



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA

**“Evaluación de la hepatotoxicidad del temefos en ratas
macho adultas”**

TESIS

Que presenta:

Lic. Lilian Alejandra Pérez Pérez

Para obtener el grado de Maestra en Ciencias
en la Especialidad de Toxicología

Director de tesis:

Dr. Adolfo Sierra Santoyo

Ciudad de México

Agosto, 2023

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio 17 del Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Adolfo Sierra Santoyo, con el apoyo económico del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) a través de la Beca No. 1144684.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Adolfo Sierra Santoyo**, por la oportunidad de formar parte de su laboratorio para poder desarrollar este proyecto. Por la orientación, apoyo, confianza, conocimiento y paciencia durante todo el proceso.

A los integrantes del comité académico, la **Dra. Betzabet Quintanilla Vega** y el **Dr. Pablo Muriel de la Torre** por el apoyo, la orientación y los comentarios para poder mejorar este proyecto.

A la **Biól. Marisela Uribe Ramírez** por el apoyo técnico para el desarrollo de las diferentes técnicas empleadas en este estudio.

Dr. Gamaliel Aztatzi Aguilar por el apoyo en el desarrollo de la técnica de western blot y MDA, así como por el material proporcionado.

A **Laura Dayana Buendía Montaña** por el apoyo en los cortes histológicos y el desarrollo de la tinción de rojo oleoso.

A la **Q.F.B. Ma. de Lourdes López González** por el apoyo técnico en el sacrificio de los animales empleados en este estudio.

Al **Q.B.P. Omar Rivera Arce** por su apoyo técnico en las actividades del laboratorio.

Al personal del UPEAL, **M.V.Z. Benjamín Emmanuel Chávez Álvarez**, el **M.V.Z. Rafael Leyva Muñoz**, y el **técnico René Pánfilo Morales**, por su apoyo en el cuidado y manejo de los animales empleados en este estudio.

A **Miao Ling Shih** y **Paul Pascual Alcalá** por su compañerismo, amistad y apoyo durante el proceso.

Por último, quiero agradecer al **CINVESTAV-IPN** por la oportunidad brindada para estudiar en esta institución y al **CONAHCYT** por el apoyo económico para realizar mis estudios de posgrado.

DEDICATORIA

En primera instancia quiero agradecer a la vida por permitirme contar con la pasión y amor para disfrutar, aprender y conocer el mundo de la ciencia, y así obtener un logro más. A mi papá Rey Arturo Pérez Rivas†, le agradezco los valores, principios y enseñanzas que me inculcó para ser una persona de bien y que pueda conseguir sus metas de forma honrada y respetable; siendo él el mejor ejemplo a seguir. También por el apoyo y motivación que siempre me brindó, ya que sin su esfuerzo, sacrificio, fuerza y dedicación yo no podría haber cumplido este sueño profesional. Del mismo modo, agradezco infinitamente haber tenido al mejor hombre del mundo como guía y del cual estoy inmensamente orgullosa. A mi mamá María Del Rosario Pérez Rodríguez, por su amor incondicional, por siempre estar a mi lado en los momentos más difíciles; por su fuerza, confianza, seguridad y por guiarme para ser la mujer que soy hoy en día. A mis hermanas Thalía y Pamela, por sus consejos, apoyo, momentos de alegría y siempre inspirarme a luchar por mis metas y proyectos personales y profesionales. A mis sobrinos Natalia y Hugo, por siempre llenarme de alegría, amor, risas y ser la luz para poder continuar con este proyecto a pesar de los momentos más complicados. A mis abuelos Olivia, María del Carmen†, Felipe† y Salvador†, por ser una inspiración más para superarme académicamente. A todos los integrantes de mi amplia familia, por siempre motivarme y creer en mí, incluso cuando yo misma dudaba en seguir adelante. A Spanky y Bruno, por brindarme su cariño absoluto y su lealtad inigualable. Les agradezco a todos los antes mencionados por estar siempre a mi lado a lo largo de este tiempo y acompañarme por este camino hasta la meta final. Porque como decía mi papá “En el tiempo se puede cumplir lo que sea, cuando no se tiene prisa” y siempre recordar que “Nacimos para ser felices, no para ser perfectos”.

“La belleza de la ciencia radica en su capacidad para desentrañar la complejidad de la naturaleza y revelar su orden subyacente”

- Rosalind Franklin

ÍNDICE

	Página
Lista de Figuras	viii
Lista de Tablas	ix
Lista de abreviaturas	x
Resumen	xi
Abstract	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Plaguicidas	1
1.1.1 Plaguicidas organofosforados	1
1.2 Temefos	2
1.2.1 Generalidades	2
1.2.2 Propiedades fisicoquímicas	2
1.2.3 Usos	2
1.2.4 Fuentes de exposición	3
1.2.5 Toxicocinética	3
1.2.5.1 Absorción	3
1.2.5.2 Distribución	4
1.2.5.3 Biotransformación	4
1.2.5.4 Eliminación	6
1.2.6 Información toxicológica del temefos	7
1.2.1 Toxicidad general	7
1.2.2 Toxicidad sistémica	7
1.2.3 Neurotoxicidad	8
1.2.4 Genotoxicidad	9
1.2.5 Toxicidad reproductiva	9
1.2.6 Hepatotoxicidad	9
1.3 Receptores nucleares	11
1.3.1 Receptor X del hígado (LXR)	11
1.3.1.1 Funciones de LXR- α	12
1.3.1.2 Metabolismo del colesterol	12
1.3.1.3 Transporte inverso de colesterol	12
1.3.1.4 Biosíntesis de colesterol	13
1.3.1.5 Captación de colesterol	13
1.3.1.6 Metabolismo de los ácidos grasos	13
1.3.2 Receptor activador de la proliferación de peroxisomas (PPAR)	14
1.3.2.1 Funciones del PPAR- α	14
1.3.2.2 Interacción entre xenobióticos y los receptores LXR- α y PPAR- α	15
1.5 Justificación	16

1.6 Hipótesis	16
1.7 Objetivos	17
1.7.1 Objetivo general	17
1.7.2 Objetivos particulares	17
2. MÉTODOS	18
2.1 Diseño experimental del estudio	18
2.2 Animales	18
2.3 Tratamiento	18
2.4 Sacrificio	19
2.5 Ensayos bioquímicos	19
2.6 Determinación de proteínas	19
2.6.1 Principio	19
2.6.2 Soluciones	19
2.6.3 Procedimiento	19
2.6.4 Cálculos	20
2.7 Determinación de los niveles de proteína de LXR- α y PPAR- α	20
2.7.1 Principio	21
2.7.2 Soluciones	21
2.7.3 Procedimiento	21
2.8 Determinación del malondialdehído en el hígado	23
2.8.1 Principio	23
2.8.2 Soluciones	23
2.8.3 Procedimiento	23
2.8.4 Cálculos	24
2.9 Determinación de los lípidos internos en el hígado	24
2.9.1 Principio	25
2.9.2 Soluciones	25
2.9.3 Procedimiento	25
2.10 Determinación de la concentración de GSH y GSSG, y la tasa GSH/GSSG en el hígado	26
2.9.1 Principio	26
2.9.2 Soluciones	26
2.9.3 Procedimiento	26
2.11 Determinación de CYP total	27
2.11.1 Principio	27
2.11.2 Soluciones	27
2.11.3 Procedimiento	28
2.11.4 Cálculos	28
2.12 Análisis estadístico	28
3. RESULTADOS	28

3.1	Peso Relativo del Hígado	29
3.2	Actividades enzimáticas en el suero	29
3.3	Efecto del temefos sobre la concentración de lipídico el suero y en el hígado	29
3.4	Efecto del temefos sobre la expresión de LXR- α y PPAR- α	30
3.5	Balance óxido-reducción en el hígado	34
3.6	Efecto del temefos sobre las bilirrubinas séricas	35
3.7	Efecto del temefos sobre el contenido de CYP total	36
4.	DISCUSIÓN	37
4.1	Efecto del temefos en el peso corporal y relativo del hígado	39
4.2	Efecto del temefos sobre actividades enzimáticas	40
4.3	Alteración de lípidos séricos	40
4.4	Efecto del temefos en los RN LXR- α y PPAR- α	42
4.5	Efecto oxidante del temefos	43
4.6	Efecto del temefos sobre las bilirrubinas	45
4.7	Efecto del temefos sobre el CYP total	46
4.8	Comentarios finales sobre el uso del temefos	47
5.	CONCLUSIONES	47
6.	PERSPECTIVAS	48
7.	REFERENCIAS	49

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura química del temefos.	2
Figura 2. Propuesta de biotransformación fase I de temefos en rata.	6
Figura 3. Diseño experimental.	18
Figura 4. Efecto del temefos sobre las actividades enzimática en suero de la ALT, AST, FAL, GGT y LDH.	31
Figura 5. Efecto del temefos sobre la concentración de diferentes tipos de lípidos en el suero de ratas macho adultas.	32
Figura 6. Efecto del temefos sobre la concentración de las diferentes lipoproteínas en el suero de ratas macho adultas.	33
Figura 7. Efecto del temefos sobre la acumulación de lípidos en el hígado.	34
Figura 8. Efecto del temefos sobre el contenido relativos de las proteínas de los receptores LXR- α y PPAR- α en el hígado de ratas macho adultas.	35
Figura 9. Efecto del temefos sobre el balance óxido-reducción hepático de ratas macho adultas.	36
Figura 10. Efecto del temefos sobre la concentración de las bilirrubinas en el suero de ratas macho adultas.	37
Figura 11. Efecto del temefos sobre la concentración del CYP total.	38

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Parámetros toxicocinéticos del temefos en sangre.	5
Tabla 2. Curva de calibración de albúmina.	21
Tabla 3. Curva estándar de MDA.	25
Tabla 4. Peso relativo del hígado de ratas Wistar macho.	29

ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AchE	Acetilcolinesterasa
ACN	Acetonitrilo
ALT	Alanina Aminotransferasa
AST	Aspartato Aminotransferasa
CYP	Citocromo P450
DL₅₀	Dosis Letal 50
EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América
FAL	Fosfatasa Alcalina
GGT	γ -Glutamil Transpeptidasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
LDH	Lactato deshidrogenasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LOAEL	Nivel más Bajo de Efecto Adverso Observable
LXR	Receptor "X" del hígado
LXR-α	Receptor "X" del hígado alfa
MDA	Malondialdehído
NOAEL	Nivel de Efecto Adverso No Observable
OMS	Organización Mundial de la Salud
OF	Plaguicidas Organofosforados
PPAR-α	Receptor activador de la proliferación de peroxisomas alfa
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
RN	Receptores Nucleares

RESUMEN

El temefos es un plaguicida organofosforado utilizado para combatir mosquitos transmisores de enfermedades como el dengue, el Zika y el chikungunya. Durante las campañas de aplicación, el temefos es añadido en depósitos de agua a concentraciones que no superen 1 mg/L, de acuerdo con las recomendaciones de la OMS. El temefos se absorbe rápidamente y se acumula ampliamente en tejido adiposo y se metaboliza ampliamente a por lo menos a 18 metabolitos intermediarios, todos ellos con diferente potencial toxicológico. Actualmente, la información toxicológica del temefos es limitada, se conoce que inhibe la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) y produce efectos neurológicos, reproductivos, genotóxicos, mutagénicos y afecta la función hepática. El objetivo de este estudio fue evaluar la hepatotoxicidad del temefos en la rata macho adulta. Para ello, se expusieron ratas Wistar macho adultas a temefos emulsificado en solución salina a las dosis de 1, 10 y 100 mg/kg/d por 5 días por vía oral. A las 24 h después de la última administración, los animales se eutanizaron por asfixia con CO₂ y posteriormente se les extrajo el hígado y la sangre por punción cardiaca para la obtención de suero. La exposición a temefos produjo un aumento de las actividades enzimáticas de las enzimas AST (Aspartato aminotransferasa), ALT (Alanina aminotransferasa) y LDH (Lactato deshidrogenasa) a la dosis de 100 mg/kg/d en el suero. También aumentó la concentración sérica de los triglicéridos y los lípidos totales a la dosis de 10 mg/kg/d, la de los lípidos de baja densidad (LDL) a las dosis de 10 y 100 mg/kg/d y la de colesterol y los lípidos de alta densidad (HDL), así como de las bilirrubinas totales a la dosis de 100 mg/kg/d. Los resultados de los niveles de lípidos hepáticos indicaron un aumento de los niveles de lípidos hepáticos indicó un aumento significativo a las tres dosis de temefos probadas. Algunas funciones hepáticas dependen de la activación de varios receptores, en particular el receptor X del hígado isotipo alfa (LXR- α) y receptor activador de la proliferación de peroxisomas isotipo alfa (PPAR- α) que juegan un papel relevante en la regulación del metabolismo de lípidos. Los niveles de la proteína del LXR- α no se afectaron a ninguna de las dosis, pero los del PPAR- α si disminuyeron significativamente a la dosis más alta. El LXR- α es un receptor que tiene un papel crucial en la regulación del metabolismo de los lípidos y el colesterol en el cuerpo, así como el PPAR- α promueve la descomposición de los ácidos grasos, el metabolismo de los lípidos, la β -oxidación y la descomposición de las lipoproteínas ricas en triglicéridos. Las concentraciones hepáticas del glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) no se afectaron a ninguna de las dosis, pero si la tasa GSH/GSSG y la del marcador de daño oxidante, el malondialdehído (MDA) a la dosis de 100 mg/kg/d, lo que sugiere que el temefos genera estrés oxidante en el hígado. La exposición a temefos no alteró las concentraciones séricas de la bilirrubina indirecta o directa, pero si provocó un aumento significativo de la bilirrubina total a la dosis de 100 mg/kg/d, así como un incremento de la concentración de CYP total a las tres dosis evaluadas. Estos resultados indican que el temefos es hepatotóxico afectando algunas funciones metabólicas, particularmente el balance lipídico desregulando la actividad del receptor PPAR- α y provocando una disminución de las funciones que dependen de él. También sugieren que el uso del temefos para el control de vectores debe ser revisado tomando en cuenta la información toxicológica generada recientemente.

ABSTRACT

Temephos is an organophosphate pesticide used to combat mosquitoes that transmit diseases such as dengue, Zika and chikungunya. During application campaigns, temephos is added to water tanks at concentrations that do not exceed 1 mg/L, by WHO recommendations. Temephos is rapidly absorbed and accumulates extensively in adipose tissue and is extensively metabolized to at least 18 intermediate metabolites, all of which have different toxicological potentials. Currently, the toxicological information on temephos is limited, it is known that it inhibits the activity of acetylcholinesterase (AChE) and produces neurological, reproductive, genotoxic, mutagenic effects and affects liver function. The objective of this study was to evaluate the hepatotoxicity of temephos in the adult male rat. For this, adult male Wistar rats were exposed to temephos emulsified in saline solution at doses of 1, 10, and 100 mg/kg/d for 5 days orally. At 24 h after the last administration, the animals were euthanized by asphyxiation with CO₂, and the liver and blood were subsequently extracted by cardiac puncture to obtain serum. Exposure to temephos produced an increase in the enzymatic activities of AST (Aspartate Aminotransferase), ALT (Alanine Aminotransferase) and LDH (Lactate Dehydrogenase) enzymes at a dose of 100 mg/kg/d in the. It also increased the serum concentration of triglycerides and total lipids at the 10 mg/kg/d dose, that of low-density lipids (LDL) at the 10 and 100 mg/kg/d doses, and that of cholesterol and high-density lipids (HDL), as well as total bilirubin at a dose of 100 mg/kg/d. Results for liver lipid levels indicated an increase in liver lipid levels indicated a significant increase at all three doses of temephos tested. Some liver functions depend on the activation of several receptors, in particular the liver X receptor isotype alpha (LXR- α) and peroxisome emergence activating receptor isotype alpha (PPAR- α) which play an important role in the regulation of metabolism. of lipids. LXR- α protein levels were not affected at either dose, but PPAR- α levels were significantly decreased at the highest dose. LXR- α is a receptor that has a crucial role in regulating lipid and cholesterol metabolism in the body, just as PPAR- α promotes fatty acid accumulation, lipid metabolism, β -oxidation and deterioration of triglyceride-rich lipoproteins. Hepatic concentrations of reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione were not affected at any of the doses, but the GSH/GSSG ratio and that of the marker of oxidant damage, malondialdehyde (MDA) at a dose of 100 mg/kg/d, suggesting that temephos exacerbates oxidative stress in the liver. Exposure to temephos did not alter direct or indirect serum bilirubin concentrations, but there was a significant increase in total bilirubin at the 100 mg/kg/d dose as well as an increase in total CYP concentration at all three doses. evaluated. These results indicate that temephos is hepatotoxic by suppressing some metabolic functions, particularly the lipid balance, deregulating the activity of the PPAR- α receptor and causing a decrease in the functions that depend on it. It also suggests that the use of temephos for vector control should be reviewed considering recent toxicological information.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Plaguicidas

Los plaguicidas son definidos como: cualquier sustancia o mezcla de sustancias de ingredientes químicos o biológicos destinados a repeler, destruir o controlar cualquier plaga, o regular el crecimiento de las plantas (FAO, y OMS, 2022).

1.1.1 Plaguicidas organofosforados

Los plaguicidas organofosforados (OF) son los plaguicidas más ampliamente usados alrededor del mundo. Se utilizan en diferentes prácticas como: la agricultura, jardinería, para uso doméstico y prácticas veterinarias; sin embargo, en la última década, se ha suspendido el uso de varios OF como el etil-paratión, que ya no está autorizado para ningún uso, y el clorpirifos, que ya no está registrado para uso doméstico (EPA, 2022). Algunos OF, como el diazinón, el fentión, el temefos y el metil-paratión, tienen una liposolubilidad significativa, lo que permite su almacenamiento en el tejido adiposo y contando con una toxicidad retardada debido a la liberación tardía hacia el torrente sanguíneo. En el ambiente ocurre su conversión a derivados oxidados debido al oxígeno y la radiación UV. Mientras que, en el organismo sucede por la acción de las monooxigenasas microsomales hepáticas. Los oxones, productos oxidados de los fosforotioatos luego de la fosforilación oxidativa, son mucho más tóxicos que los tiones, pero los oxones se descomponen más fácilmente. En última instancia, tanto los tiones como los oxones se hidrolizan en el enlace éster, produciendo los fosfatos de alquilo y grupos salientes, ambos de toxicidad relativamente baja (EPA, 2022).

Los OF comparten un mecanismo común de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) por medio de la fosforilación en las terminales nerviosas; esta enzima es fundamental para el control de la transmisión del impulso nervioso de forma normal. Los inhibidores de la AChE se unen al grupo -OH de la serina en el sitio activo de la enzima bloqueando la degradación normal del neurotransmisor acetilcolina (ACh) generando una sobreestimulación por una acumulación de la ACh provocando un síndrome colinérgico (EPA, 2016).

De acuerdo con una encuesta aplicada a trabajadores en el estado de Nayarit, se determinó que los OF son los plaguicidas más usados (63.3%), seguidos de los piretroides (29.8%) y los carbamatos (3.8%). El 11.1% de los fumigadores se ha intoxicado por lo menos en una ocasión y el 31% refirió no saber qué es una intoxicación, mientras que el 33.3 % de la población no considera su ocupación peligrosa y el 46.9 % también comentó no haber recibido

capacitación previa para el manejo de plaguicidas. Este reporte nos ofrece un panorama general de uso de los plaguicidas en nuestro país, lo que sugiere un riesgo importante de exposición a plaguicidas para la población en general y los aplicadores (Herrera-Moreno y col., 2018). Uno de los resultados importantes de esta encuesta fue que el temefos es uno de los plaguicidas OF más utilizados.

1.2 Temefos

1.2.1 Generalidades

El temefos (*O,O,O',O'*-tetrametil-*O,O'*-tiodi-*p*-fenileno-bis(fosforotioato) (Figura 1) es un larvicida que pertenece a la familia de los OP. Éste fue sintetizado por la compañía American Cyanamid entre 1963 y 1967, y es conocido bajo diferentes nombres comerciales, entre ellos Abate. Es comercializado en diferentes presentaciones como: grado técnico (97.4%), en emulsión a diferentes concentraciones o en forma granular (1%) (OMS, 2006).

