la piel. Después de la exposición oral, el CPF es absorbido por el tracto gastrointestinal y entra al torrente sanguíneo. Al administrar una dosis de 50 mg/kg de peso corporal de CPF en aceite de maíz (en ratas) se observó una absorción de ~80% de la dosis, lo que dio como resultado la inhibición de la AChE (Timchalk et al., 2002). La $C_{máx}$ en sangre de los metabolitos dietilfosfato (DEP), dietiltiofosfato (DETP) y 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) se detectó 3 h después de la administración. Cook y Shenoy (2003) describen que ~99% del CPF fue absorbido por el intestino delgado de rata mediante el uso de un modelo de perfusión intestinal empleando tres concentraciones de CPF (0.1, 2.0 y 10 μ M). Nolan et al. (1984) reportaron una absorción de ~70% y 93%, respectivamente empleando dosis orales de 0.5 y 1 mg/kg de peso corporal de

CPF en voluntarios humanos. Se sabe que el CPF en los seres humanos y animales se absorbe a través del tracto respiratorio y la piel, al respirar y estar en contacto con aerosoles o polvo, aunque no se ha cuantificado el grado y la velocidad de absorción (Geer et al., 2004).

1.2.2.2. Distribución

No se dispone de estudios sobre la distribución del CPF y sus metabolitos en los seres humanos, sin embargo, Timchalk et al. (2002), basándose en coeficientes de partición octanol: agua y el contenido de lípidos en los tejidos, calcularon la distribución del CPF entre varios tejidos y la sangre: grasa (435:1), cerebro (33:1), hígado (22:1) y riñón (10:1). El CPF y CPF oxón parecen acumularse en el tejido adiposo. En animales gestantes, el CPF puede atravesar la placenta y llegar al feto (Abdel-Rahman et al., 2002). En los seres humanos se evidenció la presencia de CPF y sus metabolitos en el meconio posparto, lo que sugiere la absorción a través del cordón umbilical y la difusión a través de la superficie de la placenta (Whyatt y Barr, 2001).

1.2.2.3. Metabolismo

El sitio principal del metabolismo del CPF es el hígado; sin embargo, se ha documentado el metabolismo extrahepático en tejidos como el cerebro y el intestino. Las principales vías del metabolismo del CPF (Figura 2) incluyen (Chambers y Chambers, 1989; Pond et al., 1995; Poet et al., 2003):

- Desulfuración oxidativa (de P=S a P=O) catalizada por el CYP, dando como resultado el intermedio tóxico CPF oxón (bioactivación).
- Desarilación catalizada por el CYP, que da como resultado el TCP y DETP (desintoxicación).
- Hidrólisis por esterasas tipo A (paraoxonasas-PON1) de los enlaces éster fosfato del CPF oxón para formar el TCP y DEP (desintoxicación).
- Hidrólisis por esterasas tipo B (carboxilesterasa-CE y BuChE), actuando como depuradores moleculares al unirse estequiométricamente al CPF oxón (desintoxicación).
- Conjugación del CPF oxón con glutatión reducido (GSH) por las glutatión-S-transferasas (desintoxicación).

- Conjugación del TCP por glucuronil-transferasas y sulfotransferasas para formar los correspondientes conjugados de glucurónido y sulfato (desintoxicación).

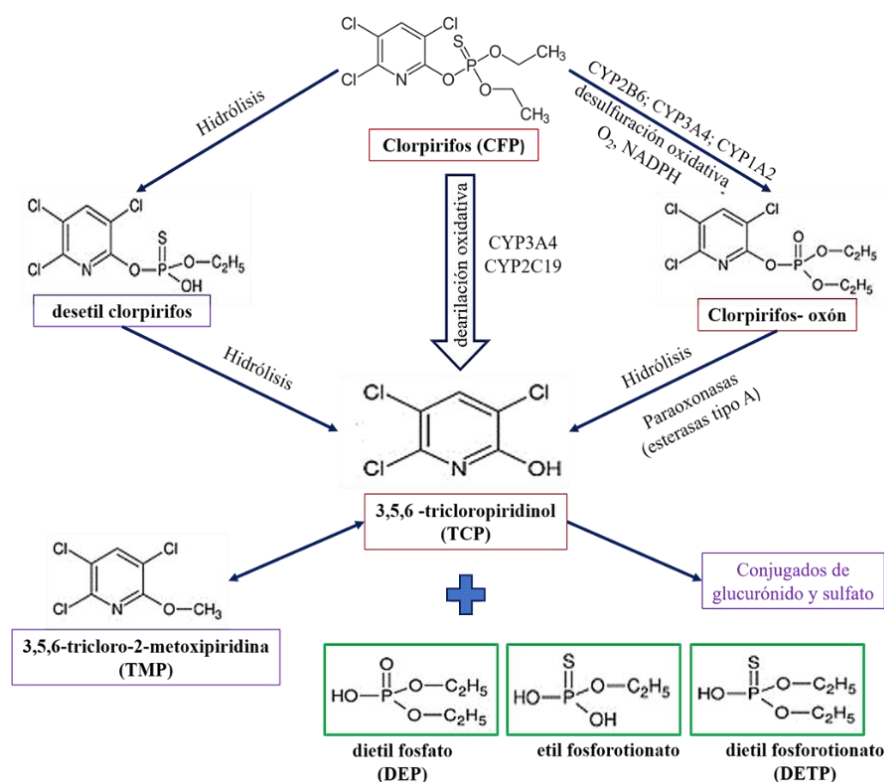


Figura 2. Vía metabólica del CPF (Solomon et al., 2014).

1.2.2.4. Excreción

La principal vía de eliminación del CPF es la excreción urinaria, con el TCP como el producto más abundante, junto con el DEP, DETP (empleados como biomarcadores de exposición), conjugados de GSH, sulfatos y glucurónidos (Bicker et al., 2005). Se ha estimado que la vida media de eliminación en los seres humanos es de 27 h, con una tasa máxima de excreción del TCP en 24 a 48 h después de la exposición (Nolan et al., 1984). El CPF también puede eliminarse en la bilis/heces como conjugados de GSH y glucurónido, que pueden hidrolizarse en el lumen intestinal y reabsorberse entrando en la recirculación enterohepática. Otra posible vía de eliminación es a través

de la leche materna que, al ser relativamente rica en grasas, puede acumular al CPF y CPF oxón (Testai et al., 2010).

1.2.3. Mecanismo de toxicidad del CPF

El mecanismo de acción principal, pero no necesariamente el único, está relacionado con la capacidad del metabolito CPF oxón para unirse e inhibir irreversiblemente a la AChE (Slotkin et al., 2005). Durante la reacción de desulfuración, la liberación de átomos de azufre activados, capaces de unirse irreversiblemente al CYP activo, provoca la pérdida de la enzima y la reducción de la correspondiente actividad monooxigenasa, llamándoseles “sustratos suicidas” (Halpert et al., 1980). Los estudios en animales muestran que la exposición a CPF por debajo del umbral de toxicidad sistémica causada por la inhibición de la AChE tiene efectos adversos en el desarrollo del cerebro y produce anomalías neuroconductuales (Slotkin, 2004). Es probable que un componente importante de la toxicidad del CPF en el desarrollo neurológico implica la interrupción de la maquinaria celular que controla la replicación y diferenciación neuronal, la apoptosis, la formación de axones, la sinaptogénesis y la formación de circuitos neurales (Mauro y Zhang, 2007). No hay evidencia de que el CPF sea hepatotóxico, nefrotóxico o inmunotóxico, tampoco se considera teratogénico en dosis menores que las que causan una inhibición de la AChE en la madre (Eaton et al., 2008).

1.2.5. Efectos tóxicos del CPF

1.2.5.1. Carcinogenicidad y genotoxicidad

La EPA no reporta evidencias de carcinogenicidad en estudios en animales, pero hay varios estudios epidemiológicos que indican que el CPF puede ser carcinogénico para los seres humanos (EPA 2009). Karunanayake et al. (2012) encontraron una asociación significativa del riesgo de cáncer de mama por la exposición a CPF (tasa de probabilidad = 5.26), en un estudio en hombres con linfoma de Hodgkin en Canadá (316 casos y 1,506 controles). Mientras que, Engel et al. (2005) observaron un riesgo leve (OR = 1.4) de cáncer de mama en las esposas de aplicadores de plaguicidas que habían usado CPF comparado con aquellas cuyos esposos no lo habían usado (OR = 1.3). Un estudio más amplio en aplicadores varones de plaguicidas en Estados Unidos

(22,431 aplicadores expuestos a CPF y 32,640 no expuestos) encontró un aumento de 2.7 veces del riesgo de cáncer rectal en la categoría de más alta exposición (Lee et al., 2007). De igual manera se ha reportado que el CPF tiene efectos sobre el ADN. Sandal y Yilmaz (2011) observaron un aumento en la tasa de migración del ADN, de acuerdo a la prueba de cometa en linfocitos humanos expuestos a 10 μM de CPF. Mientras que, Tian y Yamauchi (2003) observaron inducción de micronúcleos dependiente de la dosis en embriones de ratón de 3 días por exposición de la madre durante el período temprano de pre-implantación a las dosis de 40 y 80 mg/kg.

1.2.5.2. Efectos endocrinos del CPF

El CPF ha sido detectado en leche materna humana (0.436 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 0.363 mg/L), líquido cervical (6.83 $\mu\text{g}/\text{kg}$), semen (0.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (EPA, 2008), sangre del cordón umbilical (Samarawickrema et al., 2008) y meconio de niños recién nacidos (Ostrea et al., 2002). Se ha descrito al CPF como disruptor endocrino (Tabla 1), debido a su capacidad para inhibir el metabolismo de la testosterona y del estradiol dependiente del CYP, posiblemente como consecuencia de la interacción del sulfuro altamente reactivo liberado durante la reacción de desulfuración oxidativa con el hierro del grupo hemo (Viswanath et al., 2010). Por su parte, Ventura et al. (2012) reportaron que a dosis bajas de CPF (0.05 μM) existe un aumento en la proliferación de células mamarias cancerosas MCF-7 dependientes de estrógeno, mediadas por el receptor de estrógeno alfa (ER- α); pero a dosis altas (50 μM) indujo la detención del ciclo celular y por lo tanto disminuyó la proliferación. La modificación del avance del ciclo celular es el preámbulo de células tumorales y es clave en el avance del cáncer en seres humanos.

1.2.5.3. Efectos del CPF en la reproducción femenina

Varios estudios han encontrado efectos del CPF a nivel reproductivo femenino (Tabla 2). El CPF actúa como un antagonista del receptor de andrógenos (AR), suprimiendo así las vías de expresión génica asociadas con la síntesis de gonadotropinas hipotalámicas o esteroideogénicas. Esta supresión, a su vez, se ha atribuido a defectos en las gónadas, así como a la disminución de los niveles y la actividad de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) (Alaa-Eldin et al., 2017).

Tabla 1. Efectos endocrinos por exposición al CPF.

Estudios <i>In vitro</i>			
Efecto	Modelo	Concentración	Autores
Inhibición del metabolismo de la testosterona.	Microsomas hepáticos humanos	2 µM	Usmani et al., 2003
Inhibición del metabolismo del estradiol.	Microsomas hepáticos humanos	0.5 y 2.0 µM	Usmani et al., 2006
Disminución en la biosíntesis de la testosterona.	Células de Leydig de ratas	10 nM	Viswanath et al., 2010
- Inducción de la proliferación celular a través del receptor de estrógenos (dosis baja). - Detención de la fase G2/M y aumento de ROS (dosis alta).	Líneas celulares de cáncer de mama humano MCF-7 (ER+) y MDA-MB-231 (ER-).	0.05 y 50 µM	Ventura et al., 2012
Estudios en animales			
Reducción de las concentraciones de cortisol y tiroxina (T4) en suero.	Ovejas polipay	12.5 mg/kg 2 veces por semana/43 días	Waldbillig, 1998
Aumento en los niveles de colesterol y triglicéridos.	Ratas Sprague-Dawley	1 mg/kg DPN 1-4	Slotkin et al., 2005
Disminución de los niveles de cortisol, estradiol y testosterona en suero.	Tilapia del Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	5-15 ppb	Oruç, 2010
Estudios en humanos			
Niveles del metabolito TCP en orina asociados a la disminución de estradiol.	322 varones	Rango: 0.58-40.7 µg/L Media: 2.59 µg/ L	Meeker et al., 2008

*ROS= Especies de oxígeno reactivas; DPN= día post natal; TCP= 3,5,6-trichloro-2-pyridinol.

1.2.5.4. Efectos del CPF en la reproducción masculina

La exposición a diversos tóxicos ambientales, incluidos plaguicidas como el CPF, se ha relacionado con la inducción de varios defectos del sistema reproductivo, incluido el deterioro de la función del sistema reproductor masculino y la infertilidad (Sharma et al., 2014). Se han descrito alteraciones en el tracto reproductivo masculino, disminución en la calidad espermática, alteración de la estructura de la cromatina de los espermatozoides y una capacidad fértil disminuida en machos expuestos a diferentes dosis de CPF (Tabla 3).

Tabla 2. Efectos en la reproducción masculina por exposición a CPF.

