

Tesis Doctoral

Efectos de los plaguicidas organofosforados sobre la expresión génica de embriones de *Rhinella arenarum*. Mecanismos de acción y vías de señalización

Sotomayor, Verónica

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Sotomayor, Verónica. (2011). Efectos de los plaguicidas organofosforados sobre la expresión génica de embriones de *Rhinella arenarum*. Mecanismos de acción y vías de señalización. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Sotomayor, Verónica. "Efectos de los plaguicidas organofosforados sobre la expresión génica de embriones de *Rhinella arenarum*. Mecanismos de acción y vías de señalización". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

**Efectos de los plaguicidas organofosforados sobre la
expresión génica de embriones de *Rhinella arenarum*.**
Mecanismos de acción y vías de señalización.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área de Química Biológica

Lic. Verónica Sotomayor

Director de Tesis: Dra. Ana María Pechén de D'Angelo

Director Asistente de Tesis: Dr. Andrés Venturino

Consejero de Estudios: Dra. Silvia Moreno de Colonna

Lugar de trabajo: LIBIQUIMA, Instituto Multidisciplinario de Investigación y
Desarrollo de la Patagonia Norte (IDEPA): CONICET-
Universidad Nacional del Comahue.

Buenos Aires, 2011

Efectos de los plaguicidas organofosforados sobre la expresión génica de embriones de *Rhinella arenarum*. Mecanismos de acción y vías de señalización.

Nuestro laboratorio ha demostrado previamente los efectos adversos de plaguicidas organofosforados (OF) en estadios embrionarios y larvales de *Rhinella arenarum* [1-3]. Estudiamos aquí los efectos de la exposición a distintas concentraciones del OF clorpirifos (Clp), focalizándonos a nivel molecular.

Se determinó una CL₅₀ mayor para brote caudal (BC) respecto de la CL₅₀ obtenida para opérculo completo, causando malformaciones de manera dosis-dependiente. En concentraciones subletales tendió a disminuir las actividades de catalasa y glutatión S-transferasa, incrementar el contenido endógeno de GSH y la actividad específica de acetilcolinesterasa en embriones en BC. La ornitina descarboxilasa disminuyeron pero los niveles de poliaminas (PAs) endógenas se mantuvieron constantes. La unión de AP-1 al ADN también se encontró disminuida en embriones en BC expuestos y se observaron alteraciones en los patrones de fosforilación de proteínas nucleares, demostrándose posteriormente que c-Fos disminuye en embriones en BC expuestos a 2 mg/l, a diferencia de lo que observamos en GT. Por su parte c-Jun también se vio disminuida en embriones expuestos en BC, así como su forma fosforilada. Los niveles de ERK 1/2 disminuyeron frente a la exposición subletal al OF pero JNK2 aumentó, lo que indicaría que la regulación de c-Jun se estaría dando por la vía de ERK. Esto sugiere que AP-1, actuando al menos como heterodímero (c-Fos-c-Jun), estaría viendo afectada su unión al sitio TRE del ADN debido al OF. El estrés oxidativo es sugerido por los niveles de GSH endógeno y las actividades de catalasa y GST luego de la exposición al OF, mientras que una respuesta aún más temprana se observa en la regulación negativa de la unión de AP-1 al ADN y en la biosíntesis de PAs, reflejando otros mecanismos, probablemente relacionados a retraso del desarrollo y a teratogénesis.

Palabras Claves: *R. arenarum*, desarrollo embrionario, AP-1, poliaminas, clorpirifos

Effects of organophosphorus pesticide on gene expression in *Rhinella arenarum* embryos. Signaling pathways and mechanism of action.

Our laboratory has previously showed the adverse effects of organophosphorus pesticides (OP) in several embryonic stages and larvae of *Rhinella arenarum*[1-3]. We study here the effects caused by the exposure to several concentrations of chlorpyrifos, analyzing specifically the molecular level.

We obtained an LC₅₀ much higher in embryos at tailbud stage (TB) in respect with the LC₅₀ obtained for embryos at complete operculum, observing malformations in a time-dose dependent manner. The pesticide, at sublethal concentrations, tended to diminish catalase and glutathion S-transferase's specific activities, increase the levels of endogenous GSH and acetylcholinesterase's specific activity in embryos at TB stage. The ornithine decarboxilase's specific activity was decreased and the levels of endogenous polyamines remained stable. AP-1 binding to the DNA, in treated embryos at TB stage, were diminished and we observed altered patterns in the phosphorylation status of total proteins, showing later that c-Fos protein is decreased in exposed embryos at TB but increased in late gastrula. The c-Jun protein and its phosphorilated form, p-c-Jun, was found to be decreased after exposure to the OP. The level of ERK 1/2 diminished in exposed embryos but JNK2 increased, thus indicating that c-Jun regulation would be due to the ERK 1/2 pathway. This suggests that AP-1 (acting at least as an heterodimer c-Jun-c-Fos) binding to the TRE site of the DNA would be affected by the OP. The oxidative stress is suggested by the levels of endogenous GSH and the activities of catalase and GST, after the exposure to the OP; while an even earlier response is observed with the negative regulation of the AP-1 binding to the DNA and the biosynthetic pathway of polyamines, thus reflecting other mechanism of action, probably related to a delayed development and theratogenesis.

Keywords: *R. arenarum*, embryo development, AP-1, polyamines, chlorpyrifos.

AGRADECIMIENTOS

A quienes fueron partícipes de este desafío, me acompañaron en los momentos más difíciles; me apoyaron cuando lo necesitaba; y creyeron en mi ...

A la Dra Ana María Pechén quién me dio un lugar para poder realizar mi tesis y quien, pese a sus obligaciones posteriores que la alejaron de la vida de la investigación, siempre mantuvo un vínculo estrecho con quienes tratamos de seguir sus pasos. Agradecer al Dr. Andrés Venturino, quién me acompañó en el laboratorio, respondió mis dudas y estimuló mi deseo de continuar, me enseñó a trabajar en libertad, corrigió, tachó, borró, gracias!.

Al Dr. Tomás Santa Coloma, quién me inició en el camino de la investigación y generosamente me acompañó en mi cambio de vida. A él, muchísimas gracias.

A todos quienes de alguna manera colaboraron en llevar a cabo las experiencias.