1.2.2 Propiedades fisicoquímicas

Su fórmula molecular es $C_{16}H_{20}O_6P_2S_3$, con un peso molecular de 466.48 g/mol, una densidad de 1.32 g/cm³ y un punto de fusión de 30-30.5 °C. Se descompone a 120-125 °C, en agua presenta una solubilidad de 30 g/L a 25 °C, pero es muy soluble en dicloroetileno, acetonitrilo (ACN), tetracloruro de carbono, éter y tolueno, tiene un coeficiente de reparto octanol/agua (Kow) de 4.91 y se hidroliza en ácidos y bases fuertes (EPA, 2016).

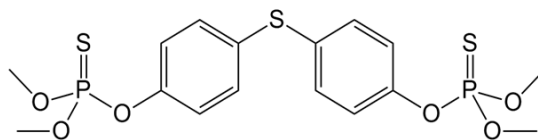


Figura 1. Estructura química del temefos.

1.2.3 Usos

El temefos se usa principalmente como larvicida para el control de crecimiento de vectores como los mosquitos transmisores de enfermedades como el dengue, Zika y chikungunya (OMS, 2006).

Durante las campañas de Abatización, el temefos es añadido en depósitos de agua potable a concentraciones que no superen 1 mg/L, de acuerdo a las recomendaciones de la

Organización Mundial de la Salud (OMS) (OMS, 2006) y es el primer plaguicida de elección en México en las regiones endémicas de dengue (CENAPRECE, 2021). También es común su aplicación masiva en forma de aerosol por medio bombas termoneumáticas en combinación con otros OF y piretroides (Rose, 2001).

1.2.4 Fuentes de exposición

Los tipos más comunes de exposición a este plaguicida son: la ocupacional, para-ocupacional y ambiental. El temefos es un compuesto inestable que se oxida bajo ciertas condiciones ambientales, generando derivados oxidados, como el temefos oxón (Tem-oxón) y el temefos sulfóxido (Tem-SO), entre otros (Lacorte y col., 1996). Por otro lado, Kamel y col. (2008) demostraron que el temefos se oxida en agua clorada después de 72 h de incubación en productos estables, como el Tem-SO, el temefos oxón sulfóxido (Tem-oxón-SO), el temefos dioxón sulfóxido (Tem-dox-SO) y el temefos dioxón sulfona (Tem-dox-SO₂). Esto sugiere que la población en general podría estar expuesta al compuesto padre temefos y sus derivados oxidados cuando se agrega al agua potable clorada, tal como sucede en áreas endémicas de dengue cuando se agrega este larvicida al agua para consumo humano.

1.2.5 Toxicocinética

1.2.5.1 Absorción

Las principales vías de absorción por exposición al temefos son: el tracto gastrointestinal a través del agua potable, seguida por la piel y la inhalación cuando se aplica en forma de aerosol; sin embargo, la mayoría de los estudios disponibles se han centrado principalmente en la absorción por vía oral usando a la rata como modelo. La absorción del temefos es rápida utilizando un compuesto emulsionado en solución salina o disuelto en un vehículo oleoso. De acuerdo con las propiedades fisicoquímicas del temefos, éste atraviesa fácilmente las membranas y, por lo tanto, la concentración en sangre depende de la fisiología de la especie y el tipo de exposición, esto limitará la capacidad del plaguicida para alcanzar altas concentraciones en sangre después de la exposición oral. Actualmente solo se cuenta con un solo reporte en el que se calculó un $t_{1/2}$ de abs el cual fue de 0.38 h (Tabla 1) (Verdín-Betancourt y col., 2021). Por su parte, Blinn (1969), reportó que el temefos entra a un ciclo entero-hepático intenso utilizando al cuyo como modelo, lo cual podría representar una explicación para los bajos niveles de temefos en sangre observados después de su

administración y lo que favorecería su acumulación gradual en el tejido adiposo.

1.2.5.2 Distribución

El temefos cuenta con una amplia distribución, la cual ocurre de una manera relativamente rápida a todos los órganos y tejidos después de la administración de dosis únicas o repetidas (Blinn, 1969; Miron-Vani y col., 2018; Ramos-Flores y col., 2021; Verdín-Betancourt y col., 2021). Debido a su elevada lipofiliidad ha mostrado una capacidad de acumulación en órganos dependiendo del contenido lipídico de cada uno de ellos, así como de su vascularización (tejido adiposo, hígado, riñones, cerebro, tracto gastrointestinal, músculo y aparatos reproductores). Estos dos factores contribuyen de manera importante en el aclaramiento sanguíneo de este plaguicida, el cual ha mostrado ser relativamente elevado (Verdín-Betancourt y col., 2021). Es importante considerar que la elevada acumulación del temefos representa un medio de exposición endógena por largo tiempo, ya que éste va a ser liberado gradualmente del tejido adiposo al torrente sanguíneo, y puede conducir a la aparición de efectos tóxicos a largo plazo, tal como ha sido descrito para otros plaguicidas liposoluble (Jokanovic, 2001).

1.2.5.3 Biotransformación

Los reportes sobre la biotransformación del temefos indican que este plaguicida es amplia e intensamente biotransformado en la rata a por lo menos 18 metabolitos. En el primer estudio publicado al respecto se reportó la presencia de los metabolitos Tem-SO, el tiodifenol (TDF), el tiodifenol sulfóxido (TDF-SO) o sulfinildifenol (SIDF) y el tiodifenil sulfona (TDF-SO₂) ó 4,4'-sulfonildifenol (SODF), también llamado bisfenol "S" (BPS), en la orina, heces y grasa de ratas tratadas con una sola dosis del plaguicida (Blinn, 1969). Recientemente, se demostró que el temefos se biotransforma eficientemente mediante reacciones de S-oxidación, desulfuración oxidativa e hidrólisis, a una amplia variedad de productos del metabolismo de fase I (Figura 2). Estos metabolitos corresponden a oxones, dioxones, metabolitos oxidados y metabolitos mono- y di-desfosforilados (Verdín-Betancourt y col., 2021). La mayoría de los metabolitos de esta vía se detectaron e identificaron rápidamente en la sangre y algunos tejidos luego de la administración de una sola dosis de 300 mg/kg por vía oral. En la sangre, se identificaron dos metabolitos, el temefos sulfona monohidrolizada (Tem-SO₂-OH) y el Tem-oxón siendo el hígado el órgano donde se detectaron más metabolitos, entre ellos Tem-oxón,

Tem-SO, Tem-dox-SO₂, TDF y TDF-SO₂. En el riñón se detectaron el Tem-oxón, el Tem-dox-SO₂ y el Tem-SO₂-OH; los metabolitos Tem-SO, Tem-oxón y Tem-SO₂-OH fueron detectados en el cerebro y en el tejido adiposo se detectaron el Tem-oxón, el Tem-SO y el Tem-SO₂-OH. Del mismo modo, después de la administración de temefos a dosis repetidas de 300 mg/kg/d por vía oral, se observaron los metabolitos Tem-SO, TDF-SO₂ o BPS y un metabolito no identificado (MNI) en los testículos, y el Tem-SO, el Tem-oxón, el Tem-dox-SO y el mismo MNI fueron detectados en el epidídimo (Ramos-Flores y col., 2021). Estos resultados indican que el temefos puede metabolizarse en varios órganos; resaltando que el hígado es el órgano más importante involucrado en su biotransformación. Mientras que en el metabolismo de fase II algunos de estos metabolitos son candidatos para ser conjugados con el ácido glucurónico o bien con sulfato (Blinn, 1969; Shih, 2022).

Tabla 1.- Parámetros toxicocinéticos del temefos.

Parámetros	Valores
K_{abs} (h ⁻¹)	1.812
K_{elim} (h ⁻¹)	0.078
$t_{máx}$ (h)	2
$C_{máx}$	10.4
$t_{1/2}$ abs	0.38
$t_{1/2}$ elim	8.6
V_d (mL)	38,215.0
Cl (mL/h)	3,072.7
$AUC_{0-\infty}$ (µg-h/mL)	98.0

*Los datos se obtuvieron por la administración de una sola dosis oral de 300 mg/kg de temefos (Modificado de Verdín-Bentancourt y col., 2021).

Sobre las enzimas que participan en su biotransformación, la información hasta el momento es limitada. Sin embargo, se ha determinado que los citocromos P450 (CYP) 2B1/2 y 3A1/2 están involucrados en la formación de los oxones y dioxones y las monooxigenasas que contienen flavina y algunas isoformas de CYP en la formación de los sulfóxidos y las sulfonas (Hernández-Esteris, 2020). Por otra parte, a partir de un estudio *in silico* se propuso una ruta de biotransformación similar en el humano, estando involucradas los CYP1A2, 2C9,

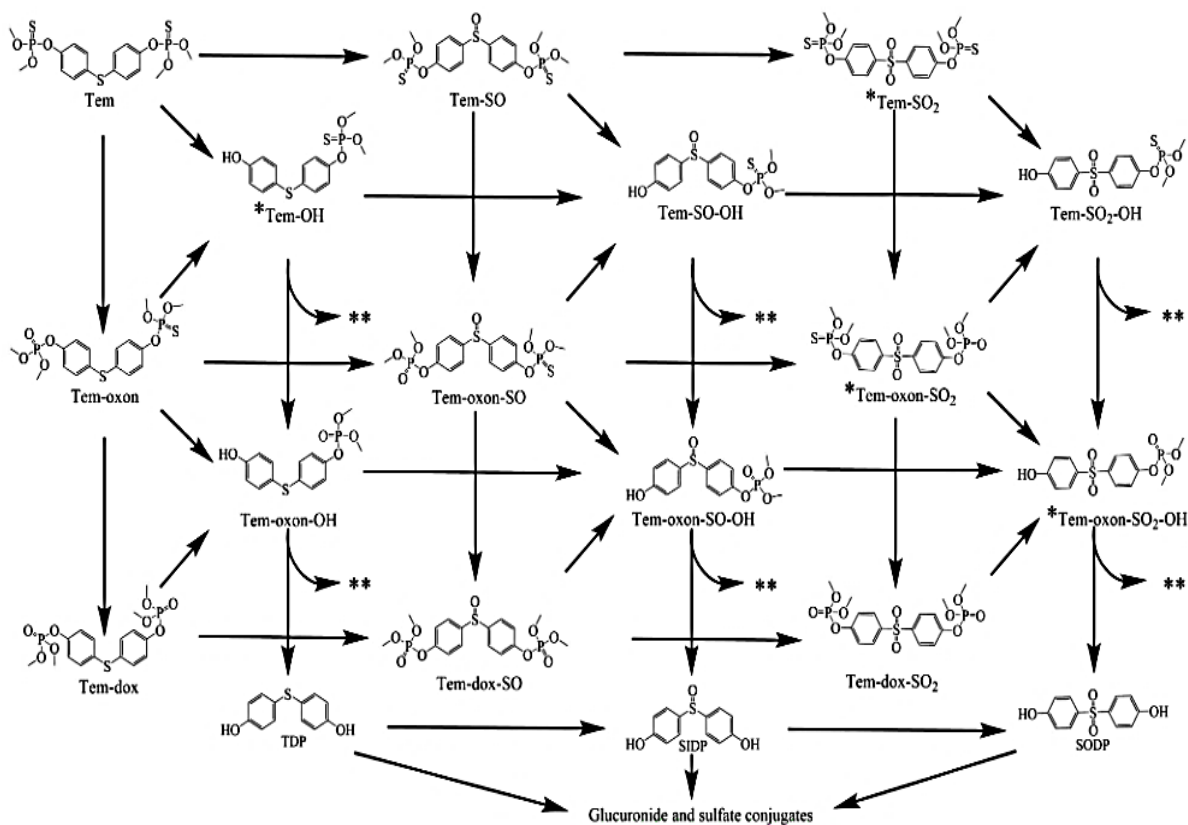


Figura 2. Propuesta de biotransformación fase I de temefos en rata. *Metabolitos teóricos. **Sustratos potenciales para la conjugación con ácido glucurónico o sulfato (Tomado de Martínez-Mercado y col., 2022).

1.2.5.4 Eliminación

Actualmente solo existe un estudio sobre la eliminación de temefos, reportando un valor de aclaramiento sanguíneo (Cl) de 3,085.7 mL/h (Verdín-Betancourt y col., 2021). Este valor es relativamente alto e indica que el temefos se elimina rápidamente de la sangre, lo que puede deberse a la amplia distribución de este compuesto en diferentes tejidos. Las principales vías de eliminación de temefos descritas en ratas tras su administración oral son las heces y la orina (Blinn, 1969). El $t_{1/2 \text{ elim}}$ calculado en sangre es de 7 a 10 h (Tabla 1) (Blinn, 1969; Ferguson y col., 1985; Verdín-Betancourt y col., 2021). El temefos también se elimina por la bilis, como se demostró en cuyos, su concentración en este medio fue 100 veces mayor que la observada en la sangre lo que permitió a Blinn (1969) proponer que el temefos entra a un

ciclo enterohepático muy intenso. Esto podría deberse a las propiedades fisicoquímicas del temefos, incluida su alta lipofilidad y peso molecular elevado. La orina es la principal vía de eliminación de los metabolitos conjugados de temefos, principalmente los metabolitos dihidrolizados TDF, TDF-SO y TDF-SO₂ o BPS (Blinn,1969; Shih, 2022). Así mismo, Shih (2022), sugiere que el temefos sufre un metabolismo exhaustivo hasta convertirse en los metabolitos desfosforilados finales, de los cuales, el TDF es el mayoritario y puede ser usado como un biomarcador de exposición a este plaguicida, debido a su prolongado $t_{1/2 \text{ elim-U}}$ y alta especificidad, además, es detectable después de 336 h en muestras de orina después de la administración de una sola dosis.

1.2.6 Información toxicológica del temefos

1.2.6.1 Toxicidad general

La OMS ha clasificado al temefos en la clase III, como un compuesto de baja toxicidad, lo que indica que es inocuo o de muy baja toxicidad para los mamíferos en exposiciones agudas. Del mismo modo, estableció una dosis letal 50 (DL₅₀) de 4,240 mg/kg por vía oral en ratas macho y de 4,700 mg/kg también por vía oral en ratones macho. La DL₅₀ por exposición dérmica en ratas es similar a la observada por vía oral, con un valor >4,000 mg/kg, mientras que la observada por inhalación es >4.79 mg/L (OMS, 2006). Con respecto a las exposiciones subcrónicas, el nivel sin efecto adverso observable (NOAEL) propuesta por la OMS es de 2.3 mg/kg/d durante un máximo de 90 días en ratas, calculada en función del efecto sobre la AChE cerebral y un nivel de mínimo efecto tóxico observable (LOAEL) de 100 mg/kg/d durante un máximo de 44 días en ratas, con base en los signos clínicos colinérgicos.

Por otro lado, la EPA lo ha clasificado como un plaguicida sistémico en el grupo II, como un compuesto de toxicidad moderada. Su DL₅₀ es de 444 mg/kg por administración oral en ratas, una NOAEL de 0.3 mg/kg/d y una LOAEL de 0.9 mg/kg/d durante un máximo de 90 días en función de la inhibición de la actividad de la AChE eritrocitaria en ratas de ambos sexos (EPA, 2016). Probablemente, estas diferencias en los parámetros puedan ser explicadas debido a que ambas agencias lo realizaron en diferentes años y se basaron en diferentes guías para establecer dichos parámetros.

1.2.6.2 Toxicidad sistémica

La información toxicológica del temefos en diversos órganos y sistemas actualmente es

todavía limitada. De acuerdo con la OMS (2006), alguna de la información disponible acerca de la toxicidad del temefos no cumple con las buenas prácticas de laboratorio, por lo tanto, la información no es confiable. Por lo que es necesario continuar corroborando la información e investigando más acerca de la toxicidad que pueda generar este plaguicida. A continuación, se describe la información disponible más relevante sobre la toxicidad sistémica del temefos.

1.2.6.3 Neurotoxicidad

En cuanto a la inhibición de la AChE, se ha demostrado que el temefos inhibe la actividad de esta enzima bajo diferentes esquemas de exposición en diferentes especies. Ramos-Flores y col. (2021) reportaron una disminución de alrededor del 20% en la actividad de AChE al tercer día y 29% al séptimo día después de la administración de temefos a la dosis de 1 mg/kg/d. Por su parte, las ratas que recibieron 100 mg/kg/d mostraron una inhibición del 70% a los días 3, 5 y 7. Sin embargo, en este último estudio se observaron mortalidades del 13 y 41% a los 5 y 7 días de exposición, respectivamente. Anteriormente, Ferguson y col. (1985) reportaron que la exposición de ratas Sprague Dawley hembra adultas a una dosis alta (300 mg/kg) de temefos en exposiciones únicas o repetidas (5 días) mostraron una inhibición de la AChE eritrocitaria del 67% después de 4 h y del 47% después de 48 h. Después de la exposición repetida, la inhibición máxima de la AChE fue del 100%, con signos clínicos de intoxicación, como fasciculación muscular, salivación, micción y diarrea que aparecieron el día 4 del tratamiento y continuaron hasta el final del estudio. La inhibición de la AChE eritrocitaria asociada con la exposición al temefos fue atribuida al Tem-oxón, aunque nunca se había demostrado la formación de este metabolito; sin embargo, recientemente, Verdín-Betancourt y col. (2021), reportaron que el temefos se metaboliza ampliamente en varios metabolitos oxidados en ratas, incluidos varios oxones y dioxones, sugiriendo que la inhibición de la actividad enzimática de la AChE se debe al efecto aditivo de varios de estos metabolitos como se demostró en un estudio *in vitro* en el cual se evaluó la capacidad de varios metabolitos de temefos oxidados para inhibir la actividad de la AChE eritrocitaria humana de manera dependiente del grado de oxidación de éstos (Verdín-Betancourt y col., 2019).

Otro estudio en ratas expuestas a temefos a una dosis de 1,000 mg/kg *ip* mostraron un rendimiento deficiente en la respuesta a una conducta condicionada expuestas previamente a los 6 días después de la exposición, pero no a los 2, 8, 10 o 16 días (Kurtz y Weeks, 1979). En 2019, se reportó que la exposición prenatal de ratas entre los días 6 y 13 de gestación a

una dosis de 50 mg/kg/d de temefos causó en las crías hiperactividad, un comportamiento estereotipado y deterioro en la relación social (Martins-Laurentino y col., 2019).

1.2.6.4 Genotoxicidad

En un estudio hecho en ratas Wistar macho expuestas a 2.14 mM de temefos en el agua de bebida (concentración similar a la utilizada para combatir los mosquitos), se observó que el temefos produjo daños en el ADN de las células sanguíneas (Aiub y col., 2002). Por su parte, Benítez-Trinidad y col. (2015), determinaron por medio de un estudio *in vitro* en linfocitos humanos y células HepG2 incubadas con temefos (10 mM), que el plaguicida produce efectos citostáticos y apoptóticos, así como la capacidad de producir daño en el ADN (evaluado por el ensayo cometa) en linfocitos. Una de las conclusiones de este estudio fue que el desarrollo de los efectos evaluados es dependiente de la capacidad metabólica de las células utilizadas. Por su parte, Miron-Vani y col. (2018), reportaron la presencia de micronúcleos en células sanguíneas de ratones hembra gestantes después de 48 h de exposición a 0.043 mg/kg/d durante todo el período de gestación.

1.2.6.5 Toxicidad reproductiva

El temefos también ha mostrado producir daño sobre la función reproductiva. Ratas macho adultas expuestas a 100 mg/kg/d durante 7 días presentaron una disminución significativa en la motilidad de los espermatozoides (30%) y la viabilidad (7.5%) (Camacho-Hernández, 2019). Efectos similares sobre la motilidad (12%) y viabilidad (5%) se detectaron en los espermatozoides después de 5 días de exposición, además, de una alteración en la morfología de los espermatozoides, daños en el ADN, disminución del 30% en el potencial de fertilización de los espermatozoides y la presencia de cigotos fragmentados fertilizados con espermatozoides de ratas tratadas ratas expuestas también a 100 mg/kg/d de temefos durante 5 días (Ramos-Flores y col., 2021).