Efecto	Modelo	Dosis	Autores
Disminución de la motilidad espermática.	Ratones CD1	25 mg/kg/día 4 semanas	Farag et al., 2010
- Disminución en el peso relativo los testículos y epidídimos. - Aumento en el peso relativo del hígado, riñón y glándula suprarrenal. - Disminución del número de túbulos seminíferos, de los niveles de testosterona y T4.	Ratas Wistar	20 mg/kg/día 30 días	Mosbah et al., 2012
- Disminución de espermátidas y del número de espermatozoides. - Aumento de los espermatozoides muertos y anormales.	Ratas Wistar	20 mg/kg/día 4 semanas	Mosbah et al., 2016
- Disminución del peso testicular, y de la calidad espermática. - Incremento en el índice de fragmentación del ADN espermático. - Disminución de los niveles séricos de testosterona, LH y FSH.	Ratas Wistar	6,75 mg/kg/día 12 semanas	Alaa-Eldin et al., 2017
- Disminución de la calidad espermática, aumento de los espermatozoides inmaduros. Espermatogénesis detenida. - Daño del ADN de los espermatozoides. - Disminución del número de células de Leydig.	Ratas Wistar	37 mg/kg/día 45 días	Babazadeh y Najafi, 2017

*T4= Tiroxina; LH= Hormona luteinizante; FSH= Hormona folículo estimulante

1.2.6. Efectos del CPF en la progenie

Uno de los primeros estudios en asociar la herencia transgeneracional de enfermedades en mamíferos fue una investigación de los efectos del fungicida vinclozolina (100 ó 200 mg/kg/día, DG 8-15 en ratas), en la cual se reportó que la generación F3 presentó un aumento en la apoptosis de las células germinales testiculares y una disminución de la motilidad de los espermatozoides (Anway et al., 2005). Por su parte, Manikkam et al. (2014) reportaron una disminución de la fertilidad masculina, aumento en la incidencia de enfermedad renal y obesidad en la generación F1 y F3 por exposición al metoxicloro (200 mg/kg/día, DG 8-14 en ratas). En otro estudio, McBirney et al. (2017) observaron que la generación F1 de ratas expuestas directamente a 25 mg/kg/día de atrazina (DG 8-14) no desarrolló enfermedad, la F2

mostró una frecuencia mayor de enfermedad testicular y tumores mamarios en ambos sexos, pubertad de inicio temprano en los machos y disminución del peso corporal en las hembras, mientras que en la F3 se presentó una frecuencia mayor de enfermedad testicular, pubertad de inicio temprano, alteraciones del comportamiento (hiperactividad motora) y un fenotipo delgado en ambos sexos.

Existe poca información sobre los efectos ocasionados en la progenie por la explosión al CPF, sin embargo, existen reportes que nos indican que es posible que se presenten efectos negativos en la descendencia (Tabla 4). El CPF y sus metabolitos se detectaron en muestras de orina de un estudio de cohorte de mujeres embarazadas (7.1 $\mu\text{g/L}$ ó 16.70 $\mu\text{g/g}$ de creatinina) (Chevrier et al., 2009) y en la sangre del cordón umbilical (≥ 4.39 pg/g) de una cohorte de niños (exposición prenatal a CPF) (Rauh et al., 2012). Los insecticidas OF en los seres humanos se han detectado en el líquido amniótico (Bradman et al., 2003) y atraviesan fácilmente la placenta (CPF media 3.7 ± 5.7 (rango 0.3–63) pg/g) (Whyatt et al., 2005). Las exposiciones prenatales a CPF y otros plaguicidas OF se han relacionado con un tamaño de cabeza más pequeño (Berkowitz et al., 2004), peso bajo al nacer (Whyatt et al., 2004) y reflejos neonatales desviados (Engel et al., 2007). Los efectos reproductivos en la progenie (F1) ocasionados por la exposición a dosis bajas de CPF no están caracterizados, por lo que se planea iniciar el estudio de efectos multi y transgeneracionales.

Tabla 3. Efectos en la reproducción femenina por exposición al CPF.

Efecto	Modelo	Dosis	Autores
Pérdida de peso corporal y deterioro de la actividad de la AChE. Fetotoxicidad.	Ratas Fischer	15 y 25 mg/ kg/día	Farag et al., 2003
- Reducción de la maduración nuclear de los ovocitos y bloqueo de la acción de las hormonas. - Ovotoxicidad y embriotoxicidad.	Ovarios de búfalos	0.02 µg / mL	Nandi et al., 2011
- Inducción de apoptosis en células placentarias, reducción general del crecimiento y la proliferación celular.	Células de coriocarcinoma placentario humano (JAR)	60 µM	Saulsbury et al., 2008
- Interrupción en la ciclicidad del estro con un meta-estro prolongado. - Aumento en la altura del epitelio de la superficie del ovario, en el diámetro de la glándula endometrial el diámetro folicular. Atresia folicular.	Ratas Wistar	0,1 y 2,5 mg/kg/día 8 semanas	Nishi y Hundal, 2013
- Aumento en marcadores de estrés oxidante (H ₂ O ₂ y MDA), inflamatorios (MPO y TNF-α) y apoptóticos (caspasa-3), alteración del estado antioxidante (catalasa, SOD y GST), en el cerebro, ovario y útero.	Ratas Wistar	5 mg/kg/día 35 días	Abolaji et al., 2017

*MDA= Malondialdehído; MPO= Mieloperoxidasa; TNF-α= Factor de necrosis tumoral alfa; SOD= Superóxido dismutasa; GST= Glutación S-transferasa.

Tabla 4. Efectos en la descendencia por exposición al CPF.

Estudios en Animales			
Efecto	Modelo	Dosis	Autores
- Interfiere con la diferenciación sexual del cerebro (relacionado a los receptores 5HT).	Ratas Sprague-Dawley	1 y 5 mg / kg DG 9-12 DG 17-20	Aldridge et al., 2004
- Pubertad temprana en las crías. - Aumento en los niveles de ARNm de GnRH en crías adultas.	Ratas (no específica la cepa)	Dosis única de 1 mg/kg en el DG 16.	Gore, 2001
- Anormalidades físicas en las crías (extremidades pequeñas delanteras y traseras, así como falta de desarrollo de la columna).	Ratas Sprague-Dawley	0.3 mg/kg DG 0-7	Muto et al., 1992
- Disminución del peso y la viabilidad fetal. - Muerte fetal y reabsorción temprana.	Ratas Fischer	25 mg/kg DG 6-15	Farag et al., 2003
- Reducción en la cantidad de fetos vivos y aumento en las reabsorciones. - Malformaciones de la columna, paladar hendido, ausencia de vértebras en el torácicas y caudales.	Ratones CD 1	80 mg/kg DG 10	Tian et al., 2005
Estudios en Humanos			
- Defectos del cerebro, ojos, oídos, paladar, dientes, corazón, pies, pezones y genitales. - Malformaciones cerebrales en los ventrículos, cuerpo calloso, plexo coroidal y septum pellucidum. - Malformaciones genitales como criptorquidia, microphallu y labios de la vagina fusionados.	4 niños	Madres expuestas durante el embarazo (No mencionan concentración)	Sherman, 1996
Bajo peso al nacer y menor longitud.	314 pares madre-recién nacido	4.0 ± 6.1 pg/g en cordón umbilical	Whyatt et al., 2004
Bajo peso al nacer y menor circunferencia de la cabeza.	263 mujeres	7.6 pg/g en cordón umbilical y 7.1 pg/g en sangre materna	Perera et al., 2003

*DG= Día Gestacional; 5HT= 5-hidroxitriptamina; GnRH= Hormona liberadora de gonadotropina.

1.3. Justificación

La exposición a contaminantes ambientales como los PAPs, dentro de los que se encuentra los plaguicidas OF como el CPF, tiene un gran impacto en la salud reproductiva en la población en general. Sin embargo, la constante necesidad de controlar a los vectores transmisores de enfermedades ha ocasionado el aumento en el uso incontrolado de estos plaguicidas. El CPF está clasificado como moderadamente peligroso por la OMS y como moderadamente tóxico por la EPA, no obstante, son cada vez más los estudios que reportan los efectos tóxicos ocasionados por la exposición a este plaguicida. La exposición a CPF se ha relacionado con la reducción del peso testicular y número de espermatozoides, necrosis en los túbulos seminíferos y alteración de la estructura de la cromatina espermática. También se ha reportado la reducción del peso ovárico y de la producción de folículos, niveles bajos de las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH), interrupción del ciclo estral e infertilidad. Se ha descrito al CPF como disruptor endocrino, debido a su capacidad para inhibir el metabolismo de la testosterona y del estradiol. Existe poca información sobre los efectos ocasionados en la progenie por la exposición a CPF, entre ellos una pubertad de inicio temprano, disminución del peso y la viabilidad fetal. Actualmente no existen estudios que describan los efectos multigeneracionales a nivel reproductivo ocasionados por la exposición a dosis bajas de CPF, ni los posibles mecanismos por los que se lleva a cabo. Por lo que fue de interés del presente trabajo evaluar los efectos reproductivos por exposición intrauterina a dosis bajas de CPF en un modelo de ratones hembra y macho F1. Esto permitirá generar datos clave para establecer y comprender los posibles efectos a nivel reproductivo ocasionados por la exposición a CPF y a su vez, contribuir a la reevaluación del riesgo del uso del CPF, con la finalidad de tener un mejor control del uso y comercialización de este.

1.4. Hipótesis

La exposición intrauterina a dosis bajas de CPF produce efectos reproductivos en ratones hembra y macho F1.

1.5. Objetivo general

Evaluar los efectos reproductivos por exposición intrauterina a dosis bajas de CPF en ratones hembra y macho F1.

1.6. Objetivos particulares

- 1) Evaluar parámetros generales neonatales: número de crías nacidas vivas y muertas y sexo.
- 2) Evaluar los efectos reproductivos en la descendencia femenina (F1): inicio de la pubertad, conteo folicular y ciclicidad estral.
- 3) Evaluar los efectos reproductivos en la descendencia masculina (F1): calidad espermática e integridad del ADN espermático.
- 4) Cuantificar la actividad de la AChE en la madre gestante (F0) como biomarcador de toxicidad y exposición.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Reactivos

El clorpirifos (O, O-dietil O-3,5,6-trichloropyridin-2-il fosforotioato) con una pureza de 98.6% se obtuvo de Chem-Service® (PA, USA), el aceite de maíz libre de tocoferol se obtuvo de MP biomedicals (Ilikirch, France). El tritón x100, etopropazina, floxina B, hematoxilina y eosina Y 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 kit de tinción rápida EspermaForm se adquirió de Laboratorio Fertimexico S.A. de C.V. (Ciudad de México, México). El naranja de acridina (NA) se obtuvo de USB Amersham Life Science (Amersham, UK).

2.2. Diseño experimental

El diseño experimental se presenta en la figura 3.

2.3. Modelo animal

Se usaron ratones hembra (6-7 semanas de edad, F0) y macho (12 semanas de edad) CD1 (cría de colonias del Cinvestav), los cuales se alojaron en jaulas de polisulfona convencionales en un ciclo de 12:12 (luz-oscuridad) a 25 °C. Los animales tuvieron acceso al alimento y agua de bebida *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales con animales se realizaron conforme a los lineamientos internacionales para el Uso y Cuidado de Animales de laboratorio, de acuerdo con el protocolo No. 0333-22 aprobado por el Comité de Investigación para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Cinvestav (CICUAL).

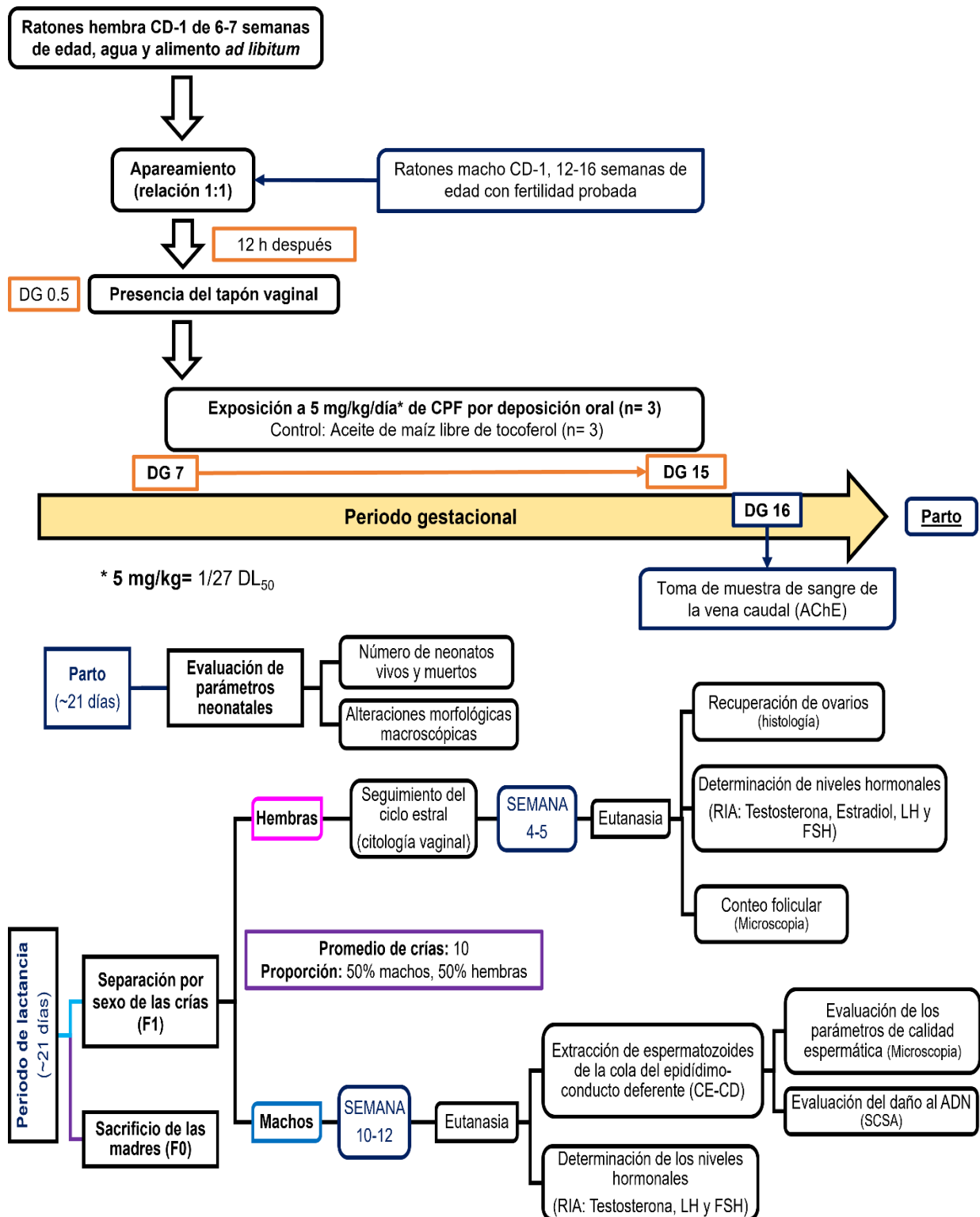


Figura 3. Diseño experimental. Se presenta el esquema general de trabajo y las técnicas experimentales empleadas. AChE, acetilcolinesterasa; CPF: clorpirifos; DG: día gestacional; FSH: hormona foliculoestimulante; LH: hormona luteinizante; RIA, radioinmunoensayo; SCSA: *Sperm Chromatin Structure Assay*.