A la gente del LIBIQUIMA, Moni, Ana, Jime, Lili, Naty, Maru, Enrique, Ceci. A Susi por apoyarme más de una vez. A los demás integrantes del grupo, mi más sincero agradecimiento. A la gente de micro, porque son generosos, compañeros y muy buena gente. En particular a Euge: gracias por darme oportunidades cuando existieron, por solucionarme lo que estuvo a tu alcance, por guiarme para solucionar lo que estuvo a mi alcance, por creer en mí y por enseñarme a enseñar.

A mi familia le agradezco por todo el apoyo incondicional que me han dado, porque siempre creen en mí, porque confían, porque no se rinden y no dejan que me rinda. A Leo por todo, siempre. A mis hijos porque fueron el motor para transitar este camino y llevarlo a buen puerto, a mi mamá porque le debo más de lo que en una vida le puedo pagar y a mi hermano que es, y será, mi mejor amigo. A mis tías y tíos por ser mis segundos padres. A mi familia política por ser mi familia de sangre. A mis ahijados y a mis sobrinos.

A MI PAPA.

A mis amigas, las de siempre, las de allá en el tiempo y a lo lejos. A Magda y Marina, mis hermanas del alma. A mis amigas de la "Facu" que el tiempo las convirtió en amigas de la vida. A todas ellas...gracias por acompañarme.

A todos los buenos conocidos que los años y las experiencias compartidas nos han hecho grandes amigos y con quienes puedo contar en cada etapa de mi vida..

A mis hijos

Clara y José

“Toda persona tiene derecho a tomar parte libremente en la vida cultural de la comunidad, a gozar de las artes y a participar en el progreso científico en los beneficios que dé el resultado.”

(Art. 27 de la declaración de los derechos del hombre adoptada por la asamblea general de las Naciones Unidas el 10 de Diciembre de 1948).

Parte de los resultados presentados en esta tesis doctoral han sido publicados en una revista nacional y una revista internacional con referato:

- **Alteraciones del desarrollo embrionario, poliaminas y estrés oxidativo inducidos por plaguicidas organofosforados en *Rhinella arenarum*.**
Lascano, Cecilia Inés; Sotomayor, Verónica; Ferrari, Ana; Venturino, Andrés.
Acta Toxicol. Argent. (2009) 17 (1): 8-19.
- **Changes in the antioxidant metabolism in the embryonic development of the common South American toad *Bufo arenarum*: Differential responses to pesticide in early embryos and autonomous-feeding larvae.**
Ana Ferrari, Liliana Anguiano, Cecilia Lascano, Verónica Sotomayor, Enrique Rosenbaum and Andrés Venturino
Journal of Biochemical and Molecular Toxicology. 2008 Jul; 22(4):259-67

Parte de los resultados de esta tesis serán presentados en los siguientes trabajos (en preparación):

- **AP-1 regulation by exposure to sublethal doses of chlorpyrifos in *Rhinella arenarum* (*Bufo*) embryos.**
Sotomayor, Verónica; Ferrari, Ana; Pechén de D'Angelo Ana María and Venturino, Andrés. En revisión.
- **Developmental alterations in early embryogenesis caused by the exposure to the OP chlorpyrifos in *Rhinella arenarum*.**
Sotomayor, Verónica; Lascano, Cecilia; Pechén de D'Angelo Ana María and Venturino, Andrés. En revisión.

ABREVIATURAS	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Plaguicidas	4
1.1.1 Un poco de historia...	4
1.1.2 Clasificación toxicológica de los plaguicidas	5
1.1.3 Plaguicidas OF: vías de activación y metabolización	10
1.1.4.Efecto de los plaguicidas OF y Carbamatos sobre la actividad específica de la AChE	15
1.1.4.1 Acetilcolina y acetilcolinesterasa	15
1.1.4.2 Receptores de neurotransmisores del SNA	18
1.1.5 Clorpirifos (0,0-dietil 0- (3,5,5-tricloro-2-piridil fosforotioato)	24
1.1.5.1 El Clp como agente anticolinérgico	26
1.1.5.2 Efectos no colinérgicos de los OF: antecedentes ante la exposición al Clp	27
1.1.5.2.1 El factor de transcripción AP-1 y sus componentes	29
1.2 Estrés oxidativo y el sistema antioxidante	36
1.3 Poliaminas	42
1.3.1 Metabolismo y regulación de los niveles de PAs	44
1.3.2 L-Ornitina descarboxilasa (ODC)	46
1.3.3 Las PAs y la vía de transducción de señales de las MAPKs	50
1.4 Biomarcadores y especies bioindicadoras	52
1.4.1 Los anfibios como modelos de estudio en toxicología ambiental	56
1.4.1.1 Estadios embrionarios de los anfibios	58
1.5 Toxicología acuática	63

1.6 Marco geográfico e importancia regional del estudio de plaguicidas	66
1.6.1 Tipos de plaguicidas aplicados en el alto valle de Río Negro y Neuquén	67
1.7 Antecedentes en nuestro laboratorio	69
2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	71
3. MATERIALES Y METODOS	73
3.1 Compuestos Químicos	74
3.2 Anticuerpos	74
3.3 Mantenimientos de ejemplares	74
3.4 Inducción de las ovulaciones y fertilización	75
3.5 Tratamientos	76
3.6 Toma de muestras y degangado	77
3.7 Estudios toxicológicos	77
3.7.1 Determinación de la CL ₅₀ , asignación de estadios y estudio de las malformaciones.	77
3.7.2 Estudios Histológicos	78
3.8 Biomarcadores bioquímicos	80
3.8.1 Cuantificación de proteínas	81
3.8.2 Actividad específica de acetilcolinesterasa (AChE)	81
3.8.3 Actividad específica de GSH S-aryl transferasa (GST)	82
3.8.4 Actividad específica de Catalasa	83
3.8.5 Determinación del contenido de GSH endógeno	84
3.9 Poliaminas	85
3.9.1 Determinación de la actividad específica de L-Ornitina descarboxilasa (ODC)	85