1.2.6.6 Hepatotoxicidad

Otro órgano en el que se han observado algunos efectos es el hígado, y la evaluación de la hepatotoxicidad por el temefos ha recibido poca atención. En conejos tratados a una dosis de 100 mg/kg/d durante 5 días por vía oral, se observó que el temefos genera necrosis difusa y focal en el hígado (Gaines y col., 1967). Por otro parte, la OMS reportó que una sola dosis

de temefos de 10,000 mg/kg administrado a ratas macho por vía oral provocó una decoloración del hígado en todos los animales tratados y estuvo acompañada de sangrado en la luz intestinal (OMS, 2006). En el mismo sentido, Singh y col. (2011) reportaron un aumento en las actividades séricas de las enzimas hepáticas aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y la fosfatasa alcalina (FAL) en trabajadores expuestos a OF, entre los que se incluía al temefos. Recientemente, se reportó una disminución de 12% del peso relativo del hígado en ratas macho adultas expuestas a temefos a la dosis de 100 mg /kg/d durante 5 días, lo que sugirió un efecto hepatotóxico severo (Ramos-Flores y col., 2021). En un estudio similar usando la misma dosis, se observó, además, un aumento en los niveles de bilirrubina directa, indirecta y total, y un desequilibrio lipídico caracterizado por una disminución de los triglicéridos, lípidos de baja densidad (LDL) y lípidos totales, así como la muerte en 41% de los animales tratados (Hernández-Esteris y col., 2020). Todo esto sugiere que el temefos puede causar un daño severo en el hígado. Así mismo, nos indica una alteración importante en el metabolismo de lípidos, tal como las LDL y en metabolismo de compuestos endógenos, entre los que se incluyen las bilirrubinas. Por otra parte, hay controversia acerca del efecto del temefos sobre la regulación del CYP hepático. Mientras que Ennin y Franklin (1979) reportaron un aumento en el contenido de CYP total hepático, Ferguson y col. (1985) reportaron una inhibición de las monooxigenasas a una dosis de 300 mg/kg/d y Hernández-Esteris (2020), observó una inducción leve solo de los CYP2C11 y 3A a una dosis de 50 mg/kg/d por 3 días. En el mismo sentido, el temefos ha mostrado ser un inhibidor potente de la carboxilesterasa (CbxE) hepática (Murphy y Sheever, 1972). Del mismo modo, Ba-Omar y col., 2013, Reportaron que dosis a partir de 5 ppm generan cambios en el tejido hepático, aberraciones, agrandamiento de las gotas de lípidos, vacuolización citoplasmática, picnosis de los núcleos y necrosis focal en el modelo de pez *Aphanius dispar* (Ba-Omar y col., 2013).

Todos estos resultados sugieren, que el temefos y sus metabolitos pudieran interaccionar con varias macromoléculas como los receptores nucleares (RN), los cuales juegan un papel importante en la regulación de varias vías metabólicas y la regulación génica hepática. Por lo tanto, se podría generar un daño potencial, principalmente por una alteración en el metabolismo de los lípidos regulados principalmente por los receptores X del hígado (LXR) y el receptor activador de la proliferación de peroxisomas (PPAR).

1.3 Receptores nucleares

Los RN son una clase de factores de transcripción activados por ligandos que tienen funciones importantes en la fisiología celular. Varios de los RN, incluidos el LXR (también conocido como receptor de oxisteroles), el receptor X del farnesoil (FXR) y el PPAR, responden a cambios en los niveles celulares de ligandos lipídicos endógenos mediante la regulación de la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en el metabolismo de los lípidos (Wong, 2018).

De acuerdo con Gao y col. (2013), la activación del LXR isotipo α (LXR- α) por el ligando T0901317 y del isotipo α del PPAR (PPAR- α) por fenofibrato (agonistas de estos receptores) o en combinación, tienen un impacto significativo en la homeostasis de glucosa y lípidos, así como la acumulación de lípidos en el hígado y los tejidos adiposos de ratones obesos inducidos por una dieta alta en grasas. La activación concomitante de ambos RN exacerba drásticamente la esteatosis hepática. Del mismo modo, la activación de ambos receptores aumenta significativamente la lipogénesis al elevar la transcripción de *SREBP1C*, *CHREBP*, *ACC1*, *FAS*, *SCD1* y *CD36*. Con el tratamiento combinado se aceleró la movilización de los lípidos en el tejido adiposo blanco y liberó ácidos grasos libres a la circulación. Por lo que, la activación simultánea de LXR- α /PPAR- α modula sinérgicamente la expresión de genes implicados en el metabolismo de los lípidos y la glucosa en el hígado.

1.3.1 Receptor “X” del hígado

El LXR consta de dos isotipos, el LXR- α (codificado por *Nr1h3*) y el LXR- β (codificado por *Nr1h2*) (Apfel y col., 1994; Willy y col., 1995). Ambos isotipos comparten una amplia homología de secuencia, pero tienen distintas distribuciones tisulares. El LXR- α se expresa en gran medida en tejidos metabólicamente activos como el hígado, intestino delgado, tejido adiposo, entre otros, y algunos tipos de células como macrófagos; mientras que LXR- β se expresa de forma ubicua (Repa y col., 2000; Seol y col., 1995). Los LXR forman heterodímeros de manera obligada con el receptor X isotipo α de los retinoides (RXR- α) y se unen a una secuencia de reconocimiento en el ADN específica conocida como elemento de respuesta a LXR (LXRE). Del mismo modo, los LXRE contienen variaciones de la secuencia repetida AGGTCA, separadas por cuatro nucleótidos, y en ausencia de ligandos, se cree que los complejos LXR-RXR se unen a los co-represores, como el mediador silenciador del ácido retinoico (RA) y el receptor de la hormona tiroidea (SMRT) o el co-represor del receptor nuclear (NCoR), y así reprimen la expresión del gen diana (Chen y Evans, 1995; Horlein y col., 1995). Los ligandos

que se unen a los LXR inducen un cambio conformacional en los complejos LXR-RXR; este cambio provoca la liberación de correpresores y el reclutamiento de coactivadores como la histona acetiltransferasa p300 (también conocida como proteína p300 asociada a E1A) y el cointegrador de señales de activación 2 (ASC2; también conocido como NCOA6), lo que da como resultado el aumento de la transcripción de los genes diana (Glass y Rosenfeld, 2000). El LXR- α humano (hLXR- α) es un gen autoinducible, proporcionando un mecanismo sensorial único utilizado por las células para responder al aumento de los niveles de colesterol mediante la generación de ligandos LXR, lo que lleva no solo a la activación del receptor, sino también a un aumento de los niveles del receptor dentro de la célula, lo que conduce a una amplificación de la respuesta a los oxisteroles y de la vía de salida del colesterol LXR-ABCA1, y de esta forma los promotores de LXR- α son inducidos por ligandos del PPAR (Li y col., 2002).

1.3.2 Funciones del LXR

1.3.2.1 Metabolismo del colesterol

El descubrimiento de que los oxisteroles activaban al LXR permitió determinar que los LXR están implicados en el mantenimiento de la homeostasis del colesterol y también se identificó el gen que codifica al CYP7A1, el cual es la enzima limitante de la velocidad en la vía de síntesis de ácidos biliares (Peet y col., 1998). En cuanto a la excreción de colesterol del hígado, los LXR estimulan la excreción de colesterol biliar directamente a través de sus genes diana *Abcg5* y *Abcg8* (Yu y col., 2003). Por estas razones, los LXR, especialmente el LXR- α hepático, tiene un papel clave en la homeostasis del colesterol en el organismo.

1.3.2.2 Transporte inverso de colesterol

Siendo importantes los LXR en el mantenimiento de la homeostasis del colesterol, éstos también promueven el transporte inverso del colesterol (RCT), un proceso mediante el cual el exceso de colesterol en los tejidos periféricos se transfiere a las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y esta se transporta al hígado para la síntesis y excreción de ácidos biliares. El paso inicial en el RCT es la salida de colesterol celular que implica la transferencia de colesterol libre a la apolipoproteína A1 (*ApoA1*). La salida de colesterol celular está mediada principalmente por los transportadores de cajas de unión a ATP subfamilia A (*ABCA1*) y el miembro 1 de la subfamilia G de cajas de unión a ATP (*ABCG1*), dos de los primeros factores de respuesta a LXR identificados (Kennedy y col., 2005; Venkateswaran y col., 2000). El análisis estructural

de ABCA1 unido a la membrana ha revelado que dos dominios extracelulares forman un túnel hidrofóbico que facilita la exportación de colesterol (Qian y col., 2017). También se ha demostrado que el ABCG1 se localiza en las endosomas y permite el transporte de esteroides intracelulares fuera del retículo endoplásmico (Tarling y Edwards, 2011).

1.3.2.3 Biosíntesis de colesterol

Los LXR funcionan de la mano con la vía de la proteína de unión al elemento regulador de esteroides 2 (*SREBP2*) para mantener los niveles de esteroides celulares y sistémicos. Mientras que el LXR facilita la eliminación del exceso de colesterol en respuesta a niveles celulares elevados de colesterol, el *SREBP2* promueve la biosíntesis y la captación de colesterol en respuesta a niveles bajos de colesterol en las células. Así mismo, se ha demostrado que *SREBP2* activa la transcripción de *ABCA1* al generar ligandos de oxisterol para el LXR (Wong y col., 2006).

1.3.2.4 Captación de colesterol

El receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR), es una proteína de superficie celular, la cual es esencial para la captación de colesterol LDL y el mantenimiento de los niveles plasmáticos de colesterol (Russell y col., 1984). La expresión del LDLR está regulada tanto a nivel transcripcional como postraduccional. El principal factor de transcripción para LDLR es *SREBP2*, que, en respuesta a niveles bajos de colesterol, impulsa la transcripción de genes que codifican a las enzimas involucradas en la biosíntesis de colesterol y la captación de colesterol LDL (Hua y col., 1993).

1.3.2.5 Metabolismo de los ácidos grasos

Además de su importancia en la modulación de la homeostasis del colesterol, los LXR también son reguladores clave de la lipogénesis de *novo* en el hígado (Joseph y col., 2002; Repa y col., 2000; Schultz y col., 2000). La actividad lipogénica de los LXR se debe a la inducción transcripcional del gen que codifica *SREBP1c*, un activador central de la transcripción de la biosíntesis de ácidos grasos. Además, los LXR activan directamente la transcripción de varios genes lipogénicos a través de LXRE en sus regiones promotoras, incluidos los que codifican para la enzima ácido graso sintasa (*Fasn*) y la esteroil-coenzima A desaturasa 1 (*Scd1*) (Chu y col., 2006). Así mismo, los LXR también modulan la expresión

de otro regulador lipogénico, la proteína de unión a elementos de respuesta a carbohidratos (*ChREBP*). Además de modular la lipogénesis en el hígado, los LXR también regulan el catabolismo de ácidos grasos en otros tejidos, y del mismo modo se ha demostrado que los agonistas de LXR aumentan la lipólisis y la β -oxidación de ácidos grasos en los tejidos adiposos (Ross y col., 2002; Stenson y col., 2009).

1.3.3. Receptor activador de la proliferación de peroxisomas (PPAR)

Los PPAR son factores de transcripción dependientes del ligando, lo que indica que la activación de la transcripción de los genes diana de este receptor depende de la unión de su ligando al receptor. Se han identificado 3 isotipos del PPAR: α , β y γ . De forma específica, el PPAR- α se expresa mayoritariamente en el tejido adiposo, hígado, riñón, corazón y músculo esquelético. Algunos ligandos son compartidos por los tres isotipos, como los ácidos grasos poliinsaturados. Varios compuestos se unen con alta afinidad al PPAR- α , incluidos los ácidos grasos insaturados de cadena larga como el ácido linoleico, los ácidos grasos ramificados, conjugados y oxidados, así como los eicosanoides (Wahli y col., 2000). Del mismo modo que los LXR, los PPAR también se heterodimerizan con el RXR- α y alteran la transcripción de los genes diana. Se ha demostrado que la sobreexpresión del PPAR inhibe la actividad del promotor *SREBP1C* a través de la competencia con la heterodimerización LXR/RXR. Por lo que, la homeostasis de los lípidos hepáticos es el resultado de una compleja interacción entre una serie de factores de transcripción, como el LXR, PPAR y SREBP (Fernandez-Alvarez y col., 2011).

1.3.3.1 Funciones del PPAR- α

El PPAR- α controla la expresión de diversos genes involucrados en las vías metabólicas de lípidos, incluida la oxidación de ácidos grasos microsomal, peroxisomal y mitocondrial, la unión y activación de ácidos grasos, la elongación y desaturación de ácidos grasos, la síntesis y descomposición de triglicéridos y gotas de lípidos, metabolismo de lipoproteínas, gluconeogénesis, metabolismo de ácidos biliares y otras vías metabólicas. El heterodímero PPAR- α -RXR reconoce y se une a los elementos de respuesta del PPAR (PPARE), que se localizan en regiones reguladoras de genes y se organizan como una repetición directa tipo 1 (*DR1*). El DR1 consta de dos copias del motivo de reconocimiento de nucleótidos hexamérica 5'-AGGTCA-3' separadas por un solo nucleótido. Los heterodímeros PPAR- α -RXR pueden

formarse independientemente del ligando PPAR- α (Bougarne y col., 2018). De manera similar a los PPAR, muchos otros miembros de los RN también necesitan RXR como su compañero de heterodimerización obligatorio, lo que aumenta la posibilidad de una competencia entre RN particulares por su compañero de unión común. Esta competencia puede tener resultados biológicos importantes, como la activación del LXR- α mediante la sobreexpresión de LXR- α o la activación del ligando que suprime la señalización de PPAR- α a través de la reducción de los heterodímeros PPAR- α -RXR activos en el hígado y, por lo tanto, disminuye la ocupación de PPARE. Por el contrario, el exceso de PPAR- α en presencia de sus ligandos suprime el promotor de la proteína de unión al *SREBP1C* que contiene dos elementos de respuesta al LXR, lo que indica que el mecanismo de competencia por RXR- α entre PPAR- α y LXR- α puede ser recíproco. Esta relación entre PPAR- α , LXR- α y RXR podría ser crucial para una regulación mutua de las actividades de LXR- α y PPAR- α y, por lo tanto, para la regulación de sus genes diana (Bougarne y col., 2018).

1.3.3.2 Interacción entre xenobióticos y los receptores LXR- α y PPAR- α

Hasta el momento, la información disponible acerca de la modulación del LXR por xenobióticos como fármacos, contaminantes ambientales u otra clase de compuestos químicos es limitada. A partir de estudios *in silico*, los cuales fueron validados experimentalmente *in vitro*, se ha visto que algunos ésteres del ácido ftálico indujeron cambios relevantes en la expresión del LXR- α y de otros genes blanco como el *SREBP1C* y el de la glucocinasa. También algunos derivados orgánicos del ácido fosfórico, como el tri-*m*-tolil fosfato (TMTP) y el tri-*o*-tolil fosfato y otros compuestos como el bisfenol A (BPA; disruptor endocrino (DE) que produce efectos estrogénicos) y el bezafibrato, mostraron una fuerte interacción con el receptor obtenida por *docking* molecular (Mozzicafredo y col., 2015). Por otra parte, también se vio que tiene un papel importante como hepatoprotector en la toxicidad inducida por la fumonosina 1B (Régnier y col., 2019).

En reportes recientes se ha propuesto que la interacción de xenobióticos, entre ellos los clasificados como DE, con diversos RN pueden tener un papel importante para el desarrollo de algunas enfermedades como Parkinson, Alzheimer, diabetes, obesidad, síndrome metabólico y síndrome respiratorio obstructivo crónico (Giulivo y col., 2016; Kahn y col., 2020). Actualmente se cuenta con evidencias que sugieren que los LXR podrían ser blancos importantes de los DE ambientales, como los OF, ya que se ha demostrado que algunos

compuestos se unen a este receptor y pueden tener un papel importante en el desarrollo de estas patologías. Además, de la comunicación cruzada que puede ocurrir entre varios receptores, tales como el receptor X de pregnanos (PXR), el LXR- α , PPAR- α y el RAR, debido a que comparten ligandos comunes, lo que sugiere que los ligandos de PXR ambientales también podrían interactuar con los LXR (Toporova y Balaguer, 2019).

1.4 Justificación

El temefos es un OP usado ampliamente en México para combatir mosquitos transmisores de enfermedades como el dengue, Zika y chikungunya. El temefos, al ser un compuesto inestable, se oxida bajo condiciones ambientales y forma derivados oxidados, los cuales también se forman cuando este plaguicida se agrega en agua clorada. Por estas razones, cuando es añadido en el agua para consumo humano representa un riesgo de exposición a temefos y sus metabolitos oxidados para la población. El temefos se absorbe rápidamente y se acumula en el tejido adiposo y se metaboliza ampliamente a por lo menos a 18 metabolitos intermediarios, todos ellos con diferente potencial toxicológico en el hígado.

Por otra parte, la evaluación de la hepatotoxicidad por el temefos es muy limitada, sin embargo, los antecedentes disponibles indican que el temefos puede generar daño severo en este órgano principalmente una alteración en el balance de lípidos. Del mismo modo, no se ha determinado la interacción del temefos con RN los cuales son importantes para la regulación de algunas funciones hepáticas, como el LXR- α y el PPAR- α los cuales tienen un papel relevante en el metabolismo de lípidos. Ante esta situación, es necesario determinar la hepatotoxicidad del temefos y su efecto sobre el LXR- α y el PPAR- α y evaluar los daños potenciales asociados a estos receptores.

1.5 Hipótesis

El hígado es un órgano blanco del temefos, por lo tanto, la exposición repetida a este plaguicida producirá daño hepático y afectará la activación de los receptores nucleares LXR- α y el PPAR- α .

1.6 Objetivos

1.6.1 General

Evaluar la hepatotoxicidad en ratas macho adultas expuestas a dosis repetidas de temefos.

1.6.2 Particulares

1. Determinar el daño hepático por la exposición al temefos por medio de los siguientes marcadores:
 - a. Actividades enzimáticas de la ALT, AST, FAL, GGT y LDH en suero.
 - b. Los diferentes tipos de lípidos en el suero: VLDL, LDL, HDL, lípidos totales, triglicéridos y colesterol.
 - c. Estado redox en el órgano: GSH, GSSG, GSH/GSSG y MDA en el órgano.
 - d. Los diferentes tipos de bilirrubinas (total, libre y conjugada) en suero.
2. Determinar el efecto del temefos sobre los niveles hepáticos de proteína de los receptores LXR- α y PPAR- α .
3. Análisis histológico del parénquima hepático
 - a. Determinación de lípidos internos en el hígado.

2. Métodos

2.1 Diseño experimental del estudio.

Este estudio se desarrolló con base en el diseño experimental que se ilustra en la Figura 3.