2.4. Exposición de los animales

Una vez identificado el tapón vaginal, los ratones hembra se administraron con aceite de maíz libre de tocoferol (control, n=5) o CPF (grado técnico; dosis 5 mg/kg/día, n=5) por deposición oral desde el DG 7 hasta el DG 15. Antes y después del tratamiento, los ratones hembra recibieron alimento estándar y agua *ad libitum*. La dosis se eligió a conveniencia por ser el primer estudio de su tipo y considerando que 1 mg/kg/día es la dosis a la que no se observa efecto (NOAEL) (Nishi y Hundal, 2013) y 6.75 mg/kg/día es la dosis a partir de la cual se ha reportado un efecto oxidante en ratas hembra (Wistar), tanto en los ovarios como en la tiroides (Chebab et al., 2017). El embarazo se dejó a término y después del destete, los animales hembra se mantuvieron hasta las 6ª semana de edad y los macho hasta la 12ª semana, cuando se les practicó la eutanasia por dislocación cervical.

2.5. Actividad de la AChE

2.5.1. Fundamento

La actividad de la AChE se evaluó para determinar la exposición y toxicidad del CPF, mediante el método descrito por Ellman et al. (1961). El método se basa en que la AChE degrada la acetiltiocolina produciendo tiocolina, la tasa de formación de tiocolina se monitorea a través de la reacción del grupo tiol de la tiocolina con el DTNB [5,5'-ditio-bis-(2-ácido nitrobenzoico)] que da lugar a la formación de un anión de color amarillo, 5-tio-2-nitrobenzoato, que provoca un aumento de absorbancia a 410 nm que es proporcional a la actividad de la enzima.

2.5.2. Procedimiento

Se tomaron muestras sanguíneas de las hembras expuestas (F0) a CPF a partir de la vena caudal antes y un día después de la última administración (DG 0 y 16). La velocidad de hidrólisis de la acetiltiocolina se midió espectrofotométricamente a 405-410 nm durante 3 min para obtener el cambio de absorbancia por minuto. La actividad se expresó como μmol de tiocolina/min/ml de sangre.

2.6. Parámetros generales neonatales

Al momento del nacimiento se realizó el registro del número de crías nacidas (vivas y muertas), el peso corporal de cada una y la distancia anogenital (sexado). Para dicho propósito se pesaron las crías y se midió la distancia entre la papila genital y la apertura anal, la cual es casi el doble en los machos. El tamaño de la papila genital es también ligeramente mayor en los machos.

2.7. Efectos reproductivos en la descendencia femenina (F1)

2.7.1. Ciclicidad estral

Las muestras vaginales se obtuvieron diariamente en la generación F1 durante un período de 30 días. Las muestras se analizaron al microscopio y se clasificaron según su morfología en estro, proestro, diestro y metaestro. Esta técnica se realiza de acuerdo con protocolos estándar.

2.7.2 Histología

2.7.2.1. Fundamento

La histología es una técnica útil para la evaluación de la morfología de los tejidos. Esta técnica consiste en la inclusión de tejidos (previamente fijados) en parafina para proporcionar cortes que muestran imágenes de estructuras tisulares contrastadas con una tinción (Cormack, 1987). Las tinciones de los cortes histológicos permiten obtener un contraste de color mediante la combinación de colorantes ácidos y básicos. La hematoxilina, al ser un colorante básico, tiñe de color morado a los ácidos como el ADN y ARN; mientras que la eosina, al ser colorante ácido, tiñe de color rosado a las bases.

2.7.2.2. Procedimiento

El tejido (ovario) se fijó en p-formaldehído al 4% durante 24 horas, se lavó y deshidrató en una serie de concentraciones crecientes de soluciones alcohólicas hasta alcanzar 100% de alcohol. Se enjuagó y se incluyó en parafina para su posterior corte en láminas de 8 μ m. La parafina se disolvió y se eliminó con xileno. Las secciones de

tejido se rehidrataron y se sometieron a la tinción con hematoxilina y eosina para el análisis de microscopía óptica.

2.7.3. Conteo folicular

El conteo de los folículos ováricos se realizó de acuerdo con las especificaciones de Benedict et al. (2000). Cada diez cortes histológicos de ovario (seccionados en serie de cortes de 8 μ M) se marcaron para su análisis y los folículos fueron clasificados como: primordiales, primarios, preantrales, antrales y preovulatorios de acuerdo a sus respectivas características. Los folículos primordiales eran aquellos rodeados de una capa de células de la granulosa con forma aplanada o una capa incompleta de células de la granulosa con forma cúbica; los folículos primarios eran aquellos rodeados de una capa completa de células de la granulosa de forma cúbica; los folículos secundarios eran aquellos que tenían dos o más capas de células de la granulosa sin espacio antral; los folículos antrales presentaban el espacio antral o antro; y los folículos ovulatorios presentaban el espacio antral y el complejo ovocito-células del cúmulo a punto de separarse de las células de la granulosa. Para contabilizar a los folículos solo se tomaron en cuenta aquellos que contenían ovocitos con un núcleo visible. El número de folículos contados por estadio de desarrollo se multiplicaron por un factor de 10 y el resultado se consideró como número total de folículos de ese estadio de desarrollo.

2.8. Efectos reproductivos en la descendencia masculina (F1)

2.8.1. Obtención de espermatozoides y calidad espermática

Los espermatozoides se obtuvieron de la cola del epidídimo-conducto deferente mediante disgregación mecánica en solución de fosfatos (PBS) atemperada a 36 °C. Los parámetros de calidad de los espermatozoides, incluida la concentración, viabilidad, motilidad y morfología se evaluaron de acuerdo con las directrices de la OMS (2021).

2.8.2. Concentración

La concentración se determinó en un hematocitómetro. Se realizó una dilución de la suspensión espermática (generalmente de 1:50 v/v) en PBS 1X con Tritón X100 al

0.1%. Los espermatozoides se contaron por microscopía de contraste de fases. La concentración se expresó como el número de células x 10⁶/mL.

2.8.3. Motilidad

La motilidad se evaluó colocando 10 µL de la suspensión espermática y 10 µL de solución salina (0.9%) en un portaobjetos, el cual se cubrió con un cubreobjetos para posteriormente observar a los espermatozoides por microscopía de contraste de fases. La muestra se mantuvo sobre una placa de calentamiento a una temperatura de 36.5 °C. Se evaluaron 200 espermatozoides y se contaron los que presentaron motilidad progresiva. El resultado se expresó en porcentaje.

2.8.4. Morfología

La morfología se evaluó tomando una alícuota de 10 µL de la suspensión espermática para realizar un extendido y posteriormente se realizó la tinción empleando el kit Espermaform que nos permitió observar las características de la cabeza, cuello y cola de los espermatozoides. Se evaluó la presencia y morfología del acrosoma (morado claro), núcleo (morado oscuro), parte media y flagelo (verde oscuro) y residuo citoplásmico (morado claro). Se analizaron 200 células y el resultado se expresó en porcentaje.

2.8.5. Viabilidad

La viabilidad de los espermatozoides se evaluó por la técnica de eosina-nigrosina: los espermatozoides vivos eran blancos y los muertos se teñían de rojo. La nigrosina provee un fondo oscuro que facilita el análisis de los frotis y el resultado se expresó en porcentaje de células vivas sobre un total de 200 células.

2.8.6. Integridad del ADN espermático

2.8.6.1. Fundamento

La integridad del ADN espermático se evaluó mediante el ensayo de la estructura de a cromatina (SCSA, por sus siglas en inglés: *Sperm Chromatin Structure Asssay*) realizada por citometría de flujo (Evenson, 2016). Se utiliza el fluorocromo naranja de

acridina que es permeable a las células y florece verde al intercalarse en la doble hebra (ADN íntegro) o rojo al intercalarse en la hebra sencilla (ADN fragmentado).

2.8.6.2. Procedimiento

Alícuotas de 2×10^6 espermatozoides se suspendieron en 100 μ l de solución amortiguadora TNE (Tris HCl 17 mM, NaCl 50 mM y EDTA 7 mM, pH 7.4). Después se agregó 200 μ l de solución permeabilizante pH 1.2 (Tritón X-100 0.1%, NaCl 0.15 M y HCl 0.08 N) para llevar a cabo la desnaturalización ácida del ADN. Posteriormente se agregaron 600 μ l de una solución de naranja de acridina (6 μ g/mL en solución amortiguadora de tinción: ácido cítrico 0.1 M, Na₂PO₄ 0.2 M, EDTA 1 mM, NaCl 0.15 M, pH 6.0). Tres minutos después, las muestras se analizaron (por duplicado) en el citómetro de flujo FACScalibur, evaluando 5,000 eventos a un flujo de 200-250 cél/seg. La fluorescencia verde se detectó a una longitud de onda de 530 ± 15 nm y la roja a una de 600 ± 20 nm. Los datos obtenidos se analizaron con el software SCSASoft® (SCSA Diagnostics, Inc., Brookings, SD) para obtener los parámetros de %HDS (por sus siglas en inglés: *High DNA Stainability*), que indica una falta de protaminación o defectos en las proteínas que empaquetan al ADN, y %DFI (por sus siglas en inglés: *DNA Fragmentation Index*), que representa defectos en el DNA de los espermatozoides (Evenson 2016).

2.9. Análisis estadístico

La prueba de Kolmogórov-Smirnov se utilizó para evaluar la normalidad de los datos y posteriormente se realizó la prueba t-Student para comparar controles *versus* tratados. Los datos se analizaron con el Software Graph Pad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego CA, EU). Los resultados se expresaron como la media \pm DE y se consideró un valor de $p \leq 0.05$ como significativo.

3. RESULTADOS

3.1. Efecto del CPF en hembras gestantes (F0)

3.1.1. Efecto en la actividad de la AChE

Se determinó la actividad de la enzima AChE, la cual es considerada como un biomarcador de exposición y de efecto para los OF. Se observó una disminución de 43.6% en el grupo tratado a la dosis de 5 mg/kg/día, 24 horas post-tratamiento (DG 16) respecto al grupo control (Figura 4).

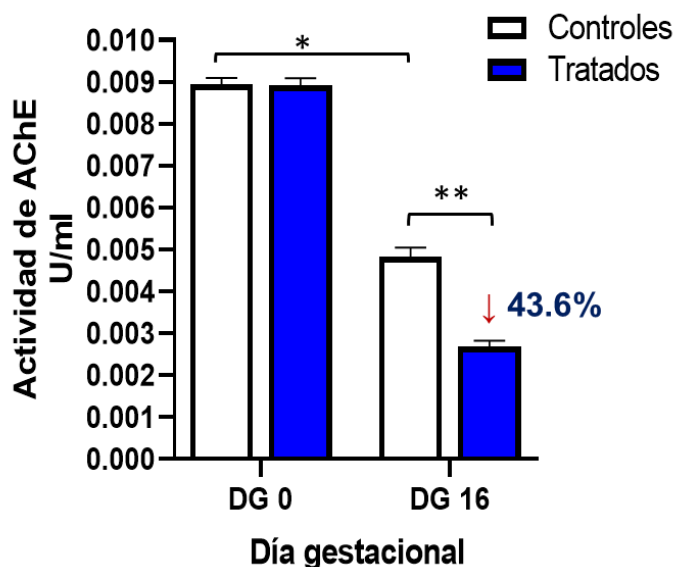


Figura 4. Actividad de la AChE eritrocitaria en ratones hembra expuestos a 5 mg/kg/día de CPF del DG 7-15 (vía oral). Se presentan los resultados de las muestras obtenidas antes del tratamiento (DG 0) y 24 h post-tratamiento (DG 16). Los valores se expresan como la media \pm DE del grupo control (n=3) vs. el grupo tratado (n=3). * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$ de acuerdo a la prueba t-Student.