3.9.2 Determinación de los niveles de poliaminas	85
3.10 Estudios moleculares	87
3.10.1 Extracción de proteínas nucleares	87
3.10.2 Ensayo de Retardo de la Movilidad Electroforética	88
3.10.3 Ensayo de fosforilación	89
3.10.4 Análisis de proteínas por <i>SDS-PAGE</i> y <i>Western Blot</i>	91
3.11 Análisis de datos y estadística	92
4. RESULTADOS	93
4.1 Estudios toxicológicos del Clp en embriones de <i>R. arenarum</i>	94
4.2 Identificación y análisis de las malformaciones relacionadas con la exposición al OF Clp	97
4.2.1 Alteraciones morfológicas en los embriones tras la exposición a Clp	97
4.2.2 Análisis cuantitativo de las malformaciones inducidas por Clp	105
4.3 Estudios histológicos	106
4.4 Biomarcadores bioquímicos	108
4.4.1 Cuantificación del efecto del Clp sobre la actividad específica de la AChE	108
4.4.2 Efectos sobre el sistema de defensa antioxidante	110
4.5 Estudios de la acción del Clp sobre la vía de las PAs	113
4.5.1 Medición de los niveles de PAs endógenas	113
4.5.2 Determinación de la actividad específica de ODC	114
4.5.3 Correlación entre las acciones del Clp sobre el desarrollo embrionario y el metabolismo de las PAs	115

4.6 Determinación efectos a nivel molecular frente a la exposición al plaguicida Clp	117
4.6.1 Regulación de la unión del factor de transcripción AP-1 a su elemento de unión al ADN	117
4.6.2 Estudios de fosforilación <i>in vitro</i> de proteínas nucleares	121
4.6.3 Análisis de la expresión de factores de transcripción y su estado de fosforilación	123
4.6.3.1 Estudio de los componentes del FT AP-1, c-Fos y c-Jun	123
4.6.3.2 Análisis por <i>Western blot</i> de la vía de las MAPKs y PKC	125
5. DISCUSION	127
6. CONCLUSIONES	139
7. ANEXOS	143
ANEXO I: Epibolia del ectodermo	144
ANEXO II: Mapa de destino de la blástula en <i>X. laevis</i>	144
ANEXO III: Detalle de un embrión en el estadio de Tubo Neural (TN)	145
ANEXO IV: Detalle de un embrión en el estadio de Brote Caudal (BC)	145
8. BIBLIOGRAFÍA	146

Figura 1. Estructura general de los plaguicidas OF	10
Figura 2. Principales procesos que afectan la movilidad y persistencia de los plaguicidas en la biosfera.	12
Figura 3. Síntesis del neurotransmisor ACh	15
Figura 4. Mecanismo de incorporación de ACh en las vesículas de la neurona presináptica y su posterior liberación al espacio interneurona, o sináptico	16
Figura 5. Esquema representando los pasos que ocurren en el impulso nervioso entre una neurona pre y postsináptica	17
Figura 6. Izq. Predicción de la estructura de un receptor muscarínico. Der. Vista longitudinal de la estructura propuesta de un receptor nicotínico	20
Figura 7. Reacción de inhibición y envejecimiento de la AChE	21
Figura 8. Ilustración esquemática de la interacción de la ACh, el carbamato carbaril y del Clp oxón con el sitio activo de la enzima AChE	23
Figura 9. Estructura química del OF Clp	24
Figura 10. Principios activos de los plaguicidas más utilizados en la zona productiva de Río Negro y Neuquén	25
Figura 11. Esquema de la metabolización del Clp y sus metabolitos principales	27
Figura 12. El FT AP-1 está compuesto por homodímeros o heterodímeros de los miembros de las familias de c-Fos, c-Jun y ATF	30
Figura 13. El dominio de cierre de leucinas (LZD) media la dimerización de las proteínas, acercando los dominios de unión al ADN (DBD) y facilitando la interacción de las proteínas con el mismo	31
Figura 14. Vía de transducción de señales que converge en la activación del FT AP-1 y su unión al ADN	32
Figura 15. Genes correspondientes a <i>c-fos</i> y <i>c-jun</i> murinos	33

Figura 16. Regulación transcripcional de los miembros de AP-1: c-Jun (A) y c-Fos (B)	34
Figura 17. Fuentes de EROs y mecanismos de defensa antioxidante	38
Figura 18. Vías involucradas en la generación de EROs y los mecanismos de defensa antioxidante en células de epidermis	40
Figura 19. Representación esquemática de la vía de traducción de señales de AP-1 y NF- κ B activadas por el efecto de oxidantes y antioxidantes	41
Figura 20. Estructura de las PAs Put, Spd y Spm	43
Figura 21. Caminos biosintéticos y catabólicos de las PAs	45
Figura 22. Rol de la Antizima (AZ) y ODC en el metabolismo de las PAs.	49
Figura 23. Efecto de la Spd (izquierda) y Put (derecha.) en eventos de transducción de señales	51
Figura 24. Relación entre el metabolismo de las PAs y las proteínas reguladoras del ciclo celular	52
Figura 25. Ciclo de vida del sapo común (<i>R. arenarum</i>)	57
Figura 26. Segmentación del cigoto fertilizado en anfibios	59
Figura 27. Proceso de gastrulación	60
Figura 28. Izq. Vista aérea de la confluencia de los ríos Negro y Neuquén (Google Earth), der. Vista aérea de la zona del Valle productivo (INTA, web).	67
Figura 29. Exposición seriada a Clp de embriones de <i>R. arenarum</i> en el área de acuáticos del laboratorio de plaguicidas, LIBIQUIMA, Universidad Nacional del Comahue.	76
Figura 30. Cuantificación de las cuentas por minuto (CPM) de las distintas fracciones provenientes de la mezcla de marcación de la sonda luego de ser purificadas utilizando una columna de Sephadex G-25	88
Figura 31. Porcentaje (%) de embriones arrestados en función de la concentración de Clp a la que fueron expuestos los embriones (entre 2 y 32 mg/l) hasta alcanzar el estadio de BC (48 Hrs. de exposición)	95
Figura 32. Embriones en el estadio de GT (24 hrs de exposición al OF Clp)	98