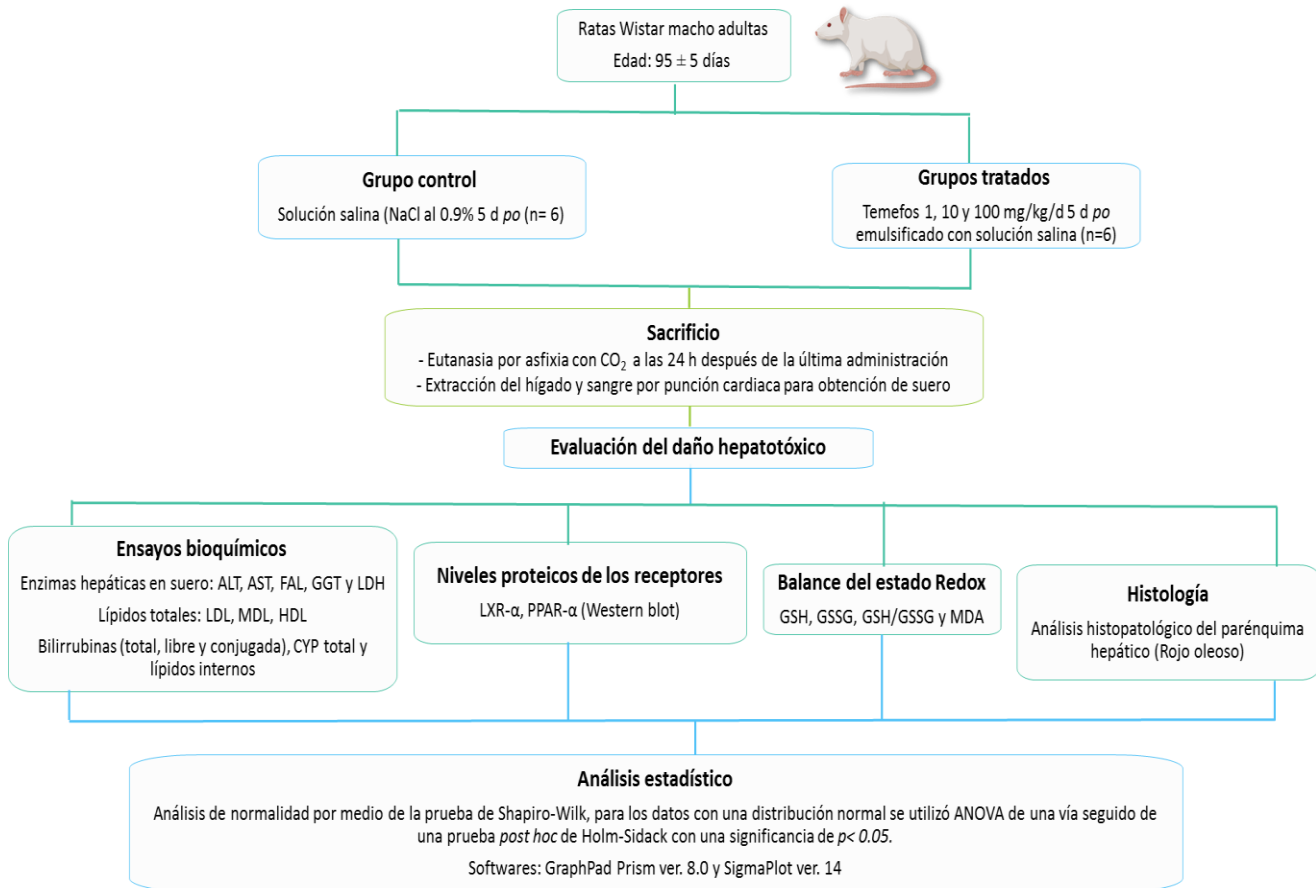


Figura 3. Diseño experimental.

2.2 Animales

Como modelo experimental se utilizaron ratas macho Wistar de 90 ± 5 días de edad obtenidas de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV-IPN. Previo al tratamiento, los animales fueron sometidos a un proceso de aclimatación por 5 días. Durante el desarrollo experimental, los animales permanecieron en un cuarto con temperatura controlada con ciclos de luz-obscuridad de 12 h, a una temperatura de 22 ± 1 °C y una humedad relativa de 50-60%, con libre acceso a agua y alimento. El cuidado de los animales se realizó de acuerdo con los protocolos de trabajo de la UPEAL, que corresponden a lo establecido en la NOM-062-ZOO-1999.

2.3 Tratamiento

Para el desarrollo del trabajo los animales fueron divididos en 4 grupos, cada uno integrado por 6 animales.

- a) Grupo control: los animales fueron tratados con solución fisiológica (NaCl al 0.9%) por vía oral empleando sonda gástrica en una cantidad equivalente a la empleada para tratar a los animales del grupo tratado con temefos.
- b) Grupos tratados: los animales fueron tratados con una dosis diaria de 1, 10 o 100 mg/kg/d durante 5 días con temefos emulsificado con solución fisiológica por vía oral empleando sonda gástrica. La dosis se ajustó diariamente al peso del animal.

2.4 Sacrificio

A las 24 h después de la última dosis los animales fueron eutanizados por asfixia con CO₂. Posterior al sacrificio, se les extrajo el hígado y la sangre por punción cardiaca, la cual se procesó para obtener el suero.

2.5 Ensayos bioquímicos

El suero obtenido fue enviado al laboratorio certificado "Laboratorios Especializados en la Salud S.A. de C.V." para el análisis de los parámetros bioquímicos: ALT, AST, FAL, GGT, LDH, lípidos totales, triglicéridos, colesterol total, VLDL, LDL, HDL, bilirrubinas (indirecta, directa y total), por medio de métodos colorimétricos e inmunológicos.

2.6 Determinación de proteínas

2.6.1 Principio

La determinación de proteínas se realiza con base en la formación de un complejo colorido entre el Cu²⁺ del fenol en medio alcalino y los aminoácidos aromáticos tirosina y triptófano de las proteínas en una reacción de 2 pasos: a) reacción de las proteínas con iones cúpricos en medio alcalino y b) reacción del reactivo de los ácidos fosfomolibdico-fosfotúngstico a azul de molibdeno y azul tungsteno por el complejo proteína-Cu, tirosina y triptófano (Lowry y col., 1951).

2.6.2 Soluciones

- Solución patrón de albúmina 1 mg/mL: se disolvieron 10 mg de albúmina en 10 mL de agua Milli-Q. Esta solución se almacenó en alícuotas de 1 mL a -20 °C.

- Solución “A” de Na_2CO_3 al 2%, NaOH 0.1 N y tartrato de sodio y potasio al 0.02%: se pesaron 20 g de Na_2CO_3 y 4 g de NaOH g de tartrato de sodio y potasio, y se aforó a 1 L con agua Milli-Q.
- Solución “B”: Sulfato de cobre al 1%: se disolvió 1 g de CuSO_4 y se aforó a 100 mL con agua Milli-Q.
- Solución “C”: se mezclaron 50 mL de la solución “A” y 1 mL de la solución “B”. Esta mezcla se preparó inmediatamente antes de su uso.
- Folin-Ciocalteu 1 N: el reactivo de Folin-Ciocalteu 2 N se disolvió (1:2) con agua Milli-Q. Esta solución se preparó inmediatamente antes de su uso.

2.6.3 Procedimiento

Se realizó una curva de calibración con albúmina 1 mg/mL (Tabla 2). A las muestras se les realizó una dilución 1:5, se tomaron 2.5 μL y se llevaron a 100 μL con agua Milli-Q, a éstas se les agregó 1 mL de la Solución “C”, se agitó vigorosamente y se dejó reposar 10 min. Transcurrido el tiempo se agregó 0.1 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N, se agitó vigorosamente y se dejó reposar 30 min. Posteriormente se determinó la absorbancia a 750 nm en un equipo TECAN.

2.6.4 Cálculos

La concentración original de proteína en el homogenado se obtuvo a partir de la cantidad calculada en la gráfica de calibración usando los parámetros de regresión lineal y corrigiendo por los factores de dilución aplicados durante el análisis. Los resultados se obtuvieron en mg/mL.

Tabla 2. Curva de calibración de albúmina.

Cantidad de proteína (µg)	Albúmina (1 mg/mL) (µL)	Agua Milli-Q (µL)	Solución "C" (mL)	Folin-Ciocalteu 1 N (µL)
0	0	100	1	100
2.5	2.5	97.5	1	100
5	5	95	1	100
10	10	90	1	100
25	25	75	1	100
50	50	50	1	100

2.7 Determinación de los niveles de proteína de LXR-α y PPAR-α

2.7.1 Principio

La técnica de Western blot se utiliza para separar e identificar proteínas. Se basa en la separación de una mezcla de proteínas en función del peso molecular mediante electroforesis (SDS-PAGE), en el cual una mezcla compleja de proteínas se separa en un campo eléctrico, en función del peso molecular de éstas. La identificación de las proteínas se realiza con anticuerpos específicos de la proteína de interés (Mahmood y Chang, 2010; Burnette, 1981).

2.7.2 Soluciones

- Solución amortiguadora patrón de RIPA. Preparar las siguientes soluciones patrón: NaCl 5 M: pesar 7.30 g y llevar a 25 mL con agua Milli-Q, Tris-HCl al 1 M a pH 8: pesar 6.05 g y llevar a 50 mL con agua Milli-Q, Desoxicolato de sodio al 10%: pesar 1 g y llevar a 10 mL con agua Milli-Q, SDS 10%: pesar 0.5 g en 5 mL de agua Milli-Q y NP-40 al 10%: pesar 0.5 g en 5 mL de agua Milli-Q.

Soluciones patrón para preparar el buffer de lisis RIPA a la siguiente concentración: NaCl, 150 mM; NP-40, 1%; desoxicolato de sodio, 0.5%; SDS, 0.1% y Tris-HCl 50 mM a pH 8.

- Inhibidor de proteasas: se disolvió 1 tableta de Complete® (Roche. CAT: 11697498001) en 2 mL de agua Mili-Q o en PBS 100 mM a pH 7.
- PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) inhibidor de proteasas 1 mM.
- Solución amortiguadora de carga 6x: Para 5 ml, 1.5 mL de glicerol, 2.8 mL de Buffer

concentrador, 600 μ L de EDTA- Na_2 200 mM, 0.5 g de SDS y 0.6 mg de azul de bromofenol.

- Solución de acrilamida/bis-acrilamida: 30 g de acrilamida, 0.8 g de *N,N*-metileno-bisacrilamida y 100 mL de agua Milli-Q. Mezclar y filtrar la solución con un filtro de 0.45 μ m y almacenar en refrigeración protegido de la luz.
- Buffer de corrida 10x. 30.2 g de Tris Base (MW 121.14), 10 g de SDS y 144 g de glicina. Disolver el Tris y la glicina y ajustar el pH a 8.3 con HCl agregar el SDS disolver y aforar a 1 L con agua Milli-Q. Almacenar en refrigeración.
- Solución amortiguadora de transferencia 10x. 30.2 g de Tris-Base y 144 g de glicina. Disolver el Tris-Base y la glicina en agua Milli-Q y ajustar el pH a 8.4. Esta solución se almacenó en refrigeración. Esta solución amortiguadora requiere 20% de metanol, se recomienda agregarlo al diluir para usar inmediatamente.
- Solución amortiguadora concentradora, pH 6.8: pesar 12.10 g de Tris-Base, 0.8 g de SDS y aforar a 200 mL con agua Milli-Q. El Tris-Base se disolvió y se le ajustó el pH a 6.8 con HCl, se agregó el SDS y se disolvió, luego la solución se filtró con un filtro de 0.47 μ m y se almacenó en refrigeración.
- Solución amortiguadora separadora, pH 8.7: se pesaron 36.33 g de Tris-Base y 0.8 g de SDS, se disolvieron y se llevaron a un volumen 200 mL de agua Milli-Q.
- Solución de lavado Tween-20 al 0.2%: tomar 1 mL de Tween-20 y se mezcló con 499 mL de PBS 1x.
- Solución bloqueadora al 5%: se pesaron 0.5 g de leche descremada en polvo y se disolvieron en 10 mL PBS 1x.
- Persulfato de amonio al 10%: se pesaron 100 mg y disolvieron en 1 mL de agua Milli-Q. La solución se almacenó en congelación protegido de la luz.
- Rojo de Ponceau S al 2%: se pesaron 0.2 g de Rojo de Ponceau S, se le agregaron 5 mL de ácido acético glacial y se llevó a un volumen de 100 mL con agua Milli-Q.
- Anticuerpo primario de LXR- α/β (H-7) (sc-377260, Santa Cruz Biotechnology, Inc.).
- Anticuerpo primario PPAR- α (H-98) (No. Cat. sc-9000, Santa Cruz Biotechnology, Inc.).
Anticuerpo primario GAPDH (6C5) (No. Cat. sc-32233, Santa Cruz Biotechnology, Inc.).
- Anticuerpo secundario: Goat anti-mouse IgG (H/L) HPR (No. Cat. 5178-2504, BIO-RAD).

2.7.3 Procedimiento

Se homogenizaron 50 mg de hígado con buffer de lisis y se traspasó la muestra a otro tubo evitando los lípidos de la superficie. Las proteínas totales del hígado se extrajeron con el buffer RIPA y los inhibidores de proteasas para cuantificar la cantidad de proteína presente en el homogenado. Posteriormente se colocaron 15 µg de proteína para su separación en geles de poliacrilamida al 12% durante 3 h a 70 volts. Enseguida, los geles fueron transferidos en una cámara húmeda a una membrana de nitrocelulosa a 300 mA por 90 min. Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en PBS por 1 h, y después las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios específicos para LXR-α (dil. 1:250) o PPAR-α (dil. 1:200) y GAPDH (dil. 1:1000) que fue usado como control de carga. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (1:15,000) durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, las membranas se revelaron utilizando un kit para la HRP (Immobilon Forte, Millipore cat. WBLUF0100). El análisis densitométrico de las bandas de las proteínas se hizo utilizando el software Image J (NIH, 2006).

2.8 Determinación del malondialdehído en el hígado

2.8.1 Principio

La oxidación de lípidos da lugar a una serie de productos secundarios, siendo estos principalmente aldehídos, con la capacidad de exacerbar el daño oxidante. El malondialdehído (MDA), es el principal y más estudiado producto de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados (Del Rio y col., 2005). Por lo que, un aumento de los radicales libres provoca una sobreproducción de MDA, el cual es conocido como un marcador del estrés oxidante (Gawel, 2004). El ensayo se basa en la técnica colorimétrica descrita por Esterbauer y col. (1991), que se fundamenta en la reacción colorida entre el *N*-metil-2-fenilindol (MPI) y el MDA a 45 °C, produciendo un complejo estable de carbocianina colorido que se determinó a una λ de 586-595 nm en un equipo TECAN.

2.8.2 Soluciones

- H₂SO₄ al 1%: se tomaron 1.013 mL de H₂SO₄ y se aforaron a 100 mL con agua Milli-Q.
- Solución patrón de MDA (1,1,3,3-Tetrametoxipropano; malondialdehído bis-(dimetilacetal)) 10 mM: se tomaron 12 µL de MDA y se agregaron en 10 ml de H₂SO₄ al

1% o aforar con PBS 1x. Esta solución es estable por un año conservada en refrigeración. Para su uso se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 2 horas.

- MPI (1-metil-2-fenilindol) 10 mM en acetonitrilo:metanol (3:1): se pesaron 0.02072 g de MPI y disolvieron en 20 mL de acetonitrilo:metanol (3:1), posteriormente se aforó a 100 mL con acetonitrilo:metanol (3:1).
- MDA 0.1 mM: se tomaron 50 μ L de la solución patrón de MDA 10 mM y aforar a 5 mL con PBS 1x. Esta solución se mantuvo en refrigeración.
- HCl concentrado (37%).

2.8.3 Procedimiento

En este ensayo se agregaron en un tubo Eppendorf ámbar los microlitros correspondientes de MDA de 0.1 mM y agua Milli-Q, basado en la curva de calibración (Tabla 3). Posteriormente se añadieron 185 μ L de MPI y HCl 37% en obscuridad y se agitó inmediatamente. Después los tubos se incubaron a 45 °C por 40 min, más tarde los tubos se centrifugaron a 10,000 rpm por 15 min. Posteriormente, se tomaron 200 μ L del sobrenadante, se agregaron en cada pozo de la microplaca y las lecturas de absorbancia se obtuvieron en un lector de UV-Vis a una λ de 586 nm.

Para las muestras, se agregaron 25 μ L de la muestra en cada tubo eppendorf, el MDA y H₂O correspondientes. Posteriormente se agregó el MPI y HCl en obscuridad, se agitó inmediatamente y se incubaron a 45 °C por 40 minutos en un baño de temperatura sólido. Pasado el tiempo se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 minutos, después se tomaron 200 μ L del sobrenadante y se colocaron en cada pozo de la microplaca y las lecturas de absorbancia se obtuvieron en lector de UV-Vis a una λ de 586 nm a 30°C.

2.8.4 Cálculos

De los datos obtenidos de la proteína, se multiplicaron por 0.025, representando el volumen de muestra que se utilizó para la determinación de MDA (25 μ L). Posteriormente los datos obtenidos de las absorbancias de MDA en mmoles, se multiplican por 1,000 para convertir los valores en μ moles. Estos valores de MDA en μ moles se dividen entre los valores de proteína. Los resultados se representan en μ moles/ μ g de proteína.

Tabla 3. Curva de calibración de MDA.

Curva de calibración					
Tubo	Concentración (mmoles de MDA)	MDA 0.1 mM (µL)	Agua	MPI	HCl 37%
1	0	0	55	185	40
2	0.0045	2.5	52.5	185	40
3	0.0090	5	50	185	40
4	0.0181	10	45	185	40
5	0.0360	20	35	185	40
6	0.0720	40	15	185	40
Muestra		25 µL de muestra	25	185	40

2.9 Determinación de los lípidos internos en el hígado

2.9.1 Principio

Uno de los colorantes más utilizados para teñir lípidos es el rojo oleoso (o-red oil), éste tiñe lípidos neutros y ésteres de colesterol. Al ser un tinte hidrofóbico se asocia con los lípidos dentro de las secciones de un tejido. Este método es muy preciso para detectar y determinar los lípidos hepáticos en cortes histológicos (Mehlem y col., 2013).

2.9.2 Soluciones

- Solución patrón de rojo oleoso al 1%: se disolvieron 1 g de rojo oleoso en 99 mL de alcohol isopropílico. Esta solución se filtró antes de su uso.
- Dextrina al 1%: se disolvió 1 g de dextrina en 99 mL de agua Milli-Q.
- Rojo oleoso al 60%: tomar 60 mL de la solución patrón de rojo oleoso al 1% y 40 mL de la dextrina al 1% y se mezcló. Esta solución se dejó reposar 24 h antes de su uso previa filtración.
- Alcohol isopropílico al 60%: se agregaron 40 mL de agua Milli-Q a 60 mL de alcohol isopropílico.
- Gelatina de glicerol: se disolvieron 10 g de gelatina en 60 mL de agua Milli-Q a 35 °C, luego se agregaron 70 mL de glicerol y 1 mL de fenol líquido al 90%. Esta solución es estable durante varios años a temperatura ambiente.

2.9.3 Procedimiento

Se montó el hígado congelado en una base cubierta de Tissue-Tek® (O.C.T. Compound, Sakura. No. Cat. 4583) y se colocó dentro del criostato preajustado a -30 °C al menos 30 min previos al corte. Posteriormente, se realizaron cortes de 8 µm y se colocaron en laminillas tratadas previamente con alcohol ácido. Las laminillas se conservaron en congelación hasta su tratamiento. Previo a la tinción con rojo oleoso al 60%, las laminillas fueron hidratadas con agua Milli-Q por 1 min. Después fueron sumergidas con isopropanol al 60% por 1 min. Posteriormente se tiñó con rojo oleoso a temperatura ambiente y se incubó por 5 min a 27 °C. Luego, el rojo oleoso se retiró y se enjuagó con agua Milli-Q. En seguida, las muestras se tiñeron con hematoxilina por 5-10 segundos y se enjuagó con agua corriente. Se colocó la gelatina de glicerol para sellar con un cubre-objetos, posteriormente las laminillas se analizaron en el microscopio óptico con los objetivos 10x y 40x.

2.10 Determinación de la concentración de GSH y GSSG, y la tasa GSH/GSSG en el hígado

2.10.1 Principio

La determinación de GSH y GSSG consiste en la reacción específica con el fluoruro de O-ftaraldehido (OPT) a diferente pH, el GSH reacciona a pH 8 con el OPT mientras que el GSSG lo hace a pH 12, resultando en la formación de un producto fluorescente que se determina por fluorescencia a una λ de emisión a 420 nm usando una λ de excitación de 350 nm (Hissin y Hilf, 1976; Browne y Armstrong, 1998).