3.1.2. Efecto en el peso durante el periodo gestacional

Se realizó el monitoreo del peso corporal en las hembras durante el periodo gestacional los días 1, 4, 7, 10, 13 y 16, sin observar diferencias entre el grupo control y el tratado en ninguna de los días (Figura 5).

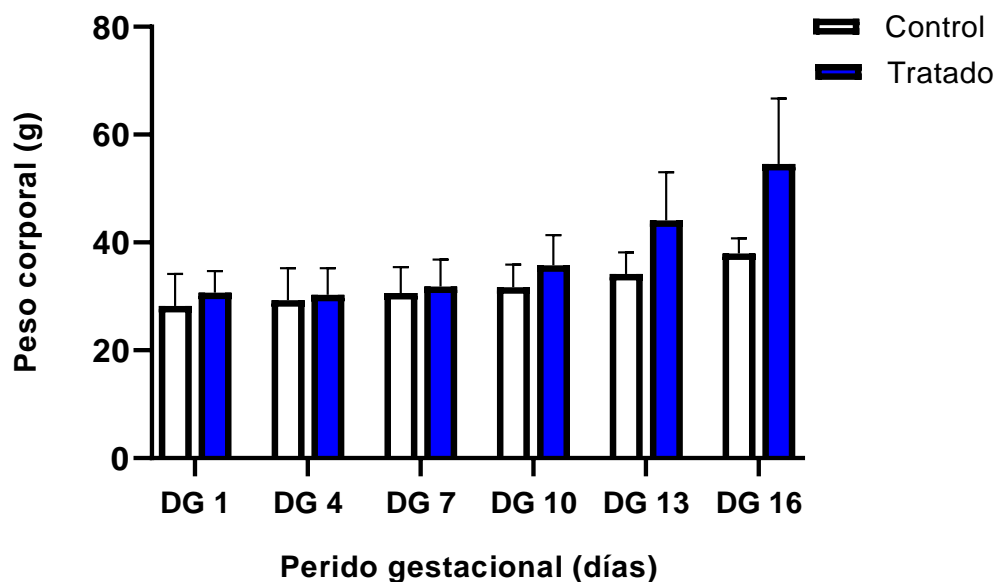


Figura 5. Peso corporal de las hembras expuestas a 5 mg/kg/día durante el periodo gestacional (DG 7-15). Se presentan los pesos obtenidos de las hembras durante el periodo gestacional (días 1, 4, 7, 10, 13 y 16). Los valores se expresan como la media \pm DE del grupo control (n=3) vs. el grupo tratado (n=3). * $p \leq 0.05$ de acuerdo a la prueba t-Student.

3.1.3. Efecto en los parámetros reproductivos de las hembras gestantes

La exposición a CPF no causó efectos en los parámetros reproductivos de las hembras, incluyendo el tiempo de gestación, el número de crías en el parto, así como en la proporción de machos y hembras entre el grupo control y el grupo tratado (Tabla 5).

Tabla 5. Efecto de la exposición al CPF en parámetros reproductivos de las hembras gestantes.

Parámetro	Control (n= 3)	Tratado (n= 3)	Valor P \diamond
Periodo gestacional (días)	21	19	0.1000
Número de crías	8	9	0.9999
Número de hembras	3	4	0.7706
Número de machos	5	5	0.9999

\diamond Se presentan los valores expresados como la media \pm DE del grupo control (n=3) vs. el grupo tratado (n=3). * $p \leq 0.05$ de acuerdo con la prueba t-Student.

3.2. Efectos reproductivos del CPF en las hembras F1

3.2.1. Efecto en el peso corporal y relativo de los órganos

Se realizó el monitoreo del peso de las hembras F1 (n=14) provenientes de dos hembras gestantes control (n=6) y de dos hembras tratadas (n=8), desde el destete hasta el día del sacrificio. Solo se observó una diferencia significativa en el peso en la semana tres correspondiente al tiempo del destete respecto al grupo control (Tabla 6). De igual manera, al momento del sacrificio se pesaron los órganos (ovarios, riñones, bazo, páncreas, hígado, cerebro y pituitaria) y no se observó diferencia en el peso relativo de los mismos entre el grupo control y el tratado (Tabla 7).

Tabla 6. Efecto de la exposición al CPF en el peso de las hembras F1 desde el destete hasta el día del sacrificio.

No. semana	Peso corporal (g)		Valor P ♦
	Controles (n= 6)	Tratadas (n= 8)	
Semana 3	14.33	12.33	0.003
Semana 4	19.03	19.85	0.446
Semana 5	22.63	22.61	0.992
Semana 6	24	23.11	0.441

♦ Se presentan los resultados preliminares del peso de las hembras F1 provenientes de dos hembras gestantes control y dos hembras tratadas. Los valores se expresan como la media \pm DE del grupo control (n=6) vs. el grupo tratado (n=8). * $p \leq 0.05$ de acuerdo a la prueba t-Student.

3.2.2. Efecto en la distancia anogenital y en la apertura vaginal

Al momento del destete (día 21), se midió la distancia anogenital, y de igual manera se realizó el monitoreo diario de las hembras F1 para establecer el día en el que se presentó la apertura vaginal. No se observó diferencia en la distancia anogenital entre el grupo tratado y control, sin embargo, si se observó diferencia significativa en el promedio del día en el que se presentó la apertura vaginal (Tabla 8).

Tabla 7. Efecto de la exposición al CPF en el peso relativo de los órganos de las hembras F1.

Órgano	Peso relativo		Valor P ♦
	Hembras control (n= 2)	Hembras tratadas (n=2)	
Ovario Derecho	0.0002	0.0003	0.1
Ovario Izquierdo	0.0001	0.0002	0.3
Riñón derecho	0.006	0.0071	0.3
Riñón izquierdo	0.006	0.0075	0.3
Bazo	0.002	0.003	0.3
Páncreas	0.009	0.006	0.3
Hígado	0.067	0.034	0.1
Cerebro	0.012	0.014	0.1
Pituitaria	0.0002	0.0002	0.7

♦ Se presentan los resultados preliminares del peso relativo de los órganos de hembras F1 provenientes de dos hembras gestantes control y dos hembras tratadas. Los valores se expresan como la media \pm DE del grupo control (n=2) vs. el grupo tratado (n=2). * $p \leq 0.05$ de acuerdo a la prueba t-Student.

Tabla 8. Efecto de la exposición al CPF en la distancia anogenital y la apertura vaginal en hembras F1.

Parámetro	Controles (n= 6)	Tratadas (n= 8)	Valor P ♦
Distancia anogenital (mm/peso)	0.40	0.37	0.099
Apertura vaginal (días)	31.5	35.9	0.001

♦ Se presentan los resultados preliminares del peso de las hembras F1 provenientes de dos hembras gestantes control y dos hembras tratadas. Los valores se expresan como la media \pm DE del grupo control (n=6) vs. el grupo tratado (n=8). * $p \leq 0.05$ de acuerdo a la prueba t-Student.

3.2.3. Efecto en el ciclo estral y en el conteo folicular

A partir de que las hembras F1 presentaron la apertura vaginal, se inició el monitoreo del ciclo estral mediante citología vaginal hasta el momento del sacrificio (semana 6 de edad). Se observó una diferencia en el número de días que las hembras F1 del grupo tratado pasó en la fase de estro, respecto al grupo control, pero no se presentó diferencia en los días que pasaron en el resto de las fases del ciclo estral (Figura 6). Al momento del sacrificio se conservaron los ovarios de las hembras F1 para realizar la histología y el conteo folicular; no se presentaron diferencias en el número de folículos entre las hembras del grupo control y tratado (Tabla 9).

3.3. Efectos reproductivos del CPF en los machos F1

3.3.1. Efecto en el peso corporal y relativo de los órganos

Se realizó el monitoreo del peso de los machos F1 (n=20) provenientes de dos hembras gestantes control (n=10) y de dos hembras tratadas (n=10), desde el destete hasta el día del sacrificio. Solo se observó diferencia en el peso en la semana cuatro en los machos F1 provenientes de las hembras gestantes expuestas respecto al grupo control (Tabla 10). De igual manera, al momento del sacrificio se pesaron los órganos (testículos, riñones, bazo, páncreas, hígado, cerebro y pituitaria) y se observó una disminución en el peso relativo de los testículos y un incremento en el peso relativo del hígado entre el grupo control y el tratado (Tabla 11).

3.3.2. Efecto del CPF en la distancia anogenital y en la calidad espermática

Al momento del destete (día 21) se midió la distancia anogenital de los machos F1. No se observó diferencia en la distancia anogenital entre el grupo tratado y control (Figura 7). De igual manera, al momento del sacrificio se evaluaron los parámetros de calidad espermática y se observó una disminución en la motilidad (8%) y en la viabilidad (4%) espermáticas en los machos F1 provenientes de las hembras expuestas durante la gestación. No se observaron diferencias en la concentración o morfología espermáticas (Figura 8).

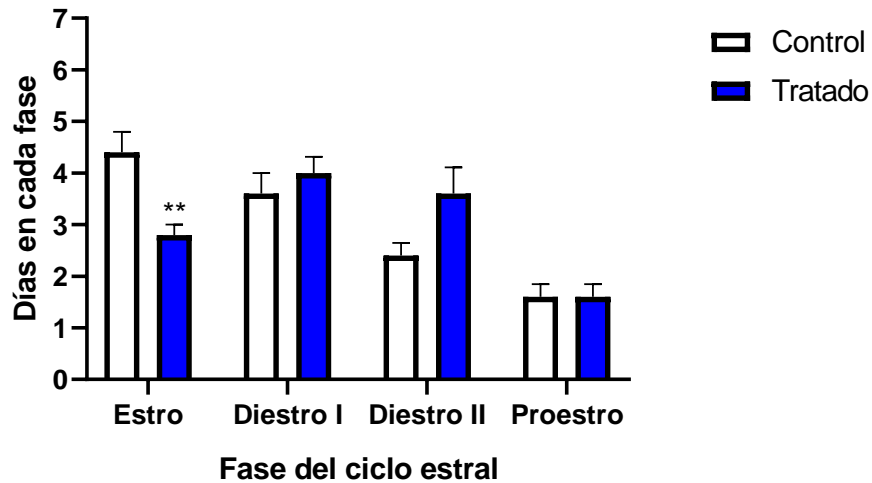


Figura 6. Alteración del ciclo estral en las hembras expuestas a 5 mg/kg/día durante el periodo gestacional (DG 7-15). Se presentan los resultados preliminares del número de días que pasaron en cada fase las hembras F1 provenientes de dos hembras gestantes control y dos hembras tratadas. Los valores se expresan como la media \pm DE del grupo control (n=6) vs. el grupo tratado (n=8). * $p \leq 0.05$ de acuerdo a la prueba t-Student.

Tabla 9. Efecto de la exposición al CPF en el conteo folicular de las hembras F1.

No. de folículos	Hembras control (n= 2)	Hembras tratadas (n= 2)	Valor P \diamond
Folículos primordiales	202	197.5	0.486
Folículos primarios	103	96.5	0.069
Folículos preantrales	52	48	0.106
Folículos antrales	46	44	0.293

\diamond Se presentan los resultados preliminares del conteo folicular de las hembras F1 provenientes de dos hembras gestantes control y dos hembras tratadas. Los valores se expresan como la media \pm DE del grupo control (n=2) vs. el grupo tratado (n=2). * $p \leq 0.05$ de acuerdo a la prueba t-Student.

Tabla 10. Efecto de la exposición al CPF en el peso de los machos F1 desde el destete hasta el día del sacrificio.

No. semana	Peso corporal (g)		Valor P ♦
	Controles (n= 10)	Tratados (n= 10)	
Semana 3	15.11	14.66	0.367
Semana 4	23.10	21.04	0.001
Semana 5	26.68	26.12	0.353
Semana 6	28.09	28.74	0.422
Semana 7	29.94	29.28	0.444
Semana 8	31.24	30.38	0.320
Semana 9	31.54	30.82	0.378
Semana 10	32.44	31.38	0.184
Semana 11	33.43	32.70	0.310

♦ Se presentan los resultados preliminares del peso corporal de machos F1 provenientes de dos hembras gestantes control y dos hembras tratadas. Los valores se expresan como la media \pm DE del grupo control (n=2) vs. el grupo tratado (n=2). * $p \leq 0.05$ de acuerdo a la prueba t-Student.

3.3.3. Efecto del CPF en la estructura de la cromatina espermática

Se evaluó el índice de fragmentación del ADN (%DFI) y la condensación de la cromatina (%HDS) en espermatozoides (obtenidos al momento del sacrificio) de los machos F1 provenientes de dos hembras gestantes control (n=10) y de dos hembras tratadas (n=10). No se observó diferencia significativa entre los machos F1 provenientes de las hembras gestantes expuestas respecto al grupo control (Figura 9).

Tabla 11. Efecto de la exposición al CPF en el peso relativo de órganos de los machos F1.

Órgano	Peso relativo de los órganos		
	Control (n= 10)	Tratados (n= 10)	Valor P
Testículo derecho	0.0028	0.0023	0.0008
Testículo izquierdo	0.0026	0.0021	0.0009
Riñón derecho	0.0051	0.0054	0.3263
Riñón izquierdo	0.0049	0.0051	0.3697
Bazo	0.0017	0.0017	0.6764
Páncreas	0.0063	0.0056	0.2009
Hígado	0.0321	0.0379	<0.0001
Cerebro	0.0073	0.0074	0.9197
Pituitaria	0.00024	0.00028	0.3553

♦ Se presentan los resultados preliminares del peso relativo de órganos de los machos F1 provenientes de dos hembras gestantes control y dos hembras tratadas. Los valores se expresan como la media \pm DE del grupo control (n=10) vs. el grupo tratado (n=10). * $p \leq 0.05$ de acuerdo a la prueba t-Student.