Figura 33. A) Control, B) 2 mg/l, C) 16 mg/l. Estadio de BC (48 hrs de exposición)	100
Figura 34. Vista de A) frente y B) superior de embriones en el estadio de BC. C). Cierre incompleto del tubo neural y exogastrulación observada en embriones en BC expuestos a 16 mg/l (48 hrs de exposición)	100
Figura 35. A) Control, B) 2 mg/l, C) 8 mg/l. Estadio de RM (96 hrs de exposición)	102
Figura 36. De izquierda a derecha: Embriones expuestos a 0 (Control), 2 mg/l y 8 mg/l de Clp hasta alcanzar el estadio de LC (120 hrs de exposición)	102
Figura 37. Embriones en el estadio de LC, A) Control y B) expuesto a 8 mg/l del OF (120 hrs de exposición)	102
Figura 38. Alteraciones morfológicas observadas en el estadio de OC (6–10 días de exposición) en embriones de <i>R. arenarum</i> . A-C: Embriones no expuestos, D-F: Embriones expuestos a 12 mg/l de Clp, G-I: Embriones expuestos a 14 mg/l de Clp, y J-L: Embriones expuestos a 16 mg/l de Clp	104
Figura 39. Gráfico dosis-respuesta: Malformaciones en función de concentraciones crecientes del plaguicida OF Clp	105
Figura 40. Tinción con hematoxilina-eosina en cortes transversales de embriones en el estadio de BC	107
Figura 41. Actividad específica de la enzima AChE expresada como μ moles de producto liberado (5-tio-2-nitrobenzoato) por minuto por mg de proteína, en los estadios de gástrula tardía (GT), brote caudal (BC) y latido cardíaco (LC) en embriones controles y expuestos durante 24, 48 y 96 hrs respectivamente	109
Figura 42. Actividad específica de la enzima AChE expresada como μ moles de producto liberado (5-tio-2-nitrobenzoato) por minuto por mg de proteína, en el estadio de brote caudal (BC) en embriones sin exponer y expuestos a concentraciones crecientes de Clp	110

Figura 43. Actividad específica de la enzima GST expresada como μ moles de CDNB conjugado por minuto por mg de proteína, en los estadios de GT y BC en embriones expuestos a una concentración de 2 mg/l de Clp	111
Figura 44. Actividad específica de la enzima catalasa expresada como mmol de H ₂ O ₂ hidrolizada por minuto por mg de proteína en los estadios de GT y BC en embriones expuestos a una concentración de 2 mg/l de Clp	112
Figura 45. Contenido de GSH endógeno expresado como nmoles de GSH/ μ g de proteínas en el estadio de BC en embriones expuestos a concentraciones crecientes de Clp	113
Figura 46. Niveles de PAs endógenas, expresadas como nmoles por mg de proteína, en función de concentraciones crecientes de Clp, en embriones en el estadio de BC	114
Figura 47. Actividad de ODC, expresada como nmol de ¹⁴ -CO ₂ liberado por hora por mg de proteína, en función de concentraciones crecientes de Clp, en embriones en el estadio de BC	115
Figura 48. Actividad específica de ODC, expresada como nmol de ¹⁴ -CO ₂ liberado por hora por mg de proteína, en función del porcentaje de embriones arrestados en el estadio de BC	116
Figura 49. Correlación entre la actividad específica de ODC de y los niveles de PAs, ambos en embriones expuestos a 0, 2, 4 8 y 16 mg/l de Clp en el estadio de BC	117
Figura 50. Ensayo de movilidad electroforética	119
Figura 51. Segundo ensayo de movilidad electroforética	119
Figura 52. Cuantificación del EMSA (Figuras 50 y 51)	120
Figura 53. Geles de fosforilación	122
Figura 54. A) c-Fos: en embriones expuestos durante 24 hrs (estadio de GT) a 0, 2, 8 y 14 mg/l de Clp; B) c-Fos en extractos de embriones expuestos durante 48 hrs (estadio de BC) a una concentración única del plaguicida (2 mg/l de Clp)	124
Figura 55. Arriba) p-c-Jun; Abajo) c-Jun: en embriones expuestos durante 48 hrs (estadio de BC) a una concentración única del plaguicida (2 mg/l de Clp)	124

Figura 56. Embriones expuestos durante 48 hrs (BC): A) JNK2 (arriba, 54 KDa) y ERK1/2 (abajo, 42 KDa): exposiciones seriadas de 0,2, 8 y 14 mg/l de Clp; B) PKC (80 KDa) en embriones expuestos a 0, 2 y 8 mg/l del OF **126**

Tabla 1. Principios activos más importantes utilizados para el control de carpocapsa	67
Tabla 2. Detalle de preparación de los estándares de concentración de Put, Spd y Spm para la determinación de los niveles de PAs endógenas	86
Tabla 3. Resultados obtenidos del análisis de Probit en los estadios de BC, LC y OC	96
Anexo I. Epibolia del ectodermo	144
Anexo II. Mapa de destino de la blástula en <i>X. laevis</i>	144
Anexo III. Detalle de un embrión en el estadio de Tubo Neural (TN)	145
Anexo IV. Detalle de un embrión en el estadio de Brote Caudal (BC)	145

ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
ADN	Acido desoxirribonucleico
AP-1	Activator protein-1
ARN	Acido ribonucleico
BC	Brote caudal
BChE	Butirilcolinesterasa
CAT	Catalasa
CI₅₀	Concentración inhibitoria 50
CL₅₀	Concentración letal 50
Clp	Clorpirifos
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
EMSA	Electromobility Shift Assay (Ensayo de movilidad electroforética)
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FT	Factor de transcripción
GSH	Glutación reducido
GST	Glutación S- transferasa
GT	Gástrula tardía
Hrs	Horas
JNK	Jun N-terminal kinase

LC	Latido cardíaco
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
Mtn	Malatión
OC	Opérculo completo
OCI	Organoclorado
ODC	Ornitina descaborsilasa
OF	Organofosforado
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	Over night
PA	Poliamina
PKC	Protein kinase C
PM	Peso molecular
Put	Putrescina
<i>R. arenarum</i>	<i>Rhinella arenarum (ex Bufo arenarum)</i>
RM	Respuesta muscular
SNA	Sistema nervioso autónomo
SNC	Sistema nervioso central
Spd	Espermidina
Spm	Espermina
TA	Temperatura ambiente

1.1 Plaguicidas

1.1.1 Un poco de historia...

Los plaguicidas han sido ampliamente utilizados desde tiempos remotos y su nombre se refiere a agentes utilizados por los humanos con el fin de controlar y eliminar las plagas. Este término es inclusivo y se aplica a insecticidas, herbicidas, fungicidas, etc... La *U.S. Environmental Protection Agency* (EPA), el principal ente regulador del uso de plaguicidas en los Estados Unidos de América (EE.UU.), define a los plaguicidas del siguiente modo: “Es cualquier sustancia o mezcla de sustancias creadas con el fin de prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier plaga”[4]. Las plagas por su parte se definen como cualquier organismo que compita con el humano o sus intereses.