2.10.2 Soluciones

- Solución amortiguadora de FEDTA pH 8: EDTA 0.005 M, se pesaron 1.8612 g de EDTA dibásico y fosfato monobásico de sodio 0.1 M: se pesaron 11.99 g de fosfato monobásico, se ajustó el pH y se llevó a un volumen final de 1 L con agua Milli-Q.
- NaOH 0.1 N: se pesaron 4 g de NaOH y llevó a un volumen final de 1 L con agua Milli-Q.
- Ácido metafosfórico al 25%: se pesaron 71.43 g de ácido metafosfórico y se llevaron a un volumen final de 100 mL con agua Milli-Q.
- *N*-Etilmaleimida 0.04 M: se pesaron 0.5 g de *N*-etilmaleimida y se llevaron a un volumen final de 100 mL con agua Milli-Q.

- O-ftaraldehido: se pesó 1 mg de O-ftaraldehido y se disolvió en 1 mL en metanol grado HPLC.
- GSH 20 µg/mL: se pesó 1 mg de GSH y se disolvió en 1 mL de solución de FEDTA. Se tomaron 20 µL y llevarlo a 1 mL con FEDTA.
- GSSG 20 µg/mL: se pesó 1 mg de GSSG en y se diluyó a 1 mL de NaOH 0.1 N, de esta solución se tomaron 20 µL y llevaron a 1 mL con NaOH 0.1 N.

2.10.3 Procedimiento

Se pesaron 50 mg de hígado y se le agregaron 750 µL de solución de FEDTA y 200 µL de ácido metafosfórico al 25%. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 30 min. Para la determinación de GSH se colocaron 100 µL del sobrenadante a 4 °C con 4.9 mL de FEDTA. De esta solución patrón se tomaron 100 µL y se colocaron en tubo nuevo con 1.8 mL de FEDTA y 100 µL de OPT. Se mezcló y se dejó reposar 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se midió la emisión 450 nm usando una λ de excitación de 350 nm.

Para la determinación de GSSG se colocaron 500 µL del sobrenadante del homogenado con 200 µL de NEM 0.04 M. Se agitó y dejó reposar por 30 min a temperatura ambiente. Después se agregaron 4.3 mL de NaOH 0.1 N y se mezcló. Posteriormente se tomaron 100 µL y se colocaron en tubo nuevo con 1.8 mL de NaOH y 100 µL de OPT. Se mezcló y se dejó reposar por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se midió la emisión a una λ de 450 nm usando una λ de excitación de 350 nm.

2.11 Determinación de CYP total

2.11.1 Principio

En esta determinación se utiliza el hecho de que cuando el hierro de la hemoproteína se reduce con ditionita de sodio y se acompleja con CO, se obtiene un espectro de absorción característico con máximo de absorción a 450 nm (Omura y Sato, 1964). Este máximo de absorbancia se conoce como pico de Soret y no aparece en la forma oxidada del CYP. El grupo tiol de un residuo de cisteína ligado al átomo de hierro es el responsable de este pico de Soret en los CYP.

2.11.2 Soluciones

- Solución amortiguadora de Tris-HCl 66 mM y glicerol 20%, pH 7.4: 5.2 g de Tris-HCl y 100 mL de glicerol se disolvieron y mezclaron en 350 mL de agua Milli-Q, se ajustó el pH a 7.4 y se aforó a 500 mL con agua Milli-Q. Esta solución se conservó en refrigeración

2.11.3 Procedimiento

Los microsomas se diluyeron 1:10 con solución amortiguadora de Tris-HCl 66 mM y glicerol 20%, pH 7.4 (concentración final de proteína diluida 1-2 mg/mL), se le agregó una pizca de ditionita de sodio y se agitó ligeramente por inversión. La suspensión se repartió en dos celdas (blanco y problema) y se corrigió el fondo en un rango de 500 a 400 nm, posteriormente, la celda problema se burbujeó durante 30 segundos con CO e inmediatamente se hizo el barrido de 500 a 400 nm. Se registraron las absorbancias a 450 y 490 nm. El análisis se realizó en un espectrofotómetro de doble haz (Perkin Elmer Lambda 2S).

2.11.4 Cálculos

La concentración de CYP total (nmoles/mg de proteína) se calculó con base en la absorbancia a 450 nm, la cual se corrigió restándole la absorbancia observada a 490 nm, se multiplicó por 1000 y se dividió entre el coeficiente de extinción molar ($91 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). El valor obtenido (nmoles/ml de muestra diluida) se multiplicó por el factor de dilución y se dividió entre el contenido de proteína.

2.12 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron con una prueba de Normalidad de Shapiro–Wilk y al contar con una distribución normal los datos se analizaron por ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Holm-Sidack. Los resultados representan la media \pm DE (n=6). Estableciendo una diferencia significativa con una $p < 0.05$, respecto al grupo control. El análisis estadístico se hizo con los programas GraphPad Prism versión 8.0.1 y SigmaPlot versión 14.

3. RESULTADOS

3.1 Peso relativo del hígado

La exposición a temefos a las dosis de 1, 10 ó 100 mg/kg/d por 5 días no afectó el peso relativo del hígado (Tabla 4). El temefos demostró no afectar el peso relativo del hígado a ninguna de las dosis evaluadas, sugiriendo que este plaguicida no influye en la disminución del peso del hígado, incluso a la dosis más alta de 100 mg/kg/d.

Tabla 4. Peso relativo del hígado de ratas Wistar macho adultas tratadas con temefos.

Dosis de temefos (mg/kg/d por 5 d)	Peso relativo del hígado (%)
0	3.6 ± 0.5
1	3.9 ± 0.4
10	3.6 ± 0.5
100	3.9 ± 0.2

Los animales fueron expuestos al temefos a las dosis de 1, 10 ó 100 mg/kg/d por 5 días.

*Los resultados representan la media ± D.E. (n=6).

3.2 Actividades enzimáticas en el suero

Las enzimas ALT y AST son consideradas como marcadores de daño tisular severo, principalmente por necrosis. Su presencia en la sangre es debido a que son enzimas citosólicas y si ocurre un daño severo como la muerte del hepatocito, el contenido intracelular es liberado al torrente sanguíneo, lo que incrementa su actividad enzimática en este medio. La exposición a la dosis más alta de temefos (100 mg/kg/d) provocó un aumento significativo en las dos enzimas (Figura 4), respecto al grupo control que solo recibió solución salina.

Las enzimas FAL y GGT han sido también consideradas como marcadores de daño hepático. Estas enzimas se encuentran en la membrana del hepatocito y también son liberadas hacia el torrente sanguíneo incrementando sus niveles en suero cuando los hepatocitos u otras células sufre un daño severo. Sin embargo, ni la FAL ni la GGT se vieron afectadas por la exposición a temefos a ninguna de las dosis evaluadas (Figura 4). Por otro lado, la LDH es

una enzima que se encuentra en casi todos los tejidos incluido el hígado, ésta se libera al torrente sanguíneo cuando hay un daño en las células. Esta enzima es una oxidorreductasa que cataliza la reacción donde el piruvato es reducido a lactato por la oxidación de NADH a NAD⁺. Los resultados mostraron que la dosis de 100 mg/kg/d de temefos aumentó significativamente la actividad de esta enzima en comparación al grupo no expuesto (Figura 4).

3.3 Efecto del temefos sobre la concentración de lipídico en suero y en el hígado

Los triglicéridos y el colesterol son diferentes tipos de lípidos que circulan en la sangre y desempeñan funciones importantes en el organismo. Los triglicéridos son la forma más común de grasa, son una fuente de energía para el organismo y se almacenan en el tejido adiposo. Mientras que, el colesterol es esencial para la formación de membranas celulares, la producción de hormonas, la síntesis de vitamina D y la producción de bilis para la digestión de las grasas. La concentración los diferentes tipos de lípidos se evaluó en el suero y se observó un aumento en los lípidos totales a las dosis de 10 y 100 mg/kg/d, en los triglicéridos a la dosis de 10 mg/kg/d y en el colesterol a la dosis de 100 mg/kg/d (Figura 5). Esto sugiere una posible alteración en el balance lipídico.

El colesterol se clasifica en dos tipos principales: el colesterol de LDL y el colesterol de HDL. Las LDL transportan el colesterol desde el hígado hacia las células del cuerpo. Si hay un exceso de LDL en la sangre puede acumularse en las paredes de las arterias y formar depósitos llamados placas. Estas placas pueden obstruir las arterias y aumentar el riesgo de enfermedades cardiovasculares. Por otro lado, las HDL ayudan a eliminar el exceso de colesterol de las células y las arterias y lo transportan de vuelta al hígado para su eliminación. La relación LDL/HDL es una medida importante para evaluar el riesgo de enfermedades cardiovasculares. En este estudio las VLDL no se vieron afectadas a ninguna de las dosis de temefos, sin embargo, sobresale un incremento de las LDL a las dosis de 10 y 100 mg/kg/d, siendo 4 veces mayor a la dosis más alta comparado con el grupo control (Figura 6). Por otro lado, las HDL se incrementaron también a la dosis de 100 mg/kg/d. Del mismo modo, la exposición a las tres dosis de temefos provocó una acumulación significativa en comparación con el grupo no expuesto. Todo el conjunto de resultados sugiere que el temefos está afectando el balance lipídico en la sangre, así como la secreción de los lípidos del hígado al torrente sanguíneo como se puede apreciar en la Figura 7.

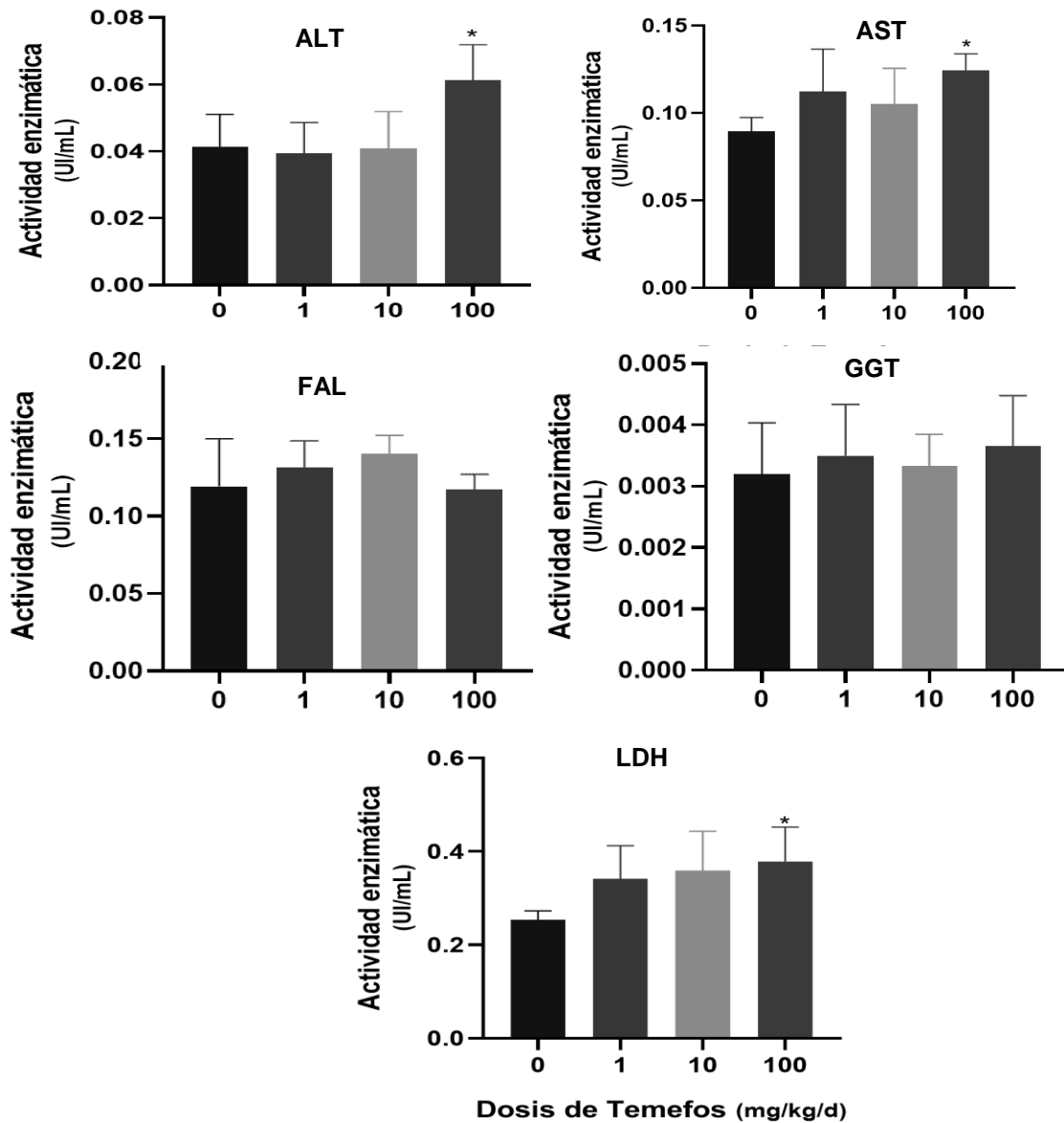


Figura 4. Efecto del temefos sobre las actividades enzimática en suero de la ALT, AST, FAL, GGT Y LDH (U/mL). Los animales fueron expuestos al temefos a las dosis de 1, 10 ó 100 mg/kg/d por 5 días. Los resultados representan la media \pm D.E. (n=6). *Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), respecto al grupo control. ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Holm-Sidack.

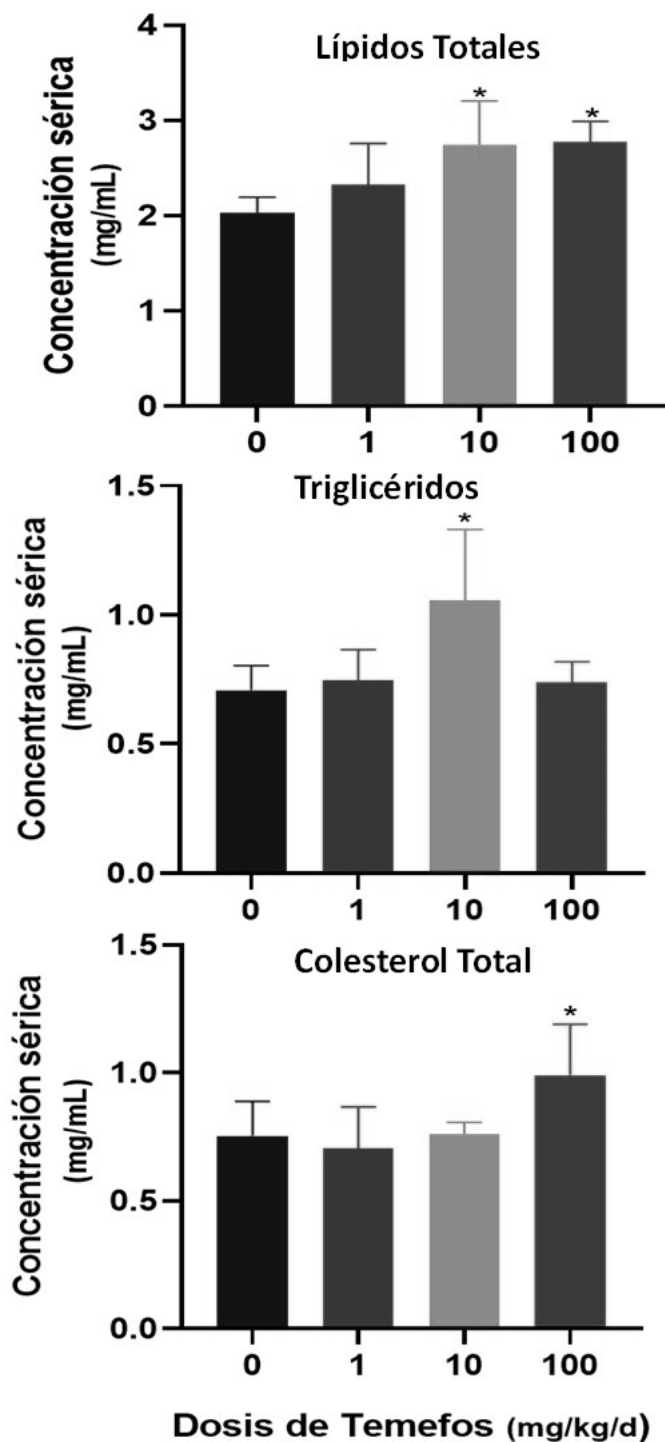


Figura 5. Efecto del temefos sobre la concentración de diferentes tipos de lípidos en el suero de ratas macho adultas. Los animales fueron expuestos al temefos a las dosis de 1, 10 ó 100 mg/kg/d por 5 días. Los resultados representan la media \pm D.E. (n=6). *Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), respecto al grupo control. ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Holm-Sidak.

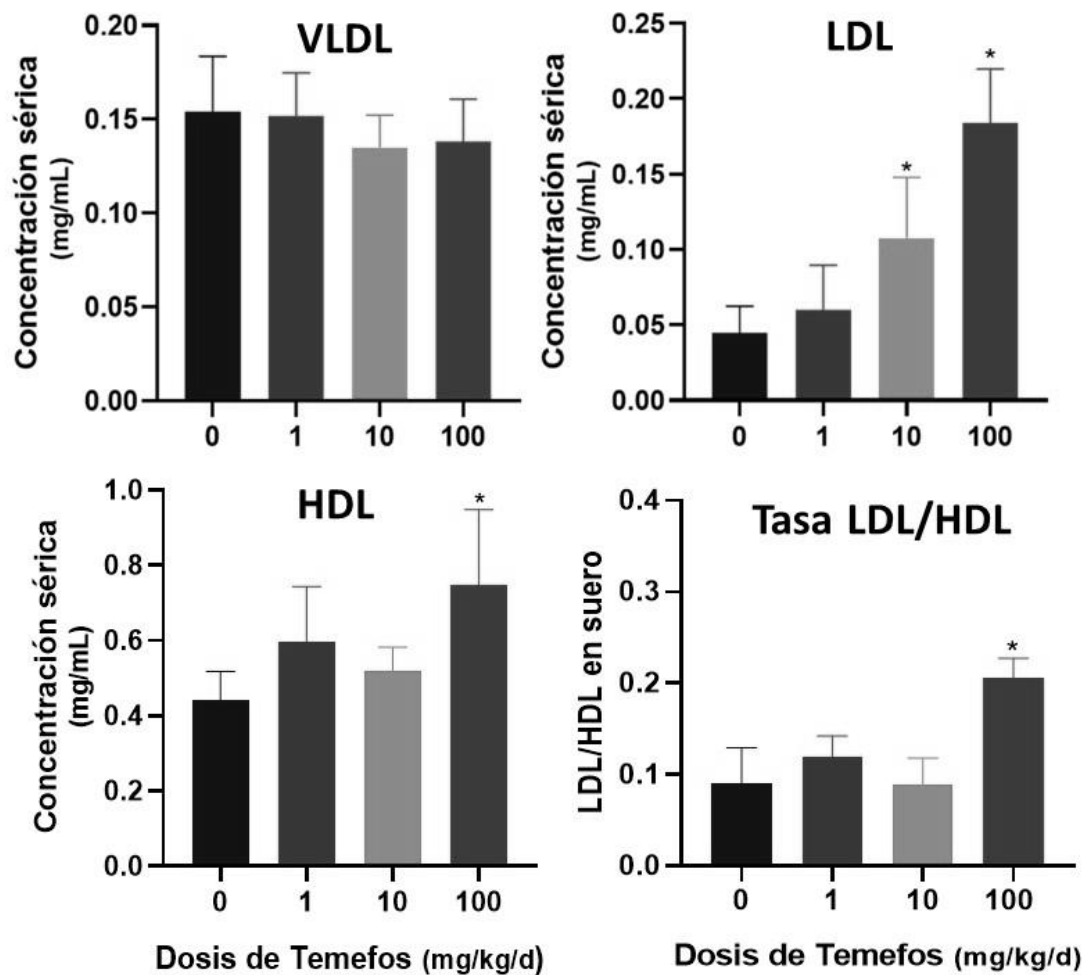


Figura 6. Efecto del temefos sobre la concentración de las diferentes lipoproteínas VLDL, LDL, HDL (mg/mL) en el suero de ratas macho adultas. Los animales fueron expuestos al temefos a las dosis de 1, 10 ó 100 mg/kg/d por 5 días. Los resultados representan la media \pm D.E. (n=6). *Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), respecto al grupo control. ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Holm-Sidac.