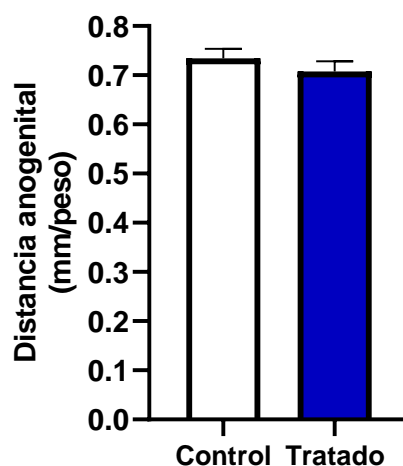


Figura 7. Efecto en la distancia anogenital de los machos F1 provenientes de hembras expuestas a 5 mg/kg/día durante el periodo gestacional (DG 7-15). Se presentan los resultados preliminares de la distancia anogenital de los machos F1 provenientes de dos hembras gestantes control y dos hembras tratadas. Los valores se expresan como la media \pm DE del grupo control (n=10) vs. el grupo tratado (n=10). * $p \leq 0.05$ de acuerdo a la prueba t-Student.

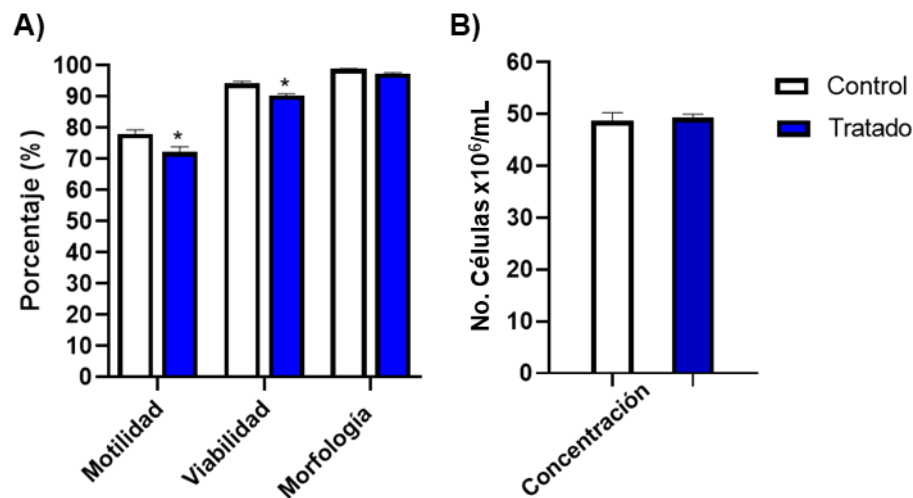


Figura 8. Efecto en los parámetros de calidad espermática en machos provenientes de hembras expuestas a 5 mg/kg/día durante el periodo gestacional (DG 7-15). Se presentan los resultados preliminares de los parámetros de calidad espermática de los machos F1 provenientes de dos hembras gestantes control y dos hembras tratadas. A) Motilidad, viabilidad y morfología espermáticas, representadas en porcentaje en base a un conteo de 200 células. B) Concentración espermática, representada como el número de células/mL. Los valores se expresan como la media \pm DE del grupo control (n=10) vs. el grupo tratado (n=10). * $p \leq 0.05$ de acuerdo a la prueba t-Student.

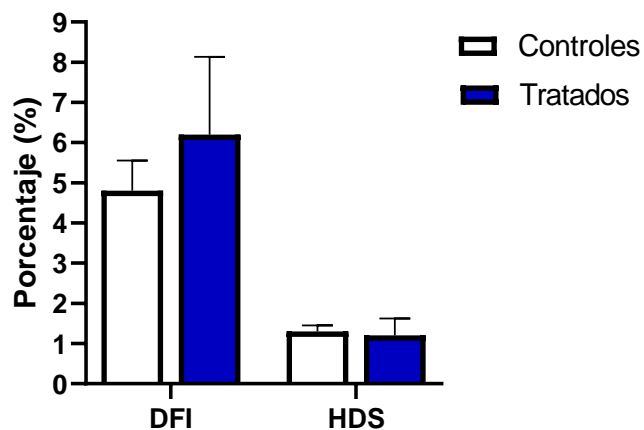


Figura 9. Efecto en la integridad del ADN y la estructura espermáticos en machos provenientes de hembras expuestas a 5 mg/kg/día durante el periodo gestacional (DG 7-15). Se presentan los resultados preliminares de la integridad del ADN y la estructura espermáticos de los machos F1 provenientes de dos hembras gestantes control y dos hembras tratadas. Los valores se expresan como la media \pm DE del grupo control (n=10) vs. el grupo tratado (n=10). DFI= índice de fragmentación del ADN. HDS= alta tinción del ADN (condensación de la cromatina). * $p \leq 0.05$ de acuerdo a la prueba t-Student.

4. DISCUSIÓN

Actualmente, la exposición a PAPs dentro de los que se encuentra los plaguicidas OF como el CPF, representa un importante problema de salud pública y ambiental a nivel mundial. La exposición a estos contaminantes ambientales tiene un gran impacto en la salud reproductiva en la población en general. Sin embargo, por la constante necesidad de controlar y/o erradicar la presencia de vectores transmisores de enfermedades como el mosquito *Aedes aegypti*, portador del virus del dengue, Zika y chikunguña, ha ocasionado el uso incontrolado de estos plaguicidas en toda Latinoamérica, entre ellos está el insecticida CPF. Hoy en día, el CPF es uno de los OF más utilizados el cual está clasificado como moderadamente peligroso por la OMS y moderadamente tóxico por la EPA, no obstante, cada vez hay más estudios que reportan los efectos tóxicos ocasionados por la exposición a este plaguicida.

4.1. Efecto del CPF en hembras gestantes (F0)

4.1.1. Efecto en la actividad de la AChE y en el peso durante el periodo gestacional

Uno de los primeros parámetros de toxicidad evaluados en el presente trabajo fue la actividad de la AChE (mecanismo principal de toxicidad), y se observó una disminución de 43.6% en el grupo tratado y no se observaron diferencias en el peso corporal de las hembras durante el periodo gestacional. Farag et al. (2003) reportaron síntomas clínicos de toxicidad en las ratas madres que recibieron 15 y 25 mg/kg/día de CPF del DG 6-15 de gestación, presentando pérdida de peso corporal e inhibición de la actividad de AChE, así como reducción del peso fetal y muerte al DG 21. Esta inhibición es causada por la formación de aductos del átomo de fósforo con los residuos de serina (S₂₀₀) en el sitio catalítico de la enzima (Aldridge et al., 1969). Durante este proceso también se da la pérdida del grupo alquilo y la liberación de ácido fosfórico monosustituido, el cual es tan reactivo que puede unirse a otras proteínas, a la cadena de ADN o incluso a la misma enzima (De Matteis, 1989).

4.1.2. Efecto en los parámetros reproductivos de las hembras gestantes

En este estudio evaluamos los efectos del CPF en los parámetros reproductivos de las hembras gestantes, sin embargo, no se observaron efectos en los mismos, incluyendo

el tiempo de gestación, el número de crías en el parto, así como en la proporción de machos y hembras. El CPF al ser un compuesto altamente lipofílico es capaz de atravesar la placenta y llegar al feto durante el embarazo (Breslin et al., 1996). No hay evidencia consistente de efectos teratogénicos en la descendencia cuando las ratas preñadas son administradas (*gavage*) con dosis altas como 15 mg de CPF/kg/día durante 10 días (DG 6-15), tampoco hubo evidencia de fetotoxicidad, medida como mortalidad prenatal o alteraciones en el peso fetal (Breslin et al., 1996). Otros estudios en ratas han revelado problemas como toxicidad reproductiva, fetotoxicidad, teratogenicidad, anomalías cognitivas y conductuales a largo plazo, reabsorciones, disminución del peso fetal y desarrollo incompleto de la columna vertebral en los recién nacidos a la dosis de 0.3 mg/kg/día del DG 0–7 en ratas (Muto et al., 1992). Los signos de toxicidad prenatal, como es el retraso del crecimiento fetal, así como una mayor incidencia de malformaciones (es decir, variaciones esqueléticas menores) se han observado también en ratas expuestas a 12 y 15 mg/kg/día durante todo el periodo gestacional (21 días) (Akhtar et al., 2006). En este estudio, no se observaron efectos similares a los descritos previamente, posiblemente porque la exposición no fue durante todo el periodo gestacional (ellos abarcaron todas ventanas de susceptibilidad).

La exposición durante la primera semana del desarrollo embrionario puede causar daño severo a las células conduciendo generalmente a la pérdida embrionaria antes de la implantación, mientras que una lesión menor permite que las células sobrevivientes se repongan con un retraso en el desarrollo (Rousseaux and Bolon, 2013). La susceptibilidad teratogénica del embrión es menor durante la gastrulación (DG 6.5-7), y la exposición a sustancias tóxicas en esta etapa normalmente no producen malformaciones estructurales. Una vez que la organogénesis está en progreso, incluso concentraciones bajas de una sustancia pueden producir defectos morfológicos (Suzuki et al., 2002).

Por otro lado, se ha demostrado que el CPF induce efectos apoptóticos en las células de la placenta al provocar condensación y fragmentación nuclear, pérdida del potencial mitocondrial y una reducción general en el crecimiento y la proliferación celular

(Saulsbury et al., 2008). Nishi y Hundal (2013) reportaron que CPF induce alteraciones en el peso y la morfología, al contribuir al engrosamiento del epitelio superficial y del miometrio. Además, Ventura et al. (2016) sugieren que el mecanismo de acción ovotóxico y embriotóxico del CPF implica la alteración de procesos como la eclosión embrionaria, la proliferación celular y la apoptosis. En los seres humanos, la exposición al CPF durante el embarazo, estimada por los niveles urinarios de TCP en las mujeres embarazadas o los niveles de CPF en el plasma del cordón, se ha asociado con diferentes problemas en el nacimiento, incluida la disminución del tamaño al nacer (Whyatt et al., 2004), la disminución de la edad gestacional al nacer (Eskenazi et al., 2004) y la disminución de la circunferencia de la cabeza en presencia de niveles bajos de la enzima PON1 en la madre (Berkowitz et al., 2004).

4.2. Efectos reproductivos del CPF en las hembras F1

4.2.1. Efecto en el peso corporal y relativo de los órganos

Se realizó el monitoreo del peso de las hembras F1 desde el destete hasta el día del sacrificio y solo se observó una diferencia en el peso en la semana tres, correspondiente al tiempo del destete y no se observó diferencia en las semanas posteriores. De igual manera, no se observó diferencia en el peso relativo de los órganos (ovarios, riñones, bazo, páncreas, hígado, cerebro y pituitaria) al momento del sacrificio. Actualmente no existen estudios que reporten el peso relativo de los órganos de las crías de hembras expuestas al CPF durante el periodo gestacional que nos permita comparar nuestros resultados.

4.2.2. Efecto en la distancia anogenital, apertura vaginal, ciclicidad estral y conteo folicular

Los efectos de toxicidad reproductiva inducidos por los insecticidas OP en las crías incluyen la reducción del peso ovárico y de la producción de folículos, alteraciones del ciclo ovárico y detención del ciclo estral, así como alteraciones asociadas a enzimas esteroidogénicas, prolongación de la duración del embarazo, mortinatos e infertilidad (Kara and Öztaş, 2020).

En este estudio no se observó diferencia en la distancia anogenital, sin embargo, si se observó diferencia en el día promedio en que se presentó la apertura vaginal, indicando un retraso en el inicio de la pubertad, esto puede tener como consecuencia alteraciones reproductivas en la vida adulta (Oduwole et al., 2021). En un estudio realizado por Breslin et al. (1996) en dos generaciones de ratones hembra expuestas a 0.1, 3 y 15 mg/kg/día del DG 6-15 no se observó toxicidad reproductiva, incluido daño al óvulo, cambios en el ciclo estral o la ovulación, ni complicaciones endocrinas, tampoco se observó un efecto relacionado en la apertura vaginal ni hubo efecto del tratamiento sobre la edad del primer celo o la duración del ciclo estral. Mientras que, Gore (2001) mostró que la apertura vaginal y el primer celo se produjeron en forma más temprana en las crías tratadas con CPF (1 mg/kg/día) el DG 16, en comparación con el grupo control. Estos resultados son contrarios a los observados en el presente estudio, lo que puede ser explicado por los diferentes periodos (días gestacionales) en la que la madre fue expuesta al CPF, ya que en el DG 16 la organogénesis ya ha concluido, por lo que el efecto directo a nivel reproductivo es menos probable (Suzuki et al., 2002). Sin embargo, la exposición prenatal a partir del DG 16 (en ratones), permite abordar otro periodo crítico durante el cual, el CPF actúa como neuroteratógeno, lo que a su vez puede ocasionar efectos en el desarrollo del comportamiento sexual, alteraciones a nivel hormonal y en la diferenciación de las regiones del cerebro involucradas en el dimorfismo sexual; actualmente no se conoce el mecanismo específico por el cual CPF provoca estos efectos, por lo que es necesario realizar más estudios al respecto (Levin et al., 2002).