Ya en el año 1.000 A.C., Homero, el gran poeta griego, citaba la importancia del sulfuro como agente “anti-plaga” en pos de la lucha contra todo aquello que atentara contra los cultivos, aún cuando muchos de los materiales que se utilizaban eran inútiles y su uso se debía más que nada a la superstición y al folklore. Si bien los chinos utilizaban arsénico desde tiempos anteriores, no fue sino hasta la mitad del siglo XIX que se comenzaron a utilizar mezclas de compuestos con cierto grado de efectividad. Como ejemplo vale citar la “Mezcla Bordeaux”, utilizada en Francia en 1.865 para combatir el moho de las uvas. Compuesta por sulfato de cobre, cal y agua, es una mezcla que aún hoy se continúa utilizando. Así se daba comienzo al uso “científico” de los plaguicidas; con el estudio y entendimiento de las plagas se mejoraba notablemente el uso de los mismos. El comienzo de la era moderna en la utilización de los plaguicidas, sin embargo, se daría con el uso del DDT en el año 1.939, durante la segunda guerra mundial [5]. Por muchos años el DDT fue el plaguicida de mayor uso en EE.UU. Luego de la segunda guerra mundial, se comenzaron a producir grandes cantidades para el control de vectores de enfermedades como el tifus y la malaria. Para el año 1.945 el uso comercial y agrícola se generalizó debido a su costo razonable, efectividad, persistencia y versatilidad; pero en 1.959 el uso de este compuesto, miembro del grupo de hidrocarburos clorinados, decayó marcadamente debido al incremento en la

resistencia de los insectos, el desarrollo de plaguicidas alternativos más efectivos, la preocupación pública sobre los efectos alternativos indeseables y las restricciones impuestas por los gobiernos para el uso del mismo [6]. La publicación de Rachel Carson de 1.962, "Primavera Silenciosa" [7], desató la discusión sobre los pro y contras en el uso del DDT, poniendo en alerta no sólo a los gobiernos sino a toda la población, y para el año 1.970 se prohibiría la venta y el uso del mismo. Con estos hechos tomó fuerza el desarrollo y aplicación de los plaguicidas OF que, debido a su composición química, no eran compuestos de persistencia en el ambiente.

1.1.2 Clasificación toxicológica de los plaguicidas

Según el grupo químico del principio activo los plaguicidas más utilizados son, en orden decreciente: carbamatos (42,22%); piretroides (18,56%); OF (15,57%); sales de cobre (8,38%); fosfito (3,59%); OCl; triazinas; dinitroanilinas; urea sustituida; tiadiazinonas y benzamida y ftalonitrilos, entre otras (11,68%) [8]. En general, y para su descripción, se pueden agrupar en tres grandes grupos: Insecticidas, Herbicidas y otros plaguicidas [9]. A los fines particulares de la siguiente tesis, nos referiremos en detalle a los insecticidas únicamente, haciendo sólo una mención general respecto de los herbicidas y otros plaguicidas.

INSECTICIDAS:

- **Organoclorados (OCl):** Son sustancias que presentan cloro en su composición y afectan el SN a nivel del axón. Agrupan a un considerable número de compuestos sintéticos, cuya estructura química corresponde a los hidrocarburos clorados. Son liposolubles, con baja solubilidad en agua y elevada solubilidad en la mayoría de los disolventes orgánicos. Tienen estructura cíclica, y en general, poseen baja presión de vapor, alta estabilidad química, notable resistencia al ataque de los microorganismos y tienden a acumularse en el tejido graso de los organismos vivos, en el suelo

y las capas subterráneas, lo que condiciona que la persistencia de estos plaguicidas en el ambiente sea elevada. Actúan por inhibición de la citocromo-oxidasa, enzima que cataliza el último paso en la cadena de transporte de electrones; y por inestabilidad en el SN, fundamentalmente afectando la apertura de los canales de Na⁺ dependientes de voltaje. Al ser liposolubles, se introducen y depositan en los tejidos grasos del organismo humano a través de la cadena alimentaria. Esto da como resultado un proceso de bioconcentración y biomagnificación, siendo el primero la acumulación de químicos, en este caso plaguicidas, en su organismo, y la segunda se sucede cuando especies superiores de la cadena alimentaria tienen mayor concentración del xenobiótico que las primarias [10]. Al excretarse por vía biliar pueden ser absorbidos a nivel intestinal, posibilitando una vida biológica mayor y efectos a largo plazo. Pueden ingresar al organismo por ingestión, inhalación o por contacto con la piel. La absorción de grandes dosis se facilita cuando estos plaguicidas se encuentran disueltos en grasa animal o vegetal. La penetración dérmica de los plaguicidas OCl varía ampliamente, desde el DDT que es poco absorbido por la piel intacta aún en solución aceitosa, hasta aquellos como endrín, aldrín, dieldrín y heptacloro, que penetran con mayor facilidad y proporción. Los efectos tóxicos se observan con mayor rapidez si son ingeridos, que por exposición dérmica o inhalación.

- **Organofosforados (OF):** Son fundamentalmente ésteres del ácido fosfórico. Se descomponen con mayor facilidad y son menos persistentes en el ambiente con relación a los OCl, pero más peligrosos para el hombre debido a que tienen un mayor grado de toxicidad. Muchos de ellos son sistémicos, es decir, son absorbidos por las plantas e introducidos en el sistema vascular de los vegetales, actuando tanto en los insectos como también sobre las personas que ingieren el alimento, aunque éste sea previamente lavado (Ej: dimetoato, fosfamidón). Ingresan al organismo por vía dérmica, respiratoria, digestiva y conjuntiva. Cuando el ingrediente activo se disuelve en solvente orgánico, se facilita la absorción del producto a través de la piel. La vida media de los OF y sus productos de

biotransformación es relativamente corta (horas a días). La biotransformación de un tóxico consiste fundamentalmente en convertir un xenobiótico no polar en un compuesto soluble en agua utilizando la maquinaria bioquímica presente en las células, con la que se metabolizan compuestos endógenos de estructura química similar [11]. Su biotransformación se hace mediante enzimas oxidasas, hidrolasas y transferasas, principalmente hepáticas. La eliminación tiene lugar por la orina y en menor cantidad por las heces. El primer efecto bioquímico asociado con la toxicidad de los OF es la inhibición de la enzima AChE; en el SN existe una proteína que tiene actividad enzimática esterásica; ésta, cuando es fosforilada por el plaguicida, se convierte en lo que se denomina esterasa neurotóxica, responsable de la neuropatía retardada. Otra característica es que son biodegradables y no se acumulan en el organismo, pero presentan problemas especiales debido a que pueden combinarse con otros OF produciendo diversos efectos como sinergia, potenciación e inhibición de la detoxificación. Se encuentra mayor información sobre los plaguicidas OF en el capítulo 1.1.3.