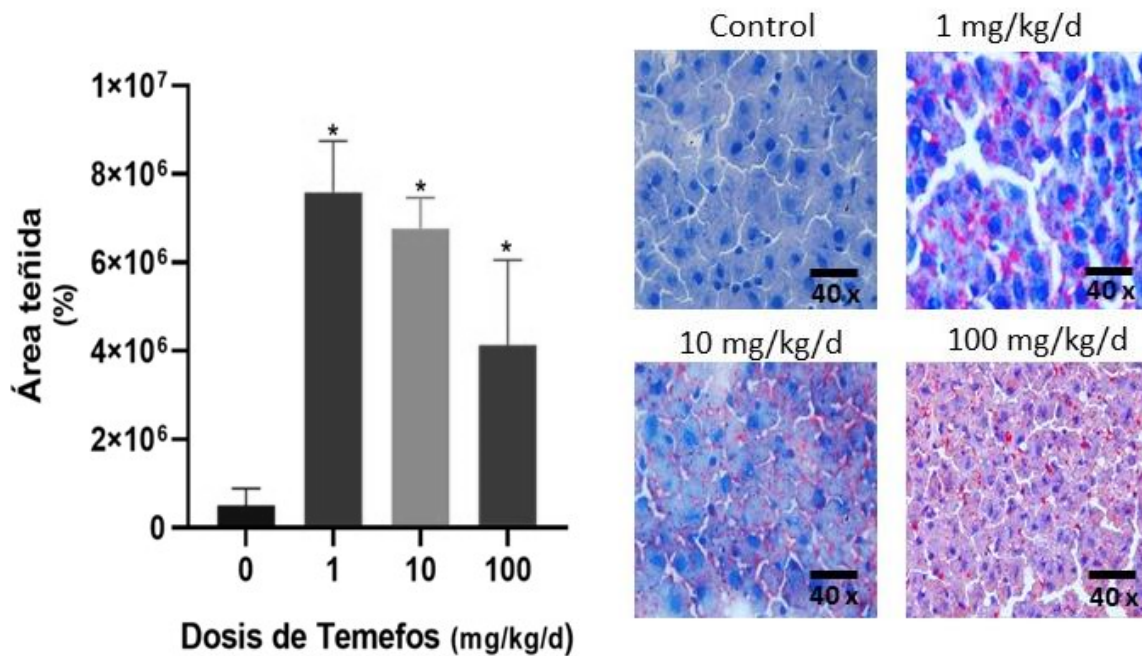


Figura 7. Efecto del temefos sobre la acumulación de lípidos en el hígado. Los animales fueron expuestos al temefos a las dosis de 1, 10 ó 100 mg/kg/d por 5 días. Los resultados representan la media \pm D.E. (n=6). *Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), respecto al grupo control. ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Holm-Sidack.

3.4 Efecto del temefos sobre la expresión de LXR- α y PPAR- α

El LXR- α es un receptor que tiene un papel crucial en la regulación del metabolismo de los lípidos y el colesterol en el cuerpo, promueve la descomposición de los ácidos grasos. la β -oxidación y la descomposición de las lipoproteínas ricas en triglicéridos. El tratamiento de los animales con temefos provocó una disminución del PPAR- α , sin embargo, solo fue significativa a la dosis de 100 mg/kg/d, lo que sugiere una posible inhibición del receptor del PPAR- α , lo que provocaría una alteración de las funciones que dependen de él. En el caso del LXR- α , también se observó una disminución, pero no mostró significancia estadística a ninguna de las dosis (Figura 8).

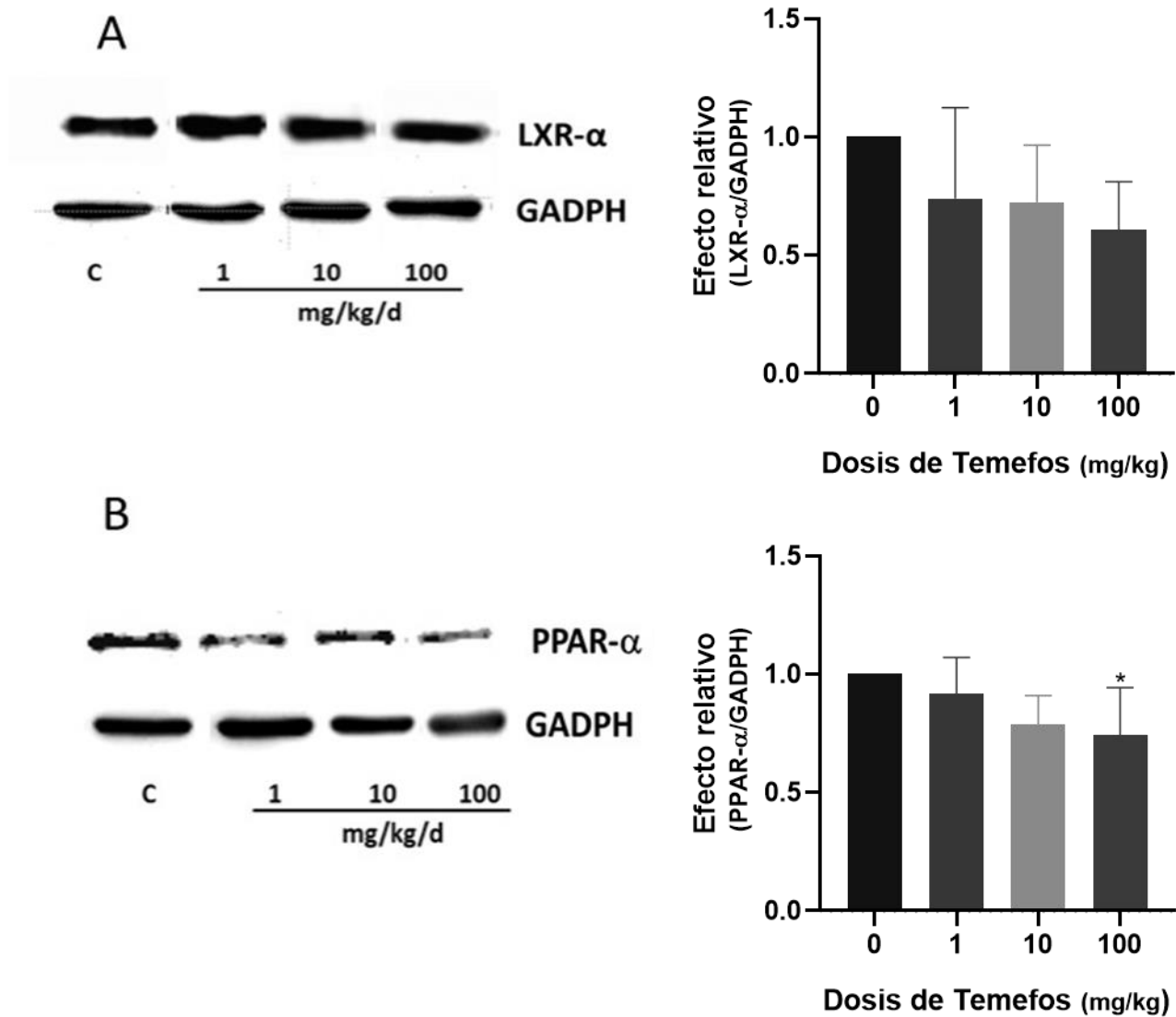


Figura 8. Efecto del temefos sobre el contenido relativo de las proteínas de los receptores LXR- α y PPAR- α en el hígado de ratas macho adultas. Los animales fueron expuestos al temefos a las dosis de 1, 10 ó 100 mg/kg/d por 5 días. Los resultados representan la media \pm D.E. (n=6). *Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), respecto al grupo control. ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Holm-Sidack.

3.5 Balance óxido-reducción en el hígado

De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis del GSH y GSSG, la concentración hepática de éstos no se vio afectada por la exposición al temefos a ninguna de las dosis evaluadas. Sin embargo, la tasa GSH/GSSG si se vio afectada, ya que disminuyó significativamente a las dosis de 1 y 100 mg/kg/d en comparación al grupo control (Figura 9).

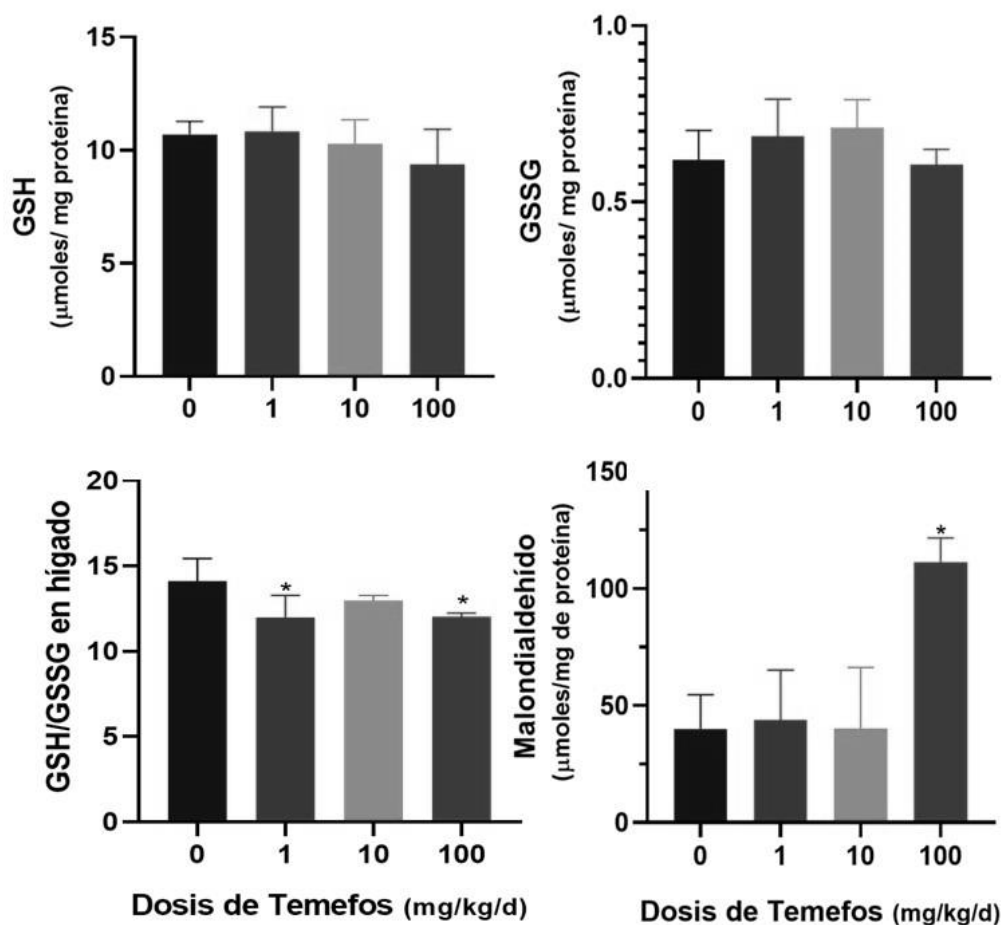


Figura 9. Efecto del temefos sobre el balance óxido-reducción hepático de ratas macho adultas tratadas con temefos. Los animales fueron expuestos al temefos a las dosis de 1, 10 ó 100 mg/kg/d por 5 días. Los resultados representan la media ± D.E. (n=6). *Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Holm-Sidak.

3.6 Efecto del temefos sobre las bilirrubinas séricas

La exposición a temefos durante 5 d no alteró las concentraciones séricas de la bilirrubina indirecta o directa, pero si provocó un aumento significativo de la bilirrubina total a la dosis de 100 mg/kg/d (Figura 10). Este resultado nos sugiere que la exposición durante 5 d a la dosis más usada en este estudio altera el metabolismo de compuestos endógenos, como en este caso las bilirrubinas.

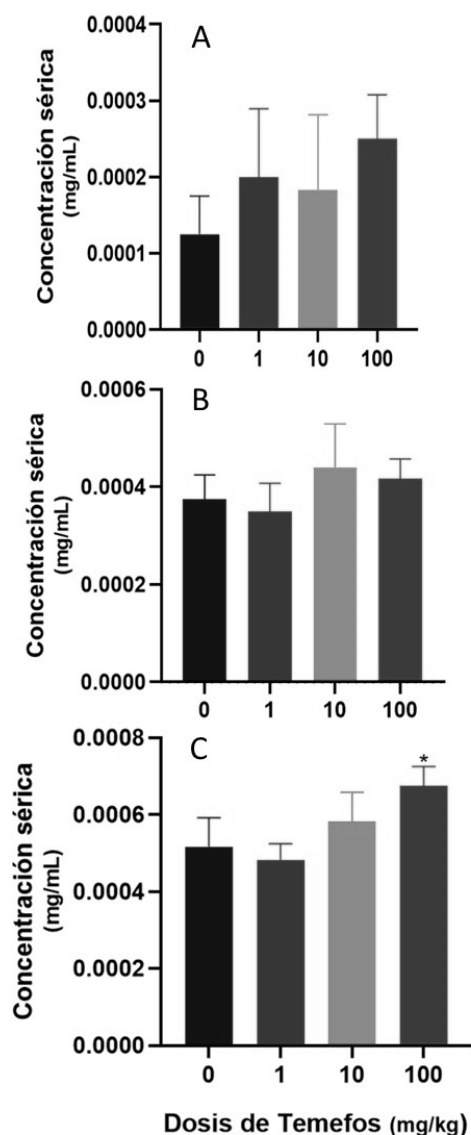


Figura 10. Efecto del temefos sobre la concentración de las bilirrubinas en el suero de ratas macho adultas. A, bilirrubina indirecta; B) bilirrubina directa; y C) bilirrubina total. Los animales fueron expuestos al temefos a las dosis de 1, 10 ó 100 mg/kg/d por 5 días. Los resultados representan la media \pm D.E. (n=6). *Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), respecto al grupo control. ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Holm-Sidack.

3.7 Efecto del temefos sobre el contenido de CYP total

Los CYP son una superfamilia de hemo-tiol proteínas presentes en todos los seres vivos (Lin y Lu, 1998). Estos son las principales enzimas encargadas del metabolismo de esteroides, ácidos biliares y grasos y vitaminas (Bernhardt, 2006), así como de la biotransformación de xenobióticos, entre los que se incluyen fármacos y contaminantes ambientales. Más del 90% de todo el metabolismo de los xenobióticos en el hombre está mediado por el CYP (Pelkonen, 2004). La exposición a temefos disminuyó las concentraciones del CYP total a las tres dosis

evaluadas (Figura 11). Esto sugiere que el temefos puede estar inhibiendo su actividad o reprimiendo su expresión.

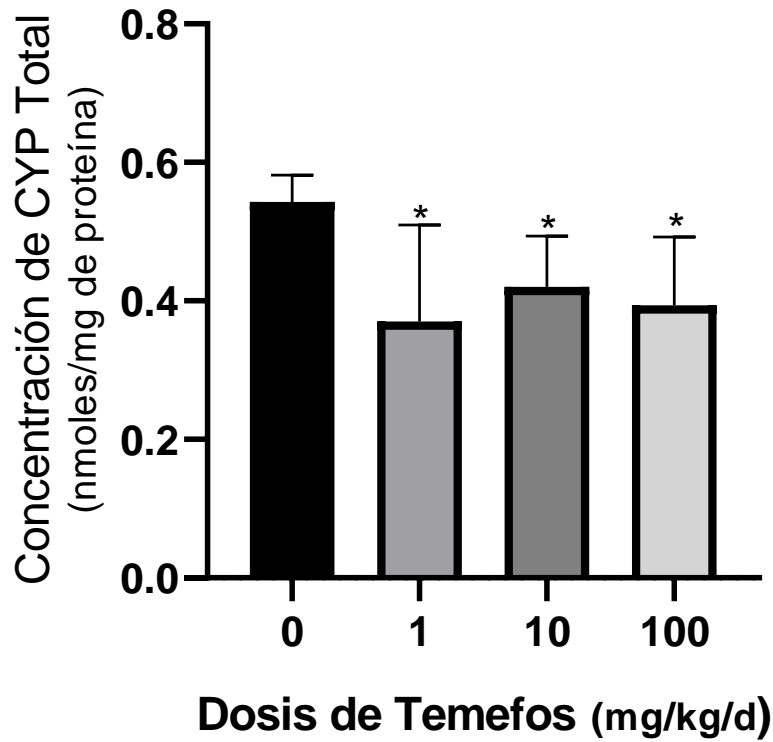


Figura 11. Efecto del temefos sobre la concentración del CYP total. Los animales fueron expuestos al temefos a las dosis de 1, 10 ó 100 mg/kg/d por 5 días. Los resultados representan la media \pm D.E. (n=6). *Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), respecto al grupo control. ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Holm-Sidack.

4. DISCUSIÓN

Los OF se consideran compuestos altamente tóxicos y se utilizan ampliamente en la agricultura, la ganadería, el sector salud y el hogar. Todos ellos comparten un mecanismo de acción común que es la fosforilación de la AChE, lo que origina la inhibición de su actividad enzimática debido a la unión covalente con el grupo $-OH$ de la serina en el sitio activo de la enzima, evitando que el neurotransmisor ACh interactúe con la enzima generando una sobreestimulación por una acumulación del mismo en las sinapsis (FAO, 1986; EPA, 2014). El temefos es un larvicida OF, utilizado para el control de algunos vectores transmisores de enfermedades como el dengue, Zika y chikungunya (OMS, 2006). De acuerdo con la recomendación por parte de la OMS, en nuestro país se emplea desde hace aproximadamente 5 décadas, durante las campañas de aplicación, cuando el temefos es añadido en los depósitos de agua a concentraciones menores a 1 mg/L (CENAPRECE, 2022; OMS, 2006). El temefos también suele ser aplicado en forma de aerosol en combinación con otros plaguicidas OF y piretroides (Rose, 2001). Por otra parte, el temefos es un compuesto inestable que se oxida fácilmente en el ambiente debido a la luz solar, la humedad y el oxígeno del aire (Lacorte y col., 1997). Cuando se agrega al agua clorada, principal forma de potabilización del agua en nuestro país, se generan algunos derivados oxidados del temefos, todo esto aumenta el riesgo de exposición de la población en general al temefos y sus derivados oxidados.

A pesar del uso tan intensivo del temefos en México y varios países tropicales, tales como Cuba, Indonesia, Guatemala, el Salvador, entre otros, la información toxicológica es todavía limitada y tampoco se ha evaluado la magnitud de la exposición en los seres humanos a este larvicida, lo que puede ser debido a la falta de un marcador de exposición. En los pocos estudios que existen hasta la fecha, se ha demostrado que la exposición al temefos inhibe la actividad de la AChE en la rata y otras especies (Blinn, 1969; Ferguson y col., 1985; Kim y col., 2020; Mirón-Vani y col., 2018; Ramos-Flores y coll., 2021; Verdín-Betancourt y col., 2019), pero también produce efectos tóxicos en los sistemas nervioso y reproductivo, es genotóxico y produce alteraciones conductuales (Benitez-Trinidad y col., 2015; Kim y col., 2020; Mirón-Vani y col., 2018; Ramos-Flores y col., 2021; Verdín-Betancourt y col., 2019). El hígado también es un órgano blanco del temefos, sin embargo, hasta la fecha hay muy pocos reportes sobre los efectos en este órgano.