En este estudio no se presentaron diferencias en el número de folículos, pero sí se observó una diferencia en el número de días que las hembras F1 del grupo tratado pasaron en la fase de estro. Esto podría deberse a una posible disminución en los niveles hormonales de progesterona, FSH, estradiol y/o LH. Esta idea se apoya en estudios previos que han demostrado que la fase de estro corresponde a la fase de formación de los folículos ovulatorios y a la fase ovulatoria; en consecuencia, esta fase coincide también con la formación de cuerpos lúteos que secretan progesterona (Oduwole et al., 2021). El CPF se ha relacionado con la reducción de las hormonas sexuales séricas, incluidas la progesterona y el estrógeno en ratón (Gheibi et al.,

2020). En nuestro estudio no fue posible evaluar los niveles hormonales debido a que se siguen colectando muestras de sangre para lograr este objetivo.

A pesar de que no existen muchos estudios que describan el posible mecanismo por el cual el CPF puede influir sobre la reproducción femenina, algunos autores han reportado que estos son ocasionados por un desbalance hormonal atribuido al deficiente desarrollo gonadal, mientras que otros autores sugieren que este desbalance es el resultado de la unión del compuesto a los receptores hormonales, debido a que posee actividad antiestrogénica y antiandrogénica (Nandi et al., 2011; Kara y Öztaş, 2020). Por una parte, la producción disminuida de estrógenos puede ocasionar que las hembras alcancen la pubertad a una edad tardía y causar alteraciones en la ciclicidad estral; por otra parte, la disminución en los niveles de andrógenos se ha asociado a alteraciones en la ovulación (detención) y un deficiente desarrollo de la receptividad sexual, lo que a su vez disminuye el éxito reproductivo (Oduwole et al., 2021). Con nuestros resultados podemos concluir que, sí hay un efecto a nivel reproductivo ocasionado por la exposición a CPF, lo que podría ocasionar problemas de fertilidad en las hembras F1, además de la posibilidad de transmitirlo a la progenie.

4.3. Efectos reproductivos del CPF en machos F1

4.3.1. Efecto en el peso corporal y relativo de los órganos

El monitoreo del peso de los machos F1 reveló una diferencia en el peso en la semana cuatro y al momento del sacrificio se observó una disminución en el peso relativo de los testículos y un incremento en el del hígado en los animales tratados. A la fecha no existen estudios que describan los efectos multigeneracionales en el peso de los órganos por exposición al CPF, sin embargo, un defecto reproductivo importante que se ha demostrado en los machos adultos como resultado de la exposición al CPF es la reducción del peso testicular, el cual se ha atribuido a alteraciones degenerativas y necróticas en los túbulos seminíferos, ensanchamiento de los espacios intersticiales y la reducción en el número de células germinales en las dosis de 15 y 20 mg/kg/día (Farag et al., 2010). En un estudio realizado por Ezzi et al. (2015) empleando dosis de 3.1 y 6.2 mg/kg/día de CPF en ratas macho durante cuatro semanas vía oral,

reportaron una disminución en el peso relativo del hígado en el grupo tratado a la dosis más alta (6.2 mg/kg/día), lo que puede deberse al aceleramiento en procesos como la glucogenólisis, la lipólisis o la proteólisis (más catabolismo que anabolismo). Lo anterior se vio evidenciado por la presencia de una intensa vacuolización citoplasmática y aparición de focos de células necróticas moderadas en el parénquima hepático. Actualmente no existen estudios que reporten un aumento en el peso relativo del hígado en machos F1 provenientes de hembras expuestas durante la gestación, sin embargo, Mansour et al. (2011) reportaron un aumento en el peso relativo del hígado de ratas macho expuestas a 13.5 mg/kg/día vía oral (durante 28 días), lo que pudo ser atribuible al aumento del contenido de la enzima UDP-glucuronil transferasa (UDP-GT) en el hígado por la generación de estrés oxidante por parte de algunos OF (Cook et al., 1997).

4.3.2. Efecto del CPF en la distancia anogenital y en la calidad espermática

Al momento del destete no se observó diferencia en la distancia anogenital de los machos F1 del grupo tratado. Al momento del sacrificio se observó una disminución en la motilidad (8%) y en la viabilidad (4%) espermáticas, lo que indica una mala calidad de los espermatozoides. En la literatura solo hay datos de efectos reproductivos del CPF en animales adultos. El CPF causó una disminución en la motilidad y en viabilidad de ~20% y en la concentración de ~ 50-60%, así como arresto en la espermatogénesis y disminución del número de células de Leydig en ratas expuestas a 37 mg/kg por 45 días (Babazadeh y Najafi, 2017). Por otro lado, se ha reportado una disminución en la calidad espermática, niveles de testosterona, tiroxina y enzimas esteroideogénicas (17-cetoesteroide reductasa) en ratas expuestas a CPF a 20 mg/kg/día/4 semanas (Mosbah et al., 2016). Igualmente, en un estudio realizado en ratas macho expuestas a CPF (3 mg/kg/día durante 20 semanas) se observó una disminución en la cuenta de espermatozoides, niveles de testosterona, concentración de gonadotropinas, con un aumento en el daño oxidante en los testículos (Li et al., 2019). Varios estudios han reportado que el CPF actúa como un antagonista del receptor de andrógenos (AR), lo que suprime las vías de expresión génica asociadas con la síntesis de gonadotropina hipotalámica (que involucra a la LH y FSH) o la esteroideogénesis. Esta supresión, a su vez, se ha atribuido a la disminución de los

niveles de testosterona (debido al probable daño oxidante en las células de Leydig), defectos de las gónadas y la actividad reducida de la LH y FSH (Alaa-Eldin et al., 2017). En este estudio no se pudo cuantificar el perfil hormonal, lo que podría contribuir a explicar algunos de los efectos observados.

Una de las principales causas de la función defectuosa de los espermatozoides que ha surgido en la última década ha sido el estrés oxidante. Los espermatozoides son particularmente susceptibles a esta forma de estrés porque son ricos en ácidos grasos insaturados que son sustratos para el ataque de radicales libres y también son vulnerables por tener un espacio citoplasmático extremadamente limitado y, en consecuencia, poca presencia de enzimas antioxidantes citosólicas (ej. catalasa, superóxido dismutasa (SOD) o glutatión peroxidasa) que protegen a la mayoría de las células del ataque de radicales libres (Aitken et al., 2010). Las ROS son un producto del metabolismo celular normal y los espermatozoides son capaces de generarlas y en concentraciones bajas, estas ROS contribuyen a la capacitación de los espermatozoides, reacción acrosomal y unión a la zona pelúcida. Sin embargo, la alta generación de ROS se ha relacionado a diversas anomalías en las células espermáticas, degradación de las células espermátogénicas y en última instancia, infertilidad (Aitken et al., 2010). Se ha reportado que el CPF tiene la capacidad de oxidar biomoléculas, incluyendo espermatozoides (Babazadeh y Najafi, 2017; Deeba et al., 2017). La evaluación del daño oxidante está pendiente realizar en este estudio.

4.3.3. Efecto del CPF en la estructura de la cromatina espermática

El ADN de los espermatozoides es vital para la transmisión de la información genética durante el proceso de reproducción y si su integridad estructural o funcional se ven comprometidas por anomalías asociadas con la cromatina o daños en el propio ADN, la probabilidad de problemas de fertilidad paterna se multiplica. En el presente estudio se evaluó el índice de fragmentación del ADN (%DFI) y la condensación de la cromatina (%HDS) en espermatozoides (obtenidos al momento del sacrificio) de los machos F1, sin embargo, no se observaron efectos. Los OF como el CPF han demostrado ser agentes fosforilantes, oxidantes (Babazadeh y Najafi, 2017) y capaces

de inducir daño a la cromatina al unirse a las protaminas y/o al ADN (Alaa-Eldin et al., 2017; Piña-Guzmán et al., 2005, 2009; Urióstegui-Acosta et al., 2014).

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio, podemos resumir que, la exposición al CPF a la dosis de 5 mg/kg/día durante la gestación genera efectos reproductivos adversos en la generación F1 de ambos sexos. En las hembras F1 se observó alteración en el peso corporal, así como retraso en el inicio de la pubertad y alteraciones en la ciclicidad estral. Mientras que, en los machos F1 se observó una disminución en el peso relativo de los testículos e hígado y alteración en los parámetros de calidad espermática. Esto indica un efecto generacional del CPF a nivel reproductivo, lo que puede ocasionar una fertilidad reducida y a su vez, aumentar la probabilidad de heredar dichos efectos a las siguientes generaciones.

5. CONCLUSIONES

En hembras gestantes (F0)

- La exposición a 5 mg/kg/día de CPF (DG 7-15) disminuyó la actividad de la AChE (43.6%), 24 horas post-tratamiento (DG 16).
- No se observó diferencia en el peso corporal durante el periodo gestacional.
- La exposición a CPF no causó efectos en los parámetros reproductivos de las hembras (F0), incluyendo el tiempo de gestación, el número de crías en el parto, así como en la proporción de machos y hembras.

En hembras F1

- No se observó diferencia en el peso corporal o relativo de los órganos (ovarios, riñones, bazo, páncreas, hígado, cerebro y pituitaria).
- No se observó diferencia en la distancia anogenital, sin embargo, si se observó diferencia en el promedio del día en el que se presentó la apertura vaginal.
- Se observó una diferencia en el número de días que las hembras pasaron en la fase de estro y no se observó diferencia en el número de folículos.
- Los efectos reproductivos observados en las hembras podrían ocasionar problemas de fertilidad, además de transmitirlo a la progenie.

En machos F1

- No se presentó diferencia en el peso corporal, pero se observó diferencia en el peso relativo de los testículos y del hígado.
- No se observó diferencia en la distancia anogenital.
- Se observó una disminución en la motilidad (8%) y en la viabilidad (4%) espermáticas.
- El índice de fragmentación del ADN (%DFI) y la condensación de la cromatina (%HDS) en espermatozoides no presentaron diferencia significativa.
- El efecto observado en la calidad espermática podría ocasionar alteraciones en la función de los espermatozoides y problemas de fertilidad, aunado a la posibilidad de transmitirlo a generaciones futuras.

6. PERSPECTIVAS

- 1) Evaluar el potencial fértil de los ratones macho y hembra F1.
- 2) Determinar el perfil hormonal de los ratones macho y hembra F1.

Empleando diferentes dosis y siguiendo la línea germinal femenina hasta la generación F3:

- 3) Evaluar parámetros generales neonatales: número de crías nacidas (vivas y muertas) y proporción por sexo.
- 4) Evaluar los efectos reproductivos en la descendencia femenina: capacidad fértil, inicio de la pubertad, conteo y viabilidad folicular, conteo de cuerpos lúteos, ciclicidad estral y perfil hormonal.
- 5) Evaluar los efectos reproductivos en la descendencia masculina: capacidad fértil, inicio de la pubertad, calidad espermática, integridad del ADN espermático y perfil hormonal.
- 6) Determinar del perfil de metilación global del ADN en la descendencia (masculina y femenina).
- 7) Evaluar la capacidad del CPF para generar aductos con la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina y dos etenonucleósidos (1, N6-Etenoadenosina y 1, N6-Etenoguanosina) en el ADN espermático.

4. REFERENCIAS

- [1] Abdel-Rahman, A. A., Blumenthal, G. M., Abou-Donia, S. A., Ali, F. A., Abdel-Monem, A., & Abou-Donia, M. B. (2002). Pharmacokinetic profile and placental transfer of a single intravenous injection of [14 C] chlorpyrifos in pregnant rats. *Archives of Toxicology*, 76(8), 452-459. <https://doi.org/10.1007/s00204-002-0366-2>
- [2] Abolaji, A. O., Ojo, M., Afolabi, T. T., Arowoogun, M. D., Nwawolor, D., & Farombi, E. O. (2017). Protective properties of 6-gingerol-rich fraction from *Zingiber officinale* (Ginger) on chlorpyrifos-induced oxidative damage and inflammation in the brain, ovary and uterus of rats. *Chemico-Biological Interactions*, 270, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.03.017>
- [3] Aitken, R. J., Baker, M. A., de Iuliis, G. N., & Nixon, B. (2010). New insights into sperm physiology and pathology. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 198(198), 99–115. https://doi.org/10.1007/978-3-642-02062-9_7
- [4] Akhtar, N., Srivastava, M. K., and Raizada, R. B. (2006). Transplacental disposition and teratogenic effects of chlorpyrifos in rats. *J. Toxicol. Sci.* 31(5), 521–527.
- [5] Alaa-Eldin, E. A., El-Shafei, D. A., & Abouhashem, N. S. (2017). Individual and combined effect of chlorpyrifos and cypermethrin on reproductive system of adult male albino rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(2), 1532–1543. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7912-6>
- [6] Aldridge, J. E., Seidler, F. J., & Slotkin, T. A. (2004). Developmental exposure to chlorpyrifos elicits sex-selective alterations of serotonergic synaptic function in adulthood: Critical periods and regional selectivity for effects on the serotonin transporter, receptor subtypes, and cell signaling. *Environmental Health Perspectives*, 112(2), 148–155. <https://doi.org/10.1289/ehp.6713>
- [7] ANSES. (2013). Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'actualisation des indicateurs de risque alimentaire lié aux résidus de pesticides. Saisine n°2013-SA-0138. pp. 122. Maison-Alfort. www.anses.fr
- [8] Anway, M. D., Cupp, A. S., Uzumcu, N., & Skinner, M. K. (2005). Toxicology: Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*, 308(5727), 1466–1469. <https://doi.org/10.1126/science.1108190>
- [9] Babazadeh, M., & Najafi, G. (2017). Effect of chlorpyrifos on sperm characteristics and testicular tissue changes in adult male rats. *Veterinary Research Forum: An International Quarterly Journal*, 8(4), 319–326. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29326791> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5756252>
- [10] Bejarano González, F., Aguilera Márquez, D., Álvarez Solís, J. D., Arámbula Meraz, E., Arellano Aguilar, O., & Bastidas Bastidas, P. D. J. (2017). Los plaguicidas altamente peligrosos en México. *Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México*, AC, 358-358.
- [11] Benedict, J. C., Lin, T. M., Loeffler, I. K., Peterson, R. E., & Flaws, J. A. (2000). Physiological role of the aryl hydrocarbon receptor in mouse ovary development. *Toxicological Sciences*, 56(2), 382–388. <https://doi.org/10.1093/toxsci/56.2.382>
- [12] Berkowitz, G. S., Wetmur, J. G., Birman-Deych, E., Obel, J., Lapinski, R. H., Goldbold, J. H., Holzman, I. R., & Wolff, M. S. (2004). In Utero pesticides exposure, maternal paraoxonase activity, and head circumference. *Environmental Health Perspectives*, 112(3), 388–391. <https://doi.org/10.1289/ehp.6414>
- [13] Bicker, W., Lämmerhofer, M., & Lindner, W. (2005). Determination of chlorpyrifos metabolites in human urine by reversed-phase/weak anion exchange liquid