- **Carbamatos:** Son derivados del ácido carbámico (ésteres), su actividad puede ser incrementada por la adición de otros compuestos como el piperonil butóxido que tiene efecto sinérgico. El grupo de los carbamatos corresponde en su mayor parte a derivados del ácido N-metil-carbámico. Inhiben la colinesterasa de modo similar a como lo realizan los insecticidas OF. Los formulados comerciales más comunes son el Baygón, el Servín, el Temik y el Zactram. Su persistencia en el ambiente y su toxicidad, es intermedia entre los dos anteriores. De acuerdo a su composición sus derivados pueden tener propiedades insecticidas, fungicidas o herbicidas. Ingresan a los mamíferos por vía epidérmica, conjuntiva, respiratoria y digestiva. Los carbamatos son inhibidores transitorios de la AChE, durante algunas horas solamente, pudiéndose observar la reactivación de la enzima ya que no se produce el fenómeno de envejecimiento característico de los OF. No se ha demostrado hasta el presente neurotoxicidad retardada con ningún carbamato.

- **De origen biológico:** Son derivados de sistemas vivientes, generalmente de baja toxicidad. El más comúnmente utilizado es el *Bacillus thuringensis*, en el que varias cepas son patógenas de diversos insectos y son cultivadas y cosechadas en forma de esporas. Las esporas se formulan como polvos humectables, concentrados suspendibles y gránulos, para ser cultivados en cultivos de campo y controlar así los insectos. Se han documentado muy raras infecciones en humanos por lo cual no se encuentra registrado como plaguicida. Otros agentes biológicos utilizados son el eugenol (derivado del clavo aromático), el azadirachtin (derivado del árbol de Neem), el ácido giberélico (fitohormona que se extrae como producto metabólico de hongos cultivados), la nicotina (obtenida generalmente del árbol del tabaco), la rotenona (su fuente es la raíz seca de derris), la cebadilla (a partir de semillas maduras de un lirio sudamericano), la estreptomycin (antibiótico derivado del cultivo de *Streptomyces griseus*) y los piretro y piretrinas (ésteres de los ácidos crisantémicos). En general, estos últimos son productos lipofílicos con amplio espectro de acción, pero sin efecto acaricida salvo alguna excepción, que actúan sobre el SN de los insectos, retrasando el cierre de los canales de Na⁺ dependientes de voltaje.
- **Otros insecticidas:** Aquí se pueden mencionar los ftalatos de alquilo, el benzoato de bencilo, boratos, clordimeformo, clorobencilato, cihexatin, dietiltoluamida (DEET), fluoruros, compuestos haloaromáticos de urea sustituida, metopreno y propargita, entre otros. Los piretroides también son insecticidas, compuestos sintéticos que guardan alguna semejanza con las sustancias activas del piretro (mencionados anteriormente). Algunos de ellos son sustancias estrógenos ambientales, por tanto, interfieren los procesos hormonales de animales y personas. La mayoría es poco tóxica para el hombre y otros animales de sangre caliente, por lo que su uso se ha extendido contra plagas caseras y de salud pública. Ej. permetrina, cipermetrina, alfacipermetrina, ciflutrina, bifentrina, fenvalerato, etc.

HERBICIDAS:

- **Ácidos fenoxiacéticos:** Poseen dioxinas, las cuales son sustancias extremadamente tóxicas aún en ínfimas cantidades. Ej. 2,4 -D y MCPA.
- **Bipiridilos:** Son compuestos de amonio cuaternario, muy peligrosos y tóxicos. Si son ingeridas por vía oral o son absorbidos por la dermis, producen fibrosis pulmonar irreversible. Ej. paraquat y diquat.
- **Triazínicos derivados:** Como su nombre lo indica, son compuestos herbicidas derivados de la triazina: Ej. atrazina, propazina, prometrina.
- **Pentaclorofenol (PCP):** En EE.UU. está reservado como plaguicida para la conservación de la madera únicamente, si bien sus usos en el pasado han sido múltiples: herbicida, alguicida, defoliante, germicida, fungicida y molusquicida.
- **Nitrofenólicos y nitrocesólicos:** Tienen muchos usos en la agricultura mundial, como herbicidas, acaricidas, nematicidas, ovicidas y fungicidas. La mayoría son poco solubles en agua pero si lo son en disolventes orgánicos.

OTROS PLAGUICIDAS:

- **Organobromados:** Compuesto fumigante tóxico de alto riesgo, que se absorbe por la piel y es capaz de penetrar los equipos de goma protectores de los trabajadores. El principio activo corresponde al bromuro de metilo.
- **Fosfaminas:** Fumigantes y rodenticidas. Ej. fosfuro de calcio, de magnesio, de aluminio.
- **Fenoles halogenados:** Son fungicidas y tienen propiedades cáusticas y también tóxicas sistémicas Ej. pentaclorofenato y pentaclorofenol.

- **Arsenicales:** Si bien muchos de estos productos han sido discontinuados en los EE.UU., aún pueden encontrarse en algunos otros países. En general, las arsinas (gases) conllevan el mayor riesgo tóxico seguido por los arsenitos (compuestos inorgánicos trivalentes). Los compuestos inorgánicos pentavalentes (arseniatos) son apenas menos tóxicos que los arsenitos, mientras que los compuestos orgánicos (metilados) pentavalentes representan a los insecticidas arsenicales de menor riesgo.

1.1.3 Plaguicidas OF: vías de activación y metabolización

Estos plaguicidas están representados por un gran número de compuestos que tienen propiedades químicas y físicas diferentes. Aproximadamente, 100 OF diferentes han alcanzado el estadio de producción y comercialización en las últimas 4 décadas. Los OF contienen un átomo central de fósforo con un doble enlace a un átomo de oxígeno o azufre, dos grupos (R1 y R2) conteniendo grupos o-etilos u o-metilos, y un grupo saliente que es específico de cada OF y es hidrolizado por la enzima AChE en el proceso de inactivación (Figura 1). Estos compuestos se encuentran clasificados de acuerdo a sus cadenas laterales y otros elementos unidos al átomo de fósforo.