4.1 Efecto del temefos en el peso corporal y relativo del hígado

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, la exposición de ratas macho adultas a las dosis de 1, 10 ó 100 mg/kg/d por 5 días no afectó el peso relativo del hígado (Tabla 4). Estos resultados difieren con lo observado en el estudio preliminar realizado por Hernández-Esteris y col. (2020), quienes observaron una disminución del peso relativo del órgano del 12% en los animales tratados a la dosis de 100 mg/kg/d por 7 días, además, también provocó la muerte del 41% de los animales tratados y con los reportados por Ramos-Flores y col. (2021), donde se observó una disminución del 11% en el peso relativo del hígado después de 5 días de exposición. Con la información disponible hasta el momento, no es fácil explicar esta diferencia debido a que los animales se mantuvieron en las mismas condiciones experimentales y tienen el mismo origen.

El peso relativo de un órgano es un parámetro grueso de toxicidad, cuando éste se altera en corto tiempo de exposición indica que hay un daño severo. La falta de afectación del peso relativo del hígado sugiere que la exposición repetida a temefos por 5 días a las dosis probadas no provoca daño al órgano (aunque anteriormente si se haya observado) y mantendría activos los mecanismos compensatorios y de destoxificación para contrarrestar los efectos tóxicos del temefos y sus metabolitos, incluyendo la activación de vías de reparación y proliferación celular para mantener el peso del hígado dentro de rangos normales (Cienfuegos y col., 2014).

4.2 Efecto del temefos sobre actividades enzimáticas

Continuando con la evaluación toxicológica sobre el hígado, el siguiente nivel evaluado fue la determinación de la actividad de algunas enzimas hepáticas en el suero de las ratas expuestas. La exposición a temefos a la dosis de 100 mg/kg/d por 5 días aumentó de manera significativa la actividad de las AST y ALT (Figura 3), lo que nos indica que, a esta dosis, del plaguicida está provocando un daño tisular severo en el órgano ocasionando la liberación de estas enzimas al torrente sanguíneo e incrementando sus niveles en suero. De estas dos enzimas, la ALT ha mostrado una mejor correlación con el daño hepático y se considera un marcador específico. La enzima ALT se localiza en el citosol del hepatocito y se libera en el espacio extracelular hacia la sangre e indicando una lesión hepática por un daño sobre la membrana celular de los hepatocitos (necrosis) (Perigard, 2003). Por otra parte, la ASAT se

localiza en la mitocondria y en el citosol de las células de otros órganos, además, del hepatocito. Cuando ambas se elevan en el suero se considera que hay un daño necroinflamatorio (Ozer y col., 2008; Yang y col., 2014).

Otras enzimas también consideradas en este estudio para evaluar el daño hepático fueron la FAL y la GGT. En los resultados obtenidos, tanto la actividad de la FAL como de la GGT (Figura 3), no se afectaron a ninguna de las dosis de temefos probadas, indicando que el plaguicida no alteró su actividad. La enzima FAL se encuentra en la membrana de los hepatocitos y otros órganos y tejidos como huesos, placenta, intestinos y riñones. La liberación de la FAL puede ocurrir por diferentes razones que no están relacionadas con el daño hepático, por esta razón, la FAL no debe considerarse como un marcador específico de lesión hepática. Ésta es considerada como parcialmente predictiva del daño hepático cuando se usa junto con otros biomarcadores. La GGT es una enzima ubicada en la superficie de las membranas plasmáticas de los hepatocitos y los niveles de GGT suelen estar elevados en casos de enfermedad hepática. Por lo que, los niveles de GGT pueden ser útiles para detectar y monitorear el daño hepático (Yang y col., 2014). Aunque la GGT como la FAL pueden estar elevadas en casos de daño hepático, cada una tiene sus propias características y niveles de elevación. La GGT es más específica para evaluar la función hepática, mientras que la FAL puede estar elevada debido a condiciones óseas y otros factores no hepáticos (Yang y col., 2014).

Por otra parte, la actividad sérica de la LDH (Figura 3), se incrementó desde la dosis más baja de temefos (1 mg/kg/d), aunque a la dosis de 10 mg/kg/d no hubo aumento significativo. La LDH es una enzima que cataliza la conversión reversible del piruvato a lactato con la oxidación/reducción concomitante de NADH a NAD⁺. Este efecto estaría indicando que el temefos altera el balance del NADH, el cual es indispensable en varias rutas metabólicas de una gran variedad de células. Esta enzima se encuentra presente en el corazón, el hígado, los riñones, los pulmones y el músculo esquelético, y se libera al torrente sanguíneo cuando hay un daño o lesión en las células y tejidos (Forkasiewicz y col., 2020). Por estas razones también se considera un biomarcador de daño hepático. Los resultados del presente estudio no concuerdan con lo reportado por Ennin y Franklin (1979), quienes no reportaron algún efecto significativo sobre las actividades de ALT, AST, LDH y FAL a las dosis de 10-300 mg/kg/d *ip* por 7 y 10 días. Una posible, pero remota explicación, es que estos autores administraron el temefos disuelto en aceite de ajonjolí, lo cual podría modificar la toxicocinética del temefos. Sin

embargo, Verdín-Betancourt y col. (2021) no encontraron diferencias en los parámetros toxicocinéticos cuando el temefos se administró en emulsión con solución fisiológica, que fue la forma de cómo se administró en este estudio. Por su parte, Singh y col. (2011) reportaron un aumento en las actividades séricas de la ALT, AST y FAL en trabajadores expuestos a OF, incluyendo al temefos. Sin embargo, al ser una exposición a una mezcla de diferentes OF y no contar con un marcador de exposición al temefos, este estudio no puede ser comparable con nuestros resultados.

4.3 Alteración de lípidos séricos

Los resultados del perfil lipídico en suero (Figura 4), indican un aumento significativo de los lípidos totales a las dosis de 10 y 100 mg/kg/d, los triglicéridos aumentaron solamente a la dosis de 10 mg/kg/d y el colesterol a la dosis de 100 mg/kg/d. Los lípidos son componentes esenciales de todas las células y desempeñan funciones importantes que incluyen la estabilización y señalización celular. Además, el hígado es el órgano más importante en su metabolismo. El colesterol, es uno de los reguladores más importantes de la organización de los lípidos en el núcleo y las mitocondrias, esto es esencial para regular los procesos fisiológicos como la respiración mitocondrial, la regulación de la apoptosis, la proliferación celular y los procesos transcripcionales (Santos y Preta, 2018). Otros tipos de lípidos, son los triglicéridos. Estos están compuestos por tres ácidos grasos unidos a una molécula de glicerol, tienen diferentes funciones cruciales en las células, como componente de las membranas celulares, transporte de lípidos, almacenamiento de energía, aislamiento térmico y protección. También son considerados un factor importante de riesgo de eventos cardiovasculares (De Carvalho y Caramujo, 2018).

El temefos produjo un aumento en las LDL a las dosis de 10 y 100 mg/kg/d (Figura 5). Resaltando que, a la dosis más elevada, las concentraciones se incrementaron 4 veces más que el grupo control, lo cual llama la atención debido a que un aumento en los niveles séricos de triglicéridos se asocia con la formación de las LDL, que se considera altamente aterogénico. Por otro lado, la concentración de HDL aumentó a la dosis de 100 mg/kg/d. Con estos resultados se determinó la relación LDL/HDL, la cual se considera de una mayor especificidad y sensibilidad que el indicador único, ya sea de las LDL o HDL, debido a que en ensayos clínicos permite identificar a pacientes con aterosclerosis o individuos con alto riesgo (Ting y col., 2022). Con base en estos antecedentes, es posible proponer que el temefos a la dosis de

100 mg/kg/d por 5 días es capaz de inducir un estado aterosclerótico afectando el balance de lípidos en el suero de rata. Sin embargo, es importante señalar que estos resultados están en desacuerdo con las observaciones preliminares de Hernández-Esteris y col. (2020), quienes determinaron que en ratas expuestas a una dosis de 100 mg/kg/d por 5 días se redujeron los triglicéridos, las LDL y los lípidos totales. Esta discrepancia podría ser debido a variaciones en el método analítico usado en cada determinación, lo que sugiere la necesidad de implementar un método analítico más preciso para estas determinaciones, ya que como se mencionó anteriormente los animales son del mismo origen y mantenidos en las mismas condiciones experimentales.

Después de haber observado una alteración en el balance lipídico en suero, se procedió a evaluar si en el hígado se produce un efecto sobre el contenido lipídico. El análisis con la técnica del rojo oleoso (Figura 6) permitió determinar que a las tres dosis de temefos usadas se produjo una acumulación de los lípidos en el órgano. Estos resultados indican que el temefos tiene una gran capacidad para afectar el balance lipídico en el hígado, ya sea por un aumento en la síntesis o una disminución en la secreción de ellos al torrente sanguíneo a dosis mínimas de este plaguicida, en este caso 1 mg/kg/d. Estos resultados están en acuerdo con las observaciones de Ba-Omar y col. (2013), quienes reportaron cambios en el tejido hepático, aberraciones, agrandamiento de las gotas de lípidos, vacuolización citoplasmática, picnosis de los núcleos y necrosis focal en peces *Aphanius dispar* expuestos a una concentración de temefos a partir de la concentración de 5 ppm en el agua. La acumulación lipídica en el órgano puede ser debido a un daño del temefos sobre los transportadores (*ABCA1* y *ABCG1*) involucrados en la secreción al torrente sanguíneo. La expresión génica de estos transportadores es regulada por la activación del LXR, el cual aunque no fue afectado de manera significativa si muestra una tendencia a una menor cantidad relativa de la proteína, pero también es posible suponer un posible efecto directo del temefos o de sus metabolitos sobre su funcionalidad debido a una posible fosforilación, la cual es necesaria para su activación (Pengfei y col., 2018; Xu y col., 2018). Esta propuesta sugiere la necesidad de llevar a cabo estudios para determinar la funcionalidad de los transportadores involucrados en la captación y excreción de lípidos.

4.4 Efecto del temefos en los RN LXR- α y PPAR- α

La interacción entre el PPAR- α y el LXR- α impacta en la homeostasis del colesterol,

controlando su salida y entrada (Pengfei y col., 2018). La activación de LXR- α aumenta la expresión de *ABCA1* y *ABCG1* y acelera el transporte inverso del colesterol y después se depositan en el hígado. Con base en estos antecedentes, se evaluaron los niveles proteicos de los receptores PPAR- α y LXR- α en el hígado (Figura 7), con el fin de determinar si la acumulación de lípidos y sus niveles aumentados en suero, y conocer si existe una relación con la activación de estos receptores. Los resultados obtenidos indican que los niveles de la proteína del PPAR- α disminuyeron significativamente a la dosis de 100 mg/kg/d, mientras que, los niveles del LXR- α no se vieron afectados significativamente a ninguna de las dosis. Este resultado indica que el temefos desregula el receptor PPAR- α afectando las funciones reguladas por este receptor.

Hasta el momento no existe información disponible sobre los efectos que se pueden generar a partir de la interacción del temefos con el PPAR- α . La activación de este receptor por ligandos naturales conduce a un aumento en la expresión de genes implicados en la oxidación de ácidos grasos, el transporte de lípidos y el metabolismo de las lipoproteínas. Esto, a su vez, mejora la descomposición de los ácidos grasos en el hígado y las células musculares y aumenta la eliminación de triglicéridos de la sangre, lo que resulta en una disminución de los niveles de triglicéridos en plasma (Zandbergen y col., 2007). Una de las modificaciones que puede sufrir el PPAR- α y que puede impactar en su activación, es la fosforilación en la serina 6, 12 o 21, lo que puede inhibir la capacidad de PPAR- α para unirse al ADN, desregulando la transcripción de sus genes diana o también puede afectar el reclutamiento de co-reguladores transcripcionales (Burns y col., 2007; Jurkowski y col., 2011; Brunmeir y Xu, 2018). Un antecedente importante para suponer una posible fosforilación es que los derivados más oxidados del temefos tienen mayor capacidad de fosforilar, tal como se demostró en el estudio *in vitro* de Verdín-Betancourt y col. (2019), en el que se describe una mayor potencia inhibitoria de la AChE dependiente del grado de oxidación de los derivados del temefos. Esto sugiere la necesidad de llevar a cabo estudios para determinar si los derivados oxidados llevan a cabo la fosforilación del PPAR- α y como se afecta su funcionalidad.

A pesar de que se observa una posible disminución en el contenido relativo de la proteína del LXR, los resultados no fueron significativos. Este resultado puede ser un poco contradictorio con los efectos observados en la concentración de lípidos séricos y en la acumulación en el hígado. Una posible explicación a que no haya habido significancia a las diferentes dosis puede ser debido a la elevada variación que se tuvo durante la determinación

del LXR, lo que sugiere utilizar una técnica más fina como la PCR-RT en estudios posteriores, que permitiría una evaluación más sensible sobre la expresión del LXR. Esto también permite suponer que posiblemente se requiere una dosis más elevada de temefos para que el efecto sea más claro. Esta suposición se hace con base en el estudio publicado por Mozzicafredo y col. (2015), en el cual un compuesto OF, el tri-*p*-O-tolil-fosfato y otros compuestos hipolipemiantes del tipo del clofibrato, mostraron una reducción en la expresión del LXR- α y de los genes dependientes del receptor, en ensayos de “docking molecular” y experimentales. A la fecha, este es el único reporte que describe un compuesto OF sobre los niveles de proteína del LXR- α . Estos resultados sugieren también la necesidad de llevar a cabo estudios para explicar como el temefos está afectando el balance lipídico, en el que posiblemente está involucrada la interacción entre varios receptores y la fosforilación de algunos de ellos.

4.5 Efecto oxidante del temefos

Los resultados de la concentración de MDA hepático en este estudio indican que el temefos solo lo incrementó de manera significativa a la dosis de 100 mg/kg/d (Figura 8). En el mismo sentido, y para complementar la evaluación del estado óxido-reducción también se evaluaron los niveles de GSH y GSSG en el órgano.

El temefos se metaboliza amplia y exhaustivamente tanto *in vivo* como *in vitro* (Hernández-Esteris, 2019; Verdín-Betancourt y col., 2021). En la ruta de biotransformación propuesta en la rata, se forman por lo menos 18 metabolitos intermedios debido a su extensa biotransformación. En esta ruta de biotransformación del temefos están involucradas diversas isoformas de CYP, monooxigenasas que contienen flavina y esterasas (Hernández-Esteris, 2019). Durante la biotransformación de un xenobiótico se generan varias especies reactivas de oxígeno (ERO) (Veith y Moorthy, 2018). Esto nos indica que la exposición a temefos genera una gran cantidad de ERO. El MDA, es uno de los principales y más estudiado producto de la peroxidación de ácidos grasos poli-insaturados (Del Rio, y col., 2005). Por lo que, un aumento de los radicales libres provoca una sobreproducción de MDA (Gawel, 2004). El GSH es el tiol no proteico más abundante a nivel celular y es considerado como el antioxidante endógeno más importante producido por las células para protegerlas del estrés oxidante, neutralizando el efecto de las ERO y manteniendo los niveles de antioxidantes exógenos (Onur y col., 2014). En el estado reducido del glutatión (GSH), el grupo tiol de la cisteína es capaz de donar un electrón a otras moléculas inestables, tales como las ERO, y al donar un electrón el glutatión

se convierte en reactivo y se combina rápidamente con otro glutatión reactivo para formar al glutatión oxidado (GSSG) (Onur y col., 2014). Sobre estos parámetros, la exposición a temefos no alteró significativamente los niveles del GSH o GSSG en el hígado, a ninguna de las dosis evaluadas (Figura 8). Sin embargo, la relación GSH/GSSG disminuyó de manera significativa a la dosis de 100 mg/kg/d. Este resultado y los observados sobre la concentración de MDA sugiere que a la dosis más alta de temefos si se altera el estado óxido-reducción, a pesar de que la determinación de estos parámetros se hizo 24 h después de la última administración. Para esto es importante considerar qué a este tiempo, el organismo posiblemente ya se había recuperado de los posibles daños generados por los ERO que ocurren en las primeras horas luego de la exposición debido a la intensa biotransformación por parte de la activación de todos los mecanismos bioquímicos y celulares para neutralizar el daño producido. Ante esta situación, es recomendable realizar más estudios enfocados para determinar el daño del temefos sobre el estado óxido-reducción en las primeras horas después de la administración, que es el periodo en el que la biotransformación es más intensa (Verdín-Betancourt y col., 2021). Esta propuesta está apoyada por los resultados obtenidos por Ramos-Flores y col. (2021), quienes demostraron la oxidación significativa (19%) de los lípidos de la membrana de los espermatozoides de ratas expuestas a 100 mg/kg/d por 5 d en espermatozoides, pero los niveles de MDA fueron similares a los de los animales no expuestos al plaguicida debido posiblemente a que ya se había eliminado. Todo esto sugiere que el daño oxidativo y la neutralización de las especies reactivas depende del tiempo de exposición, tiempo de la determinación, la dosis y el órgano en el que se evalúe.

4.6 Efecto del temefos sobre las bilirrubinas

En este estudio también se evaluaron los diferentes tipos de bilirrubinas (indirecta, directa y total) en suero (Figura 9). La exposición a temefos no afectó la bilirrubina directa e indirecta a ninguna dosis y solo se incrementó la bilirrubina total a la dosis de 100 mg/kg/d. Este resultado sugiere que el metabolismo de compuestos endógenos también se ve afectado por el temefos alterando la capacidad del hígado para procesar y eliminar la bilirrubina de manera efectiva. Este resultado concuerda con los resultados obtenidos por Hernández-Esteris y col. (2021), quienes también observaron un incremento de 2 veces en los niveles de bilirrubina total en ratas expuestas a la misma dosis de 100 mg/kg/d de temefos por 5 días.

4.7 Efecto del temefos sobre el contenido hepático de CYP total

Finalmente, se determinó el efecto del temefos sobre la concentración del CYP total hepático, el cual representa un sistema de defensa ante la presencia de xenobióticos en el organismo llevando a cabo la biotransformación de ellos para su eliminación (Guengerich, 2006). La exposición a temefos produjo a todas las dosis probadas una disminución en la concentración de CYP total (Figura 10), lo que nos indicando que, desde la dosis más baja, se disminuye la capacidad de biotransformar xenobióticos y al mismo tiempo predispone a una clara interacción con xenobióticos, la cual puede ser benigna o maligna dependiendo del xenobiótico de interés. Algunas posibles explicaciones a esta disminución se pueden deber a que el temefos actúe como un sustrato suicida, tal como lo sugirió Ferguson (1985), y ha sido demostrado para otros OF como el malatión y el clorpirifos (Usmani y col., 2006). Otra posibilidad es que el temefos o sus metabolitos interactúen con los receptores CAR y PXR, los cuales regulan la expresión de los CYPs lo que provocaría una represión de la expresión génica (Timsit y Negishi, 2007). Sin embargo, estos resultados son contradictorios con los reportados por Hernández-Esteris (2020), quien a la dosis de 50 mg/kg/d de temefos por 3 días, no observó un cambio significativo en el contenido del CYP total hepático. Estas diferencias pueden ser debido a la dosis y el tiempo de exposición que fueron diferentes en cada estudio.

4.8 Comentarios finales sobre el uso del temefos

Con base en los resultados obtenidos en este estudio, el hígado es un órgano blanco del temefos. Este plaguicida es hepatotóxico en exposiciones repetidas a las dosis establecidas como seguras por la OMS y la EPA, lo que representa un riesgo para la salud humana. Afecta particularmente el balance de lípidos, produce necrosis tisular y altera otras rutas metabólicas y exacerba el estrés oxidante, por lo tanto, es recomendable que se modere el uso en las campañas de aplicación para el control de vectores en áreas endémicas de dengue. Al mismo tiempo, es recomendable realizar una revisión a la normatividad relacionada con su uso con el fin de proteger a la población en general y de esta manera, disminuir el riesgo a la salud que representa este plaguicida.