- chromatography-electrospray ionisation-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 822(1–2), 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.06.003>
- [14] Bradman, A., Barr, D. B., Henn, B. G. C., Drumheller, T., Curry, C., & Eskenazi, B. (2003). Measurement of pesticides and other toxicants in amniotic fluid as a potential biomarker of prenatal exposure: A validation study. *Environmental Health Perspectives*, 111(14), 1779–1782. <https://doi.org/10.1289/ehp.6259>
- [15] Breslin, W. J., Liberacki, A. B., Dittenber, D. A., & Quast, J. F. (1996). Evaluation of the developmental and reproductive toxicity of chlorpyrifos in the rat. *Fundamental and Applied Toxicology: Official Journal of the Society of Toxicology*, 29(1), 119–130. <https://doi.org/10.1006/FAAT.1996.0013>
- [16] Chambers, J. E., & Chambers, H. W. (1989). Oxidative desulfuration of chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, and leptophos by rat brain and liver. *Journal of Biochemical Toxicology*, 4(3), 201–203. <https://doi.org/10.1002/jbt.2570040310>
- [17] Chebab, S., Mekircha, F., & Leghouchi, E. (2017). Potential protective effect of Pistacia lentiscus oil against chlorpyrifos-induced hormonal changes and oxidative damage in ovaries and thyroid of female rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 96 (November), 1310–1316. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.081>
- [18] Chevrier, C., Petit, C., Limon, G., Monfort, C., Durand, G., & Cordier, S. (2009). Biomarqueurs urinaires d'exposition aux pesticides des femmes enceintes de la cohorte Pélagie réalisée en Bretagne, France (2002-2006). *BEH Hors-Série*, 1, 23–27. http://www.invs.sante.fr/agenda/biosurveillance_2008/programme_en.htm
- [19] Cook, J. C., Kaplan, A. M., Davis, L. G., & O'Connor, J. C. (1997). Development of a Tier I Screening Battery for Detecting Endocrine-Active Compounds (EACs). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 26(1), 60–68. <https://doi.org/10.1006/RTPH.1997.1120>
- [20] Cook, T. J., & Shenoy, S. S. (2003). Intestinal permeability of chlorpyrifos using the single-pass intestinal perfusion method in the rat. *Toxicology*, 184(2–3), 125–133. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00555-3](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00555-3)
- [21] Cormack, D. H., & Ham, A. W. (1987). *Ham's Histology* (9th ed., p. 732). New York: Lippincott.
- [22] De Matteis F. (1988). Toxicological aspects of liver heme biosynthesis. *Semin Hematol*, 25: 321-329.
- [23] Deeba, F., Raza, I., Muhammad, N., Rahman, H., Ur Rehman, Z., Azizullah, A., Khattak, B., Ullah, F., & Daud, M. K. (2017). Chlorpyrifos and lambda cyhalothrin-induced oxidative stress in human erythrocytes. *Toxicology and Industrial Health*, 33(4), 297–307. <https://doi.org/10.1177/0748233716635003>
- [24] Eaton, D. L., Daroff, R. B., Autrup, H., Bridges, J., Buffler, P., Costa, L. G., Coyle, J., McKhann, G., Mobley, W. C., Nadel, L., Neubert, D., Schulte-Hermann, R., & Spencer, P. S. (2008). Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. *Critical Reviews in Toxicology*, 38(SUPPL.2), 1–125. <https://doi.org/10.1080/10408440802272158>
- [25] Eddleston, M., Karalliedde, L., Buckley, N., Fernando, R., Hutchinson, G., Isbister, G., Konradsen, F., Murray, D., Piola, J. C., Senanayake, N., Sheriff, R., Singh, S., Siwach, S. B., & Smit, L. (2002). Pesticide poisoning in the developing world - A minimum pesticides list. *Lancet*, 360(9340), 1163–1167. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11204-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11204-9)
- [26] Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-95.

- [27] Engel, L. S., Hill, D. A., Hoppin, J. A., Lubin, J. H., Lynch, C. F., Pierce, J., Samanic, C., Sandler, D. P., Blair, A., & Alavanja, M. C. (2005). Pesticide use and breast cancer risk among farmers' wives in the agricultural health study. *American Journal of Epidemiology*, *161*(2), 121–135. <https://doi.org/10.1093/aje/kwi022>
- [28] Engel, S. M., Berkowitz, G. S., Barr, D. B., Teitelbaum, S. L., Siskind, J., Meisel, S. J., Wetmur, J. G., & Wolff, M. S. (2007). Prenatal organophosphate metabolite and organochlorine levels and performance on the Brazelton Neonatal Behavioral Assessment Scale in a multiethnic pregnancy cohort. *American Journal of Epidemiology*, *165*(12), 1397–1404. <https://doi.org/10.1093/aje/kwm029>
- [29] EPA. (2009). Chlorpyrifos Summary Document Registration Review: Initial Docket March 2009. *Docket*
- [30] Eskenazi, B., Harley, K., Bradman, A., Weltzien, E., Jewell, N. P., Barr, D. B., Furlong, C. E., and Holland, N. T. (2004). Association of in utero organophosphate pesticide exposure and fetal growth and length of gestation in a agricultural population. *Environ. Health Perspect.* *112*(10), 1116–1124.
- [31] Evenson, D. P. (2016). The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Animal Reproduction Science*, *169*, 56–75. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2016.01.017>
- [32] Evenson, D. P. (2016). The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Animal Reproduction Science*, *169*, 56–75. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.01.017>
- [33] Ezzi, L., Belhadj Salah, I., Haouas, Z., Sakly, A., Grissa, I., Chakroun, S., Kerkeni, E., Hassine, M., Mehdi, M., & Ben Cheikh, H. (2016). Histopathological and genotoxic effects of chlorpyrifos in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, *23*(5), 4859–4867. <https://doi.org/10.1007/S11356-015-5722-X>
- [34] Farag, A. T., El Okazy, A. M., & El-Aswed, A. F. (2003). Developmental toxicity study of chlorpyrifos in rats. *Reproductive Toxicology*, *17*(2), 203-208.
- [35] Farag, A. T., Radwan, A. H., Sorour, F., El Okazy, A., El-Agamy, E. S., & El-Sebae, A. E. K. (2010). Chlorpyrifos induced reproductive toxicity in male mice. *Reproductive Toxicology*, *29*(1), 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.10.003>
- [36] Gheibi, P., Eftekhari, Z., Doroud, D., & Parivar, K. (2020). Chlorpyrifos effects on integrin alpha v and beta 3 in implantation window phase. *Environmental Science and Pollution Research International*, *27*(23), 29530–29538. <https://doi.org/10.1007/S11356-020-08288-0>
- [37] Gore, A. C. (2001). Environmental toxicant effects on neuroendocrine function. *Endocrine*, *14*(2), 235–246. <https://doi.org/10.1385/ENDO:14:2:235>
- [38] Halpert, J., Hammond, D., & Neal, R. A. (1980). Inactivation of purified rat liver cytochrome P-450 during the metabolism of parathion (diethyl p-nitrophenyl phosphorothionate). *Journal of Biological Chemistry*, *255*(3), 1080–1089. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)86145-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)86145-8)
- [39] Hofmann, J. N., Keifer, M. C., Furlong, C. E., De Roos, A. J., Farin, F. M., Fenske, R. A., van Belle, G., & Checkoway, H. (2009). Serum cholinesterase inhibition in relation to paraoxonase-1 (PON1) status among organophosphate-Exposed agricultural pesticide handlers. *Environmental Health Perspectives*, *117*(9), 1402–1408. <https://doi.org/10.1289/ehp.0900682>
- [40] Jakanovi, M. (2001). Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology*, *166*(3), 139–160. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00463-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00463-2)

- [41] Kara, M., & Öztaş, E. (2020). Reproductive toxicity of insecticides. *Animal Reproduction in Veterinary Medicine*. IntechOpen. 6: 237-245. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.7821>
- [42] Kara, M., & Öztaş, E. (2020). Reproductive toxicity of insecticides. *Animal Reproduction in Veterinary Medicine*. IntechOpen. 6: 237-245. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.7821>
- [43] Karunanayake, C. P., Spinelli, J. J., McLaughlin, J. R., Dosman, J. A., Pahwa, P., & McDuffie, H. H. (2012). Hodgkin Lymphoma and Pesticides Exposure in Men: A Canadian Case-Control Study. *Journal of Agromedicine*, 17(1), 30–39. <https://doi.org/10.1080/1059924X.2012.632726>
- [44] Kopjar, N., Žunec, S., Mendaš, G., Micek, V., Kašuba, V., Mikolić, A., Lovaković, B. T., Milić, M., Pavičić, I., Čermak, A. M. M., Pizent, A., Lucić Vrdoljak, A., & Želježić, D. (2018). Evaluation of chlorpyrifos toxicity through a 28-day study: Cholinesterase activity, oxidative stress responses, parent compound/metabolite levels, and primary DNA damage in blood and brain tissue of adult male Wistar rats. *Chemico-Biological Interactions*, 279, 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.10.029>
- [45] Lee, J. L., Sandler, D. P., Blair, A., Samanie, C., Cross, A. J., & Alavanja, M. C. R. (2007). Pesticide use and colorectal cancer risk in the Agricultural Health Study. *International Journal of Cancer*, 121(2), 339–346. <https://doi.org/10.1002/ijc.22635>
- [46] Levin, E. D., Addy, N., Baruah, A., Elias, A., Christopher, N. C., Seidler, F. J., & Slotkin, T. A. (2002). Prenatal chlorpyrifos exposure in rats causes persistent behavioral alterations. *Neurotoxicology and Teratology*, 24(6), 733–741. [https://doi.org/10.1016/S0892-0362\(02\)00272-6](https://doi.org/10.1016/S0892-0362(02)00272-6)
- [47] Li, J., Pang, G., Ren, F., & Fang, B. (2019). Chlorpyrifos-induced reproductive toxicity in rats could be partly relieved under high-fat diet. *Chemosphere*, 229, 94–102. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.05.020>
- [48] Lockridge, O., Bartels, C. F., Vaughan, T. A., Wong, C. K., Norton, S. E., & Johnson, L. L. (1987). Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *Journal of Biological Chemistry*, 262(2), 549–557. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)75818-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)75818-9)
- [49] Manikkam, M., Haque, M. M., Guerrero-Bosagna, C., Nilsson, E. E., & Skinner, M. K. (2014). Pesticide methoxychlor promotes the epigenetic transgenerational inheritance of adult-onset disease through the female germline. *PLoS ONE*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102091>
- [50] Mansour, S., Heikal, T., Mossa, A., Mansour, S. A., Heikal, T. M., Refaie, A. A., & Mossa, A.-T. H. (2011). Antihepatotoxic activity of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) essential oil against chlorpyrifos-induced liver injury in rats. *Global J. Environ. Sci. Technol*, 1(10). www.simplex-academic-publishers.com
- [51] Marrero, S., González, S., Guevara, H., & Eblen, A. (2017). Evaluación de la exposición a organofosforados y carbamatos en trabajadores de una comunidad agraria. *Comunidad y Salud*, 15(1), 30–41.
- [52] Mauro, R., & Zhang, L. (2008). Unique Insights into the Actions of CNS Agents: Lessons from Studies of Chlorpyrifos and Other Common Pesticides. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*, 7(3), 183–199. <https://doi.org/10.2174/187152407781669107>
- [53] McBirney, M., King, S. E., Pappalardo, M., Houser, E., Unkefer, M., Nilsson, E., Sadler-Riggelman, I., Beck, D., Winchester, P., & Skinner, M. K. (2017). Atrazine induced epigenetic transgenerational inheritance of disease, lean phenotype and sperm epimutation pathology biomarkers. *PLoS ONE*, 12(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184306>