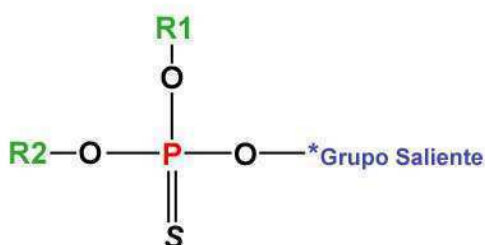


Figura 1. Estructura general de los plaguicidas OF. El doble enlace se da entre el átomo de fósforo central y un oxígeno o azufre. El grupo saliente es específico de cada OF.

El grupo saliente, a diferencia de los grupos R1 y R2, está representado por un amplio rango de estructuras que le dan variaciones de sus propiedades físico-químicas a los distintos OF. La habilidad del grupo saliente de abandonar la estructura está dada principalmente por la naturaleza de dicho grupo y de los otros grupos asociados al fósforo central.

En general, cuando se aplica un plaguicida, más del 50% se va al ambiente aire y suelo, y luego al agua por lluvias, escurrimiento y lixiviación. Se produce un depósito en la planta que es eliminado progresivamente, con mayor o menor rapidez, en función de factores tales como: la tasa de crecimiento vegetal, condiciones ambientales (viento y lluvia), las propiedades físico-químicas del plaguicida (volatilización y solubilización) y la degradación química (que puede ocurrir en el interior de la planta en el caso de los plaguicidas con poder penetrante, o en la superficie de la misma, en cuyo caso juega un papel fundamental la radiación solar [12]). La solubilidad del plaguicida es uno de los aspectos más importantes para entender el camino que puede seguir el mismo en el ambiente: en general, los plaguicidas OCl son poco solubles en agua debido a su carácter no polar, mientras que los OF son, a grandes rasgos, más solubles. Los plaguicidas en el ambiente son capaces de interactuar tanto con el componente abiótico como biótico, pudiendo modificarse de esta manera su estructura y sus propiedades físicas y/o químicas. La transformación química provoca que el plaguicida se vuelva más o menos tóxico dependiendo de su producto final, siendo el primer caso una activación mientras en el segundo se trataría de una inactivación o detoxificación (Figura 2).

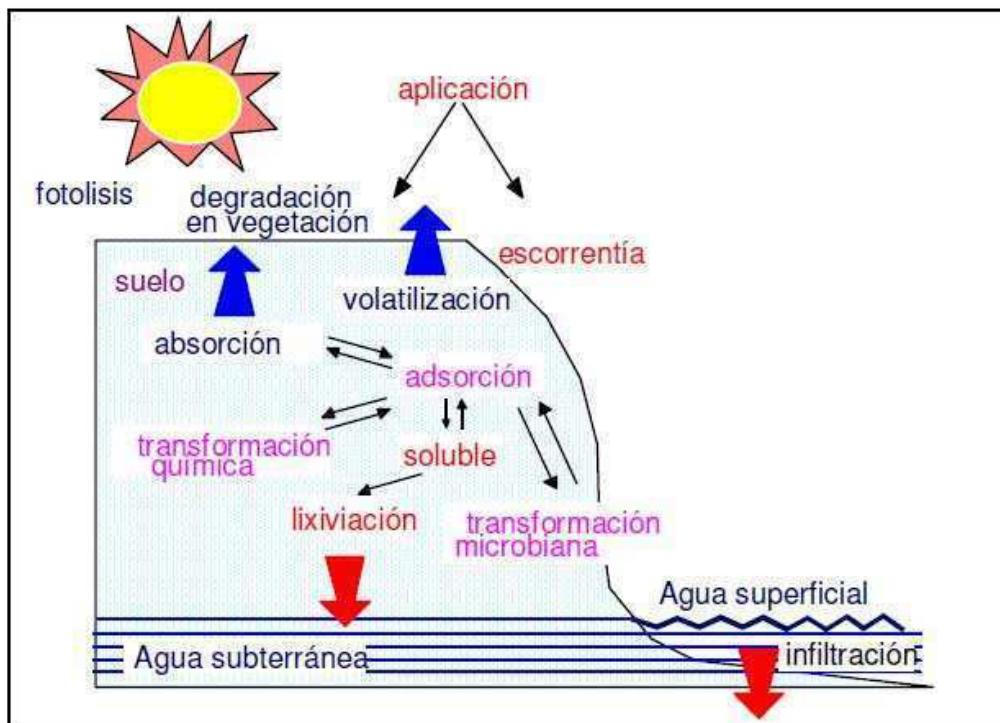


Figura 2. Principales procesos que afectan la movilidad y persistencia de los plaguicidas en la biosfera [12].

La absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) son procesos que, junto con la bioconcentración (o acumulación), forman parte de lo que se conoce como farmacocinética [10]. La biotransformación es el proceso metabólico más determinante del comportamiento del plaguicida, conduciendo a cambios en su estructura química por reacciones variadas (oxidaciones, reducciones, hidrólisis, sustituciones, eliminaciones de grupos funcionales), llegándose a obtener incluso en algunos casos CO_2 , H_2O , haluros u otros. Estas reacciones pueden ser llevadas a cabo por agentes biológicos así como por vías químicas y fotoquímicas de manera simultánea en la mayoría de los casos, por lo que la cinética de transformación es bastante compleja de determinar y no es siempre bien representada por los ensayos que pudiesen ser llevados a cabo en el laboratorio. El objetivo final de las reacciones de metabolización de los plaguicidas consiste en disminuir su capacidad de llegar en forma activa al tejido blanco así como el tiempo de permanencia en el sitio de acción. Esto se logra disminuyendo la capacidad del mismo de difundir en el organismo y aumentando su velocidad de

excreción, ambos hechos favorecidos por reacciones que incrementen la polaridad del xenobiótico (biotransformación). Este es el mecanismo más común que usan los organismos para eliminar los tóxicos ambientales, utilizando la maquinaria bioquímica presente en el organismo [11]. Existen reacciones de fase I, que son reacciones de oxidación-reducción e hidrólisis y, de fase II, que comprenden reacciones de conjugación (biotransformación propiamente dicha). Las enzimas de fase I transforman los xenobióticos (incorporando grupos hidroxilos, aminos, carboxilos, epoxi, sulfhidrilos y halógenos) en sustratos de las enzimas encargadas de catalizar las reacciones de fase II, al mismo tiempo que los vuelven más hidrofílicos debido a la incorporación de un grupo polar reactivo; aunque la mayor solubilidad al tóxico es dada por las reacciones de fase II. Las reacciones de fase I pueden dar lugar a bioactivaciones, donde los metabolitos resultantes de la biotransformación del xenobiótico absorbido son más tóxicos que la sustancia original.