5. CONCLUSIONES

1. La exposición repetida a temefos produjo daño tisular hepático debido al incremento de las actividades enzimáticas de la ALT, AST y LDH en el suero a la dosis de 100 mg/kg/d.
2. La exposición a temefos afectó el balance lipídico en el suero debido a un aumento en la concentración de los lípidos totales y LDL (dosis de 10 y 100 mg/kg/d), triglicéridos (dosis de 10 mg/kg/d) y colesterol (dosis de 100 mg/kg/d) y favoreció la acumulación de lípidos en el hígado.
3. La exposición a temefos alteró el balance del estado redox en el hígado, el cual se manifestó por un incremento de los niveles de MDA a la dosis de 100 mg/kg/d, así como también por una disminución en la tasa de GSH/GSSG a las dosis de 1 y 100 mg/kg/d.
4. A la dosis de 100 mg/kg/d, la exposición a temefos provocó una disminución de los niveles proteicos del PPAR- α , pero no se afectaron los niveles de la proteína del LXR- α a ninguna de las dosis probadas.
5. La exposición a temefos disminuyó el contenido del CYP hepático, lo que puede provocar interacciones en el metabolismo de xenobióticos y también en el metabolismo de compuestos endógenos y de xenobióticos.
6. Los resultados obtenidos hasta ahora indican que el temefos produce daño hepático a las dosis establecidas como seguras por la OMS y la EPA, lo que indica que el uso del temefos no es tan seguro. Esto sugiere la necesidad de realizar una revisión a la normatividad sobre el uso intensivo del temefos en las campañas de aplicación para el control de vectores en las regiones endémicas de dengue.

6. PERSPECTIVAS

1. Análisis por PCR-TR de los niveles de transcripción del LXR- α y PPAR- α para evaluar el efecto del temefos sobre estos receptores de manera más exacta.
2. Evaluar la capacidad de fosforilación de los derivados oxidados del temefos al PPAR- α y LXR- α ya sea por estudios *in vivo* o *in vitro*.
3. Determinar el efecto del temefos sobre la expresión y funcionalidad de los transportadores membranales involucrados en la captación y secreción de los lípidos en los hepatocitos.
4. Continuar con la evaluación del daño hepatotóxico en otras rutas metabólicas.

7. REFERENCIAS

- Aiub, C.A.F., Coelho, E.C.A., Sodre, E., Pinto, L.F.R., Felzenszwalb, I. (2002). Genotoxic evaluation of the organophosphorous pesticide temephos. *Genet. Mol. Res.* 1, 159–166.
- Apfel, R., Benbrook, D., Lernhardt, E., Ortiz, M.A., Salbert, G., Pfahl, M. (1994). A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. *Mol. Cell. Biol.* 14, 7025–7035.
- Arora, R., Bhushan, S., Kumar, R., Mannan, R., Kaur, P., Singh, A. P. & Arora, S. (2014). Hepatic dysfunction induced by 7, 12-dimethylbenz (α) anthracene and its obviation with erucin using enzymatic and histological changes as indicators. *PloS one*, 9(11).
- Benitez-Trinidad, A.B., Herrera-Moreno, J.F., Vazquez-Estrada, G., Verdín-Betancourt, F.A., Sordo, M., Ostrosky-Wegman, P., Bernal-Hernandez, Y. Y., Medina-Díaz, I. M., Barron-Vivanco, B. S., Robledo-Marenco, M. L., Salazar, A.M., Rojas-García, A.E. (2015). Cytostatic and genotoxic effect of temephos in human lymphocytes and HepG2 cells. *Toxicol. In vitro* 29, 779–786.
- Bernhardt, R. (2006). Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J. Biotechnol.* 124, 128–145.
- Blinn, R.C. (1969). Metabolic fate of abate insecticide in the rat. *J. Agric. Food. Chem.* 17, 118–122.
- Bougarne, N., Weyers, B., Desmet, S.J., Deckers, J., Ray, D.W., Staels, B., y De Bosscher, K. (2018). Molecular actions of PPAR α in lipid metabolism and inflammation. *Endoc. Reviews* 1, 760-802.
- Browne, R. y Armstrong, D. (1998). Reduced glutathione disulfide. En: *Free radical and antioxidant protocols* (D. Armstrong, Ed.), pp. 347-352. Humana Press, New Jersey.
- Brunmeir, Reinhard; Xu, Feng (2018). Functional Regulation of PPARs through Post-Translational Modifications. *Int. J. Mol. Sci.* 19(6), 1738.
- Burnette W. (1981). Western Blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112, 195-203.
- Camacho-Hernández, I. (2019). Efecto de la exposición repetida al plaguicida Temefos sobre las células espermáticas y la presencia del plaguicida y sus metabolitos en tejidos reproductivos. México City, Mexico: Toxicology Department, Cinvestav, Campus Zacatenco.
- CENAPRECE (2021). Productos recomendados por el CENAPRECE para el combate de insectos vectores de enfermedades a partir de 2018. Recuperado de: <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/ListaProductosRecomendadosCenaprece18.pdf>
- Chen, J.D. y Evans, R.M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377, 454–457.
- Chu, K., Miyazaki, M., Man, W.C. y Ntambi, J. M. (2006). Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 deficiency protects against hypertriglyceridemia and increases plasma high-density lipoprotein cholesterol induced by liver X receptor activation. *Mol. Cell. Biol.* 26, 6786–6798.
- Cienfuegos, J. A., Rotellar, F., Baixauli, J., Martínez-Regueira, F., Pardo, F., & Hernández-Lizoáin, J. L. (2014). Regeneración hepática; el secreto mejor guardado: Una forma de respuesta al daño tisular. *Rev. Español. Enfer. Dig.* 106, 171-194.
- Daniele Del Rio; Amanda J. Stewart; Nicoletta Pellegrini (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *15(4)*, 0–328.
- De Carvalho, C. C., & Caramujo, M. J. (2018). The various roles of fatty acids. *Molecules*, 23, 2583.

Ennin, M. A., y C.S. Franklin. (1979). Some sub-cellular effects of an organophosphorus insecticide, Abate. 66, 72–73.

Environmental Protection Agency (EPA). (2016). Reregistration Eligibility Decision (RED) of temephos.

Esterbauer H., Schaur R.J., Zoller H. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hidroxy-nonenal malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad. Biol. Med.* 11, 81-128.

FAO and WHO (2022). 2th edition. Manual on the development and use of FAO and WHO specifications for chemical pesticides. Rome and Geneva. Recuperado de: <https://www.fao.org/3/cb8401en/cb8401en.pdf>

Ferguson, P.W., Medon, P.J., Nasri, E. (1985). Temephos (AbateVR) metabolism and toxicity in rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 14, 143–147.

Fernández, A. G., de Sande García, M. A., Fernández, A. M. M., Ramos, S. B., & Galán, M. J. G. (2011). Aspectos fundamentales del Citocromo P450. Fundación Tejerina.

Fernandez-Alvarez, A., Alvarez, M.S. Gonzalez, R., Cucarella, C., Muntane, J. y Casado, M. (2011). Human SREBP1c Expression in Liver Is Directly Regulated by Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR). *J. Biol. Chem.* 286, 21466–21477.

Fokko Zandbergen; Jorge Plutzky (2007). PPAR α in atherosclerosis and inflammation., 1771, 0–982.

Forkasiewicz, A., Dorociak, M., Stach, K., Szelachowski, P., Tabola, R., & Augoff, K. (2020). The usefulness of lactate dehydrogenase measurements in current oncological practice. *Cel. Mol. Biol. Letters* 25, 1-14.

Gaines, T.B., Kimbrough, R., Laws, E.R. 1967. Toxicology of Abate in laboratory animals. *Arch. Environ. Health* 14, 283–288.

Gao, M., Bu, L., Ma, Y., Liu, D., Blachier, F. (2013). Concurrent Activation of Liver X Receptor and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Exacerbates Hepatic Steatosis in High Fat Diet-Induced Obese Mice. *PLoS One.* 8, 65641.

Gaweł, S., Wardas, M., Niedworok, E., & Wardas, P. (2004). Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiadomosci lekarskie (Warsaw, Poland)* 57, 453-455.

Giulivo, M., de Alda, M. L., Capri, E., & Barceló, D. (2016). Human exposure to endocrine disrupting compounds: Their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review. *Environ. Res.* 151, 251-264.

Glass, C. K., & Rosenfeld, M. G. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Gen. Develop.* 14, 121-141.

Glossman, H. y Neville, D. M. (1972). Gamma-GlutamylTransferase in kidney brush border membranes. *FEBS Lett.* 19, 340-344.

González-Arias, C. A., Robledo-Marengo, M. D. L., Medina-Díaz, I. M., Velázquez-Fernández, J. B., Girón-Pérez, M. I., Quintanilla-Vega, B., Strosky-Wegman, P., Pérez-Herrera, N. E. & Rojas-García, A. E. (2010). Patrón de uso y venta de plaguicidas en Nayarit, México. *Rev. Int. Contam. Amb.* 26, 221-228.

Guengerich, F.P. (2006). Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *Am. Assoc. Pharmac. Sci. J.* 8, Art. 12, E101-111.

Hernandez-Esteris, A. (2020). Efecto del plaguicida organofosforado Temefos sobre la expresión de los citocromos P450 hepáticos de rata macho adulta y la participación de éstos en su biotransformación. México City, México: Department of Toxicology, Cinvestav, Campus Zacatenco.

Herrera-Moreno, J.F., Benítez-Trinidad, A.B., Xotlanihua-Gervacio, M. C., Bernal-Hernández, Y. Y., Medina Díaz, I. M., Barrón-Vivanco, B.S., González Arias, C.A., Pérez-Herrera, N.E., Rojas-García, A. E. (2018). Factores de riesgo de exposición durante el manejo

y uso de plaguicidas en fumigadores urbanos. *Rev. Int. Contam. Amb.* 34, 33-44.

Hissin, P.J. y Hilf, R. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* 74, 214-226

Horlein, A.J. Näär, A.M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Söderström, M., Glass, C.K. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377, 397–404.

Hua, X., Yokoyama, C., Wu, J., Briggs, M.R., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Wang, X. (1993). SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11603–11607.

Jokanovic, M. (2001). Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology* 166, 139–160.

Joseph, S.B., Laffitte, B.A., Patel, P.H., Watson, M.A., Matsukuma, K.E., Walczak, R., Collins, J.L., Osborne, T.F., Tontonoz, P. (2002). Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J. Biol. Chem.* 277, 11019–11025.

Jurkowski, W; Roomp, K; Crespo, I; Schneider, J G; del Sol, A (2011). PPAR γ population shift produces disease-related changes in molecular networks associated with metabolic syndrome. *Cell Death Dis.* 2(8), e192–.

Kahn, L. G., Philippat, C., Nakayama, S. F., Slama, R., & Trasande, L. (2020). Endocrine-disrupting chemicals: implications for human health. *The Lancet Diab. Endocrinol.* 8, 703-718.

Kajikawa, Masato; Higashi, Yukihito (2019). Triglycerides and endothelial function. *Curr. Op. Lipid.* 30(5), 364–369.

Kamel, A., Byrne, C., Vigo, C., Ferrario, J., Stafford, C., Verdin, G., Siegelman, F., Knizner, S. y Hetrick, J. (2009). Oxidation of selected organophosphate pesticides during chlorination of simulated drinking water. *Water. Res.* 4, 522–534.

Katherine A. Burns; John P. Vanden Heuvel (2007). Modulation of PPAR activity via phosphorylation. *1771(8)*, 0–960.

Kennedy, M. A., Barrera, G. C., Nakamura, K., Baldán, Á., Tarr, P., Fishbein, M. C. & Edwards, P. A. (2005). ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metabol.* 1, 121-131.

Kurtz, P. J., Weeks, M. H. (1979). Effects of single and repeated exposures to abate on rat behavior and cholinesterase activity. *Toxicology* 13, 35–43.

Lacorte, S., Ehresmann, N., Barcelo, D. (1996). Persistence of temephos and its transformation products in rice crop field waters. *Environ. Sci. Technol.* 30, 917–923.

Li, Y., Bolten, C., Bhat, B.G., Woodring-Dietz, J., Li, S., Prayaga, S. K., Xia, C., Lala, D.S. (2002). Induction of human liver X receptor α gene expression via an autoregulatory loop mechanism. *Mol. Endoc.* 16, 506–514

Lin, J H, & Lu, A Y. (1998). Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin. Pharmacokinetics*, 35, 361–390.

Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol Reagent, *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Martínez-Mercado, J.P., Sierra-Santoyo, A., Verdín-Betancourt, F.A., Rojas- García, A.E., Quintanilla-Vega, B. (2022). Temephos, an organophosphate larvicide for residential use: a review of its toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 52, 113-124.

Martins-Laurentino A, O, Durante de Medeiros, F., De Oliveira J, Da Rosa N, Mateus-Gomes, T., De Medeiro-Peretti, E., Somariva-Prophiro, J., Fortunato., J. J. (2019). Effects of prenatal exposure to temephos on behavior and social interaction. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 15:669–673.

Mehlem, A., Hagberg, C. E., Muhl, L., Eriksson, U., & Falkevall, A. (2013). Imaging of neutral

lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. *Nature protocols*, 8(6), 1149-1154.

Miron-Vani, J.M., De Carvalho-Schweich, L., De Oliveira, K.W., Auharek, S.A., Cunha-Laura, A.L., Antonioli-Silva, A.C.M.B., Nazario, C.E.D., Oliveira, R.J. (2018). Evaluation of the effects of the larvicides temephos on reproductive performance, embryofetal development and DNA integrity of Swiss mice. *Pestic. Biochem. Physiol.* 148, 22–27.

Mozzicafreddo, M., Cuccioloni, M. Bonfili, L., Cecarini, V., Palermo, F.A., Cocci, P., Mosconi, G., Capone, A., Ricci, I., Eleuteri, A.M., Angeletti, M. (2015). Environmental pollutants directly affect the liver X receptor alpha activity: Kinetic and thermodynamic characterization of binding. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 152, 1–7.

Murphy, S.D. y Cheever K.L. (1972). Carboxylesterase and cholinesterase inhibition in rats. Abate and interaction with malathion. *Arch. Environ. Health* 24, 107–114.

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2006). Temephos. In: *Pesticide residues in food 2006. Joint FAO/WHO meeting on pesticide residues. Rome, Italy: FAO/WHO*, p. 220–224. Accesado el 20 Julio 2022. https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/JMPRr_epor200.pdf

Peet, D.J., Turley, S.D., Janowski, B.A., Lobaccaro, J.M., Hammer, R.E., Mangelsdorf, D.J. (1998). Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR- α . *Cell* 93, 693–704.

Pelkonen, O. (2004). Induction and inhibition of cytochrome P-450 *. *Monografías de La Real Academia Nacional de Farmacia*, 123–147.

Ramos-Flores, A., Camacho-Hernández, I., Solís-Heredia, M.J., Sierra-Santoyo, A., Verdín-Betancourt, F.A., Parra-Forero, Y., López-González, M.L., Hernández-Ochoa, I., Quintanilla-Vega, B. (2021). Temephos decreases sperm quality and fertilization rate and is metabolized in rat reproductive tissues at low-dose exposure. *Toxicol. Sci.* 184, 57–66.

Régnier, M., Polizzi, A., Lukowicz, C., Smati, S., Lasserre, F., Lippi, Y. & Loiseau, N. (2019). The protective role of liver X receptor (LXR) during fumonisin B1-induced hepatotoxicity. *Arch. Toxicol.* 93, 505-517.

Repa, J.J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.M., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Mangelsdorf, D.J. (2000). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP- 1c) by oxysterol receptors, LXR- α and LXR- β . *Genes Develop.* 14, 2819–2830.

Reyes-Chaparro, A., Verdín-Betancourt, F. A., Sierra-Santoyo, A. (2020). Human biotransformation pathway of temephos using an *in silico* approach. *Chem. Res. Toxicol.* 33, 2765–2774.

Rose, R. (2001). Pesticides and Public Health: Integrated Methods of Mosquito Management. *Emer. Infect. Dis.* 7, 17-23.

Ross, S.E., Erickson, R.L., Gerin, I., DeRose, P.M., Bajnok, L., Longo, K.A., Misek, D.E., Kuick, R., Hanash, S.M., Atkins, K.B., Andresen, S.M., Nebb, H.I., Madsen, L., Kristiansen, K., MacDougald, O.A. (2002). Microarray analyses during adipogenesis: understanding the effects of Wnt signaling on adipogenesis and the roles of liver X receptor alpha in adipocyte metabolism. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5989–5999.

Russell, D. W., Schneider, W.J., Yamamoto, T., Luskey, K.L., Brown, M.S., Goldstein, J.L. (1984). Domain map of the LDL receptor: sequence homology with the epidermal growth factor precursor. *Cell* 37, 577–585.

Santos, Ana L.; Preta, Giulio (2018). Lipids in the cell: organisation regulates function. *Cel. Mol. Life Sci.*

Schultz, J.R., Tu, H., Luk, A., Repa, J.J., Medina, J.C., Li, L., Schwendner, S., Wang, S., Thoolen, M., Mangelsdorf, D.J., Lustig, K.D., Shan, B. (2000). Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Develop.* 14, 2831–2838.

Seol, W., Choi, H. S. y Moore, D. D. (1995). Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: two novel orphan receptors. *Mol. Endocrinol.* 9, 72–85.

Shih-Ling M., Sierra-Santoyo A., Verdín-Betancourt, F. A. (2022). Cinética de excreción urinaria del temefos en la rata macho adulta. Recuperado de: <https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/4253>

Singh, S., Kumar, V., Thakur, S., Banerjee, B. D., Chandna, S., Rautela, R. S., Grover, S. S., Rawat, D. S., Pasha, S. T., Jain, S. K., Ichhpujani, R.L., Rai, A. (2011). DNA damage and cholinesterase activity in occupational workers exposed to pesticides. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 31, 278–285.

Stenson, B.M., Rydén, M., Steffensen, K.R., Wåhlén, K., Pettersson, A.T., Jocken, J.W., Arner, P., Laurencikiene, J. (2009). Activation of liver X receptor regulates substrate oxidation in white adipocytes. *Endocrinology* 150, 4104–4113.

Toporova, L. y Balaguer, P. (2019). Nuclear receptors are important targets of environmental disrupting compounds. *Mol. Cell. Endocrinol.* 502, 110665.

Usmani, K.A., 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 Metabol. Disp.* 34,1606-14.

Venkateswaran, A., Laffitte, B.A., Joseph, S.B., Mak, P.A., Wilpitz, D.C., Edwards, P.A., Tontonoz, P. (2000). Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR α . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97,12097–12102.

Verdín-Betancourt, F.A, Figueroa, M., López-González M.L., Gómez, E., Bernal-Hernández, Y.Y., Rojas-García, A.E., Sierra-Santoyo, A. (2019). In vitro inhibition of human red blood cell acetylcholinesterase (AChE) by temefos-oxidized products. *Sci. Rep.* 9, 1–11.

Verdín-Betancourt, F.A., Figueroa, M., Soto-Ramos, A.G, López-González M.L., Castañeda- Hernández, G., Bernal-Hernández, Y.Y., Rojas-García A.E., Sierra-Santoyo, A. (2021). Toxicokinetics of temefos after oral administration to adult male rats. *Arch. Toxicol.* 95, 935–947.

Wahli, W., Kersten, S. y Desvergne, B. (2000). Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 405, 421–424.

Willy, P.J., Umesono, K., Ong, E.S., Evans, R.M., Heyman, R.A., Mangelsdorf, D.J. (1995). LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Develop.* 9, 1033–1045.

Wong, J., Quinn, C.M. y Brown, A.J. (2006). SREBP-2 positively regulates transcription of the cholesterol efflux gene, ABCA1, by generating oxysterol ligands for LXR. *Biochem. J.* 400, 485–491.

Xu, Pengfei; Zhai, Yonggong; Wang, Jing (2018). The Role of PPAR and Its Cross-Talk with CAR and LXR in Obesity and Atherosclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1260.

Yang, Ping-Chang; Mahmood, Tahrin (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4, 429.

Yang, X., Schnackenberg, L. K., Shi, Q., & Salminen, W. F. (2014). Hepatic toxicity biomarkers. In *Biomarkers in toxicology* (pp. 241-259). Academic Press.

Yu, L., York, J., Von-Bergmann, K., Lutjohann, D., Cohen, J.C., Hobbs, H.H. (2003). Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. *J. Biol. Chem.* 278, 15565–15570.