- [54] Meeker, J. D., Ravi, S. R., Barr, D. B., & Hauser, R. (2008). Circulating estradiol in men is inversely related to urinary metabolites of nonpersistent insecticides. *Reproductive Toxicology*, 25(2), 184–191. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.12.005>
- [55] Mosbah, R., Azzoug, S., Haroun, N., & Boulakoud, M. (2012). Nigella Sativa oil alleviating the reproductive toxicity of chlorpyrifos in male rat. *In Endocrine Abstracts* (Vol. 29). *BioScientifica*.
- [56] Mosbah, R., Yousef, M. I., Maranghi, F., & Mantovani, A. (2016). Protective role of Nigella sativa oil against reproductive toxicity, hormonal alterations, and oxidative damage induced by chlorpyrifos in male rats. *Toxicology and Industrial Health*, 32(7), 1266–1277. <https://doi.org/10.1177/0748233714554675>
- [57] Muto, M. A., Lobelle Jr, F., Bidanset, J. H., & Wurlpel, J. N. (1992). Embryotoxicity and neurotoxicity in rats associated with prenatal exposure to DURSIBAN. *Veterinary and Human Toxicology*, 34(6), 498-501.
- [58] Nandi, S., Gupta, P. S. P., Roy, S. C., Selvaraju, S., & Ravindra, J. P. (2011). Chlorpyrifos and endosulfan affect buffalo oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro directly and through cumulus cells. *Environmental Toxicology*, 26(1), 57-67.
- [59] Nandi, S., Gupta, P. S. P., Roy, S. C., Selvaraju, S., & Ravindra, J. P. (2011). Chlorpyrifos and endosulfan affect buffalo oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro directly and through cumulus cells. *Environmental Toxicology*, 26(1), 57-67.
- [60] Nicolet, Y., Lockridge, O., Masson, P., Fontecilla-Camps, J. C., & Nachon, F. (2003). Crystal Structure of Human Butyrylcholinesterase and of Its Complexes with Substrate and Products. *Journal of Biological Chemistry*, 278(42), 41141–41147. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210241200>
- [61] Nishi, K., & Hundal, S. S. (2013). Chlorpyrifos induced toxicity in reproductive organs of female Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology*, 62, 732–738. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.10.006>
- [62] Nishi, K., & Hundal, S. S. (2013). Chlorpyrifos induced toxicity in reproductive organs of female Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology*, 62, 732–738. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.10.006>
- [63] Nolan, R. J., Rick, D. L., Freshour, N. L., & Saunders, J. H. (1984). Chlorpyrifos: in Human Volunteers. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 73(1976), 8–15.
- [64] Oduwole, O. O., Huhtaniemi, I. T., & Misrahi, M. (2021). The Roles of Luteinizing Hormone, Follicle-Stimulating Hormone and Testosterone in Spermatogenesis and Folliculogenesis Revisited. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/IJMS222312735>
- [65] Oruç, E. Ö. (2010). Oxidative stress, steroid hormone concentrations and acetylcholinesterase activity in *Oreochromis niloticus* exposed to chlorpyrifos. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 96(3), 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.11.005>
- [66] Ostrea, E. M., Morales, V., Ngoumgna, E., Prescilla, R., Tan, E., Hernandez, E., Ramirez, G. B., Cifra, H. L., & Manlapaz, M. L. (2002). Prevalence of fetal exposure to environmental toxins as determined by meconium analysis. *NeuroToxicology*, 23(3), 329–339. [https://doi.org/10.1016/S0161-813X\(02\)00077-3](https://doi.org/10.1016/S0161-813X(02)00077-3)
- [67] Perera, F. P., Rauh, V., Tsai, W. Y., Kinney, P., Camann, D., Barr, D., Bernert, T., Garfinkel, R., Tu, Y. H., Diaz, D., Dietrich, J., & Whyatt, R. M. (2003). Effects of transplacental exposure to environmental pollutants on birth outcomes in a multiethnic population. *Environmental Health Perspectives*, 111(2), 201–205. <https://doi.org/10.1289/ehp.5742>

- [68] Piña-Guzmán, B., Sánchez-Gutiérrez, M., Marchetti, F., Hernández-Ochoa, I., Solís-Heredia, M. J., & Quintanilla-Vega, B. (2009). Methyl-parathion decreases sperm function and fertilization capacity after targeting spermatocytes and maturing spermatozoa. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238(2), 141–149. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2009.05.008>
- [69] Piña-Guzmán, B., Sánchez-Gutiérrez, M., Marchetti, F., Hernández-Ochoa, I., Solís-Heredia, M. J., & Quintanilla-Vega, B. (2009). Methyl-parathion decreases sperm function and fertilization capacity after targeting spermatocytes and maturing spermatozoa. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238(2), 141–149. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2009.05.008>
- [70] Piña-Guzmán, B., Solís-Heredia, M. J., & Quintanilla-Vega, B. (2005). Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 202(2), 189–198. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2004.06.028>
- [71] Poet, T. S., Wu, H., Kousba, A. A., & Timchalk, C. (2003). In vitro rat hepatic and intestinal metabolism of the organophosphate pesticides chlorpyrifos and diazinon. *Toxicological Sciences*, 72(2), 193–200. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg035>
- [72] Pond, A. L., Chambers, H. W., & Chambers, J. E. (1995). Organophosphate detoxication potential of various rat tissues via A-esterase and aliesterase activities. *Toxicology Letters*, 78(3), 245–252. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(95\)03327-H](https://doi.org/10.1016/0378-4274(95)03327-H)
- [73] Rahman, M. F., Mahboob, M., Danadevi, K., Saleha Banu, B., & Grover, P. (2002). Assessment of genotoxic effects of chlorpyrifos and acephate by the comet assay in mice leucocytes. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 516(1–2), 139–147. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00033-5](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00033-5)
- [74] Rathod, A. L., & Garg, R. K. (2017). Chlorpyrifos poisoning and its implications in human fatal cases: A forensic perspective with reference to Indian scenario. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 47(September), 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2017.02.003>
- [75] Rauh, V. A., Perera, F. P., Horton, M. K., Whyatt, R. M., Bansal, R., Hao, X., Liu, J., Barr, D. B., Slotkin, T. A., & Peterson, B. S. (2012). Brain anomalies in children exposed prenatally to a common organophosphate pesticide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(20), 7871–7876. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203396109>
- [76] Rousseaux, C. G., & Bolon, B. (2013). Embryo and Fetus. In Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (pp. 2695–2759). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415759-0.00062-5>
- [77] Sandal, S., & Yilmaz, B. (2011). Genotoxic effects of chlorpyrifos, cypermethrin, endosulfan and 2, 4-D on human peripheral lymphocytes cultured from smokers and nonsmokers. *Environmental Toxicology*, 26(5), 433-442.
- [78] Saulsbury, M. D., Heyliger, S. O., Wang, K., & Round, D. (2008). Characterization of chlorpyrifos-induced apoptosis in placental cells. *Toxicology*, 244(2–3), 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.10.020>
- [79] Sharma, P., Huq, A. U., & Singh, R. (2014). Cypermethrin-induced reproductive toxicity in the rat is prevented by resveratrol. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 7(2), 99–106. <https://doi.org/10.4103/0974-1208.138867>
- [80] Sherman, J. D. (1996). Chlorpyrifos (Dursban)-associated birth defects: report of four cases. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 51(1), 5-8. <https://doi.org/10.1080/00039896.1996.9935986>
- [81] Slotkin, T. A. (2004). Guidelines for developmental neurotoxicity and their impact on organophosphate pesticides: A personal view from an academic perspective.

- NeuroToxicology*, 25(4 SPEC. ISS.), 631–640. [https://doi.org/10.1016/S0161-813X\(03\)00050-0](https://doi.org/10.1016/S0161-813X(03)00050-0)
- [82] Slotkin, T. A., Brown, K. K., & Seidler, F. J. (2005). Developmental exposures of rats to chlorpyrifos elicits sex-selective hyperlipidemia and hyperinsulinemia in adulthood. *Environmental Health Perspectives*, 113(10), 1291–1294. <https://doi.org/10.1289/ehp.8133>
- [83] Smith, J. N., Campbell, J. A., Busby-Hjerpe, A. L., Lee, S., Poet, T. S., Barr, D. B., & Timchalk, C. (2009). Comparative chlorpyrifos pharmacokinetics via multiple routes of exposure and vehicles of administration in the adult rat. *Toxicology*, 261(1–2), 47–58. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.04.041>
- [84] Solomon, K. R., Williams, W. M., Mackay, D., Purdy, J., Giddings, J. M., & Giesy, J. P. (2014). Properties and uses of chlorpyrifos in the United States. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 231, 13–34. https://doi.org/10.1007/978-3-319-03865-0_2
- [85] Suzuki, K., Ogino, Y., Murakami, R., Satoh, Y., Bachiller, D., & Yamada, G. (2002). Embryonic development of mouse external genitalia: insights into a unique mode of organogenesis. *Evolution & Development*, 4(2), 133–141. <https://doi.org/10.1046/J.1525-142X.2002.01061.X>
- [86] Szabo, J. R., Young, J. T., & Granjean, M. (1988). Chlorpyrifos: 13-week dietary toxicity study in Fisher 344 rats. *Jackson Research Centre, Health and Environmental Sciences-Texas*. Laboratory study No.: TXT: K-044793-071. Report dated December, 28, 1988.
- [87] Testai, E., Buratti, F. M., & Di Consiglio, E. (2010). Chlorpyrifos. In Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology. Volume I. Third Edition. Editor: Robert Krieger. *Elsevier Inc. Academic Press*. (pp. 1505-1526). ISBN: 978-0-12-374481-4.
- [88] Tian, Y., & Yamauchi, T. (2003). Micronucleus formation in 3-day mouse embryos associated with maternal exposure to chlorpyrifos during the early preimplantation period. *Reproductive Toxicology*, 17(4), 401–405. [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(03\)00039-X](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(03)00039-X)
- [89] Tian, Y., Ishikawa, H., Yamaguchi, T., Yamauchi, T., & Yokoyama, K. (2005). Teratogenicity and developmental toxicity of chlorpyrifos: Maternal exposure during organogenesis in mice. *Reproductive Toxicology*, 20(2), 267–270. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2005.01.012>
- [90] Timchalk, C., Nolan, R. J., Mendrala, A. L., Dittenber, D. A., Brzak, K. A., & Mattsson, J. L. (2002). A physiologically based pharmacokinetic and pharmacodynamic (PBPK/PD) model for the organophosphate insecticide chlorpyrifos in rats and humans. *Toxicological Sciences*, 66(1), 34–53. <https://doi.org/10.1093/toxsci/66.1.34>
- [91] Usmani, K. A., Cho, T. M., Rose, R. L., & Hodgson, E. (2006). Inhibition of the human liver microsomal and human cytochrome P450 1A2 and 3A4 metabolism of estradiol by deployment-related and other chemicals. *Drug Metabolism and Disposition*, 34(9), 1606–1614. <https://doi.org/10.1124/dmd.106.010439>
- [92] Usmani, K. A., Rose, R. L., & Hodgson, E. (2003). Inhibition and activation of the human liver microsomal and human cytochrome P450 3A4 metabolism of testosterone by deployment-related chemicals. *Drug Metabolism and Disposition*, 31(4), 384–391.
- [93] Ventura, C., Núñez, M., Miret, N., Martinel Lamas, D., Randi, A., Venturino, A., Rivera, E., & Cocca, C. (2012). Differential mechanisms of action are involved in chlorpyrifos effects in estrogen-dependent or -independent breast cancer cells exposed to low or high concentrations of the pesticide. *Toxicology Letters*, 213(2), 184–193. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.06.017>
- [94] Viswanath, G., Chatterjee, S., Dabral, S., Nanguneri, S. R., Divya, G., & Roy, P. (2010). Anti-androgenic endocrine disrupting activities of chlorpyrifos and piperophos. *Journal of*

- Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 120(1), 22–29.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.02.032>
- [95] Waldbillig, N. R. S. C. D. (1998). Effects of the pesticides carbofuran, chlorpyrifos, dimethoate, lindane, triallate, trifluralin, 2, 4-D, and pentachlorophenol on the metabolic endocrine and reproductive endocrine system in ewes. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 54(1), 21-36.
- [96] Watts, M. (2012). Clorpirifos: Un posible COP a nivel global. *Pesticide Action Network Norte America*.
- [97] WHO. World Health Organization. (2003). Draft: guidelines on the management of public health pesticides: report of the WHO Interregional Consultation, Chiang Mai, Thailand 25-28 February 2003 (No. WHO/CDS/WHOPES/2003.7).
- [98] Whyatt, R. M., & Barr, D. B. (2001). Measurement of organophosphate metabolites in postpartum meconium as a potential biomarker of prenatal exposure: a validation study. *Environmental Health Perspectives*, 109(4), 417-420.
- [99] Whyatt, R. M., Camann, D., Perera, F. P., Rauh, V. A., Tang, D., Kinney, P. L., Garfinkel, R., Andrews, H., Hoepner, L., & Barr, D. B. (2005). Biomarkers in assessing residential insecticide exposures during pregnancy and effects on fetal growth. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 206(2), 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.11.027>
- [100] Whyatt, R. M., Rauh, V., Barr, D. B., Camann, D. E., Andrews, H. F., Garfinkel, R., Hoepner, L. A., Diaz, D., Dietrich, J., Reyes, A., Tang, D., Kinney, P. L., & Perera, F. P. (2004). Prenatal insecticide exposures and birth weight and length among an urban minority cohort. *Environmental Health Perspectives*, 112(10), 1125–1132. <https://doi.org/10.1289/ehp.6641>