Para llevar a cabo las reacciones de fase I existen enzimas capaces de introducir oxígeno proveniente del O₂ molecular, las OFM u oxigenasas de función mixta, que comprenden a las amino-oxigenasas y los citocromos P450, ambas localizadas en el retículo endoplasmático de las células. Los citocromos P450 también son capaces de exponer grupos funcionales al catalizar reacciones de desalquilación, desaminación y deshalogenación. En las reacciones de fase I también están involucradas enzimas esterasas, peroxidasas y epoxi hidrolasas, entre otras.

Por otro lado, existen en las conjugaciones de fase II dos tipos de reacciones involucradas: tipo 1) el xenobiótico reacciona con un ligando de conjugación reactivo para producir un producto de conjugación; y las tipo 2) donde el sustrato primero es activado para luego combinarse con el ligando de conjugación y dar el producto de la reacción. Algunas de las enzimas involucradas en estas reacciones de fase II se mencionan a continuación:

- La familia de enzimas citosólicas GST (sólo un 5% se encuentra en el retículo endoplasmático) reaccionan con grupos epóxidos, haloalcanos (o haluros de alquilo), nitroalcanos, alcanos, derivados de metil sulfóxidos y compuestos halo y nitro-aromáticos. El GSH es

un tripéptido Glu-Gli-Cis. La GST se encuentra en células de diversos tejidos. Esta glutathionización consiste en la adición de glutatión (GSH), a través de su grupo sulfhidrilo (nucleofílico), con un carbón electrofílico del xenobiótico.

- Las enzimas UDP glucuronil-transferasas, presentes en el retículo endoplasmático, transfieren un grupo glucuronil en un grupo hidroxilo, amino o sulfhidrilo del tóxico desde el ácido UDP glucurónico. Esta reacción es conocida como una glucuronidación y los compuestos glucuronidados son muy solubles en agua.
- Las sulfotransferasas son enzimas solubles que transfieren un grupo sulfato de PAPS (3'-fosfoadenosil-5'-fosfosulfato) a un grupo hidroxilo o amino en el xenobiótico. Esta reacción se conoce como de sulfatación y el producto es un sulfato orgánico ionizado, muy soluble en agua.

Los plaguicidas OF son fácilmente hidrolizables, ya sea por vías enzimáticas como independiente de la acción de enzimas, aumentando su estabilidad frente a la reacción según la naturaleza de los enlaces en el siguiente orden: anhídrido o halogenuro, alcohoxi y amido, oxifosfatos, tiofosfatos y fosfonatos. Los tiofosfatos son más estables que los oxifosfatos debido a la mayor electroafinidad del átomo de oxígeno. La oxidación de tiofosfatos en oxifosfatos incrementa la toxicidad. También se producen reacciones fotoinducidas espontáneas como es la oxidación de grupos mercapto a sulfóxidos y sulfonas. Además, la radiación ultravioleta es capaz de producir isomerizaciones de los ésteres fosfóricos para dar derivados más tóxicos. Los fosforoamidatos producen compuestos muy tóxicos al oxidarse. Otra forma de degradación de algunos compuestos de fósforo es la deshidrohalogenación. Debido a la susceptibilidad de los OF a ser degradados (la velocidad de degradación de estos compuestos es muy variable), estos son compuestos no persistentes en el medio ambiente y en sistemas biológicos.

1.1.4 Efecto de los plaguicidas OF y Carbamatos sobre la actividad específica de AChE

Los plaguicidas OF y los ésteres de carbamatos comparten el mecanismo de acción, atribuido principalmente a su capacidad de inhibir la enzima AChE. Esta enzima, una serina hidrolasa, reacciona químicamente con el plaguicida inactivándose, y como consecuencia se detiene la hidrólisis del neurotransmisor ACh, lo que resulta en una acumulación del mismo en el espacio sináptico o en la unión neuromuscular. Esta acumulación provoca una sobreestimulación y posterior desensibilización de los receptores nicotínicos y muscarínicos, AChR. Como consecuencia, altas concentraciones de ACh en el SNC causan alteraciones motoras, sensoriales, de comportamiento e incoordinación, y posteriormente depresión de la función motora y respiratoria, causando la muerte por envenenamiento por OF en los seres humanos.

1.1.4.1 Acetilcolina y acetilcolinesterasa

Los impulsos nerviosos se comunican entre las neuronas gracias a moléculas difusibles llamadas neurotransmisores, entre los cuales se encuentra la ACh. A esta se la conoce como neurotransmisor colinérgico ya que deriva de la colina. Su síntesis se produce a partir de una molécula de acetil coenzima-A y una molécula de colina, reacción que es catalizada por la enzima colina-acetiltransferasa (Figura 3).

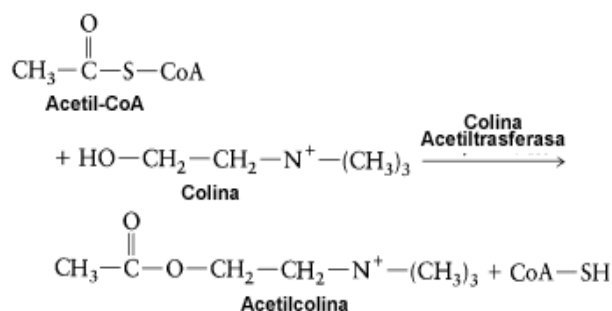


Figura 3. Síntesis del neurotransmisor ACh [13].

La incorporación de ACh desde el citosol a las vesículas es realizada por un antiporte H^+ /ACh (Figura 4). Este antiporte está codificado en el primer intrón del gen de la enzima colina-acetiltransferasa lo que aseguraría un mecanismo altamente coordinado de expresión de ambas proteínas.

En el proceso de sinapsis química, es de fundamental importancia la recaptación de los neurotransmisores mediante la remoción de los mismos de los espacios sinápticos. Luego de ser liberada a la hendidura sináptica, la ACh es hidrolizada a acetato y colina, reacción mediada por la AChE que se encuentra en la hendidura en altas concentraciones. La colina producida por la hidrólisis es transportada nuevamente a la terminal nerviosa presináptica por un simporte Na^+ /colina para ser nuevamente utilizada en la síntesis del neurotransmisor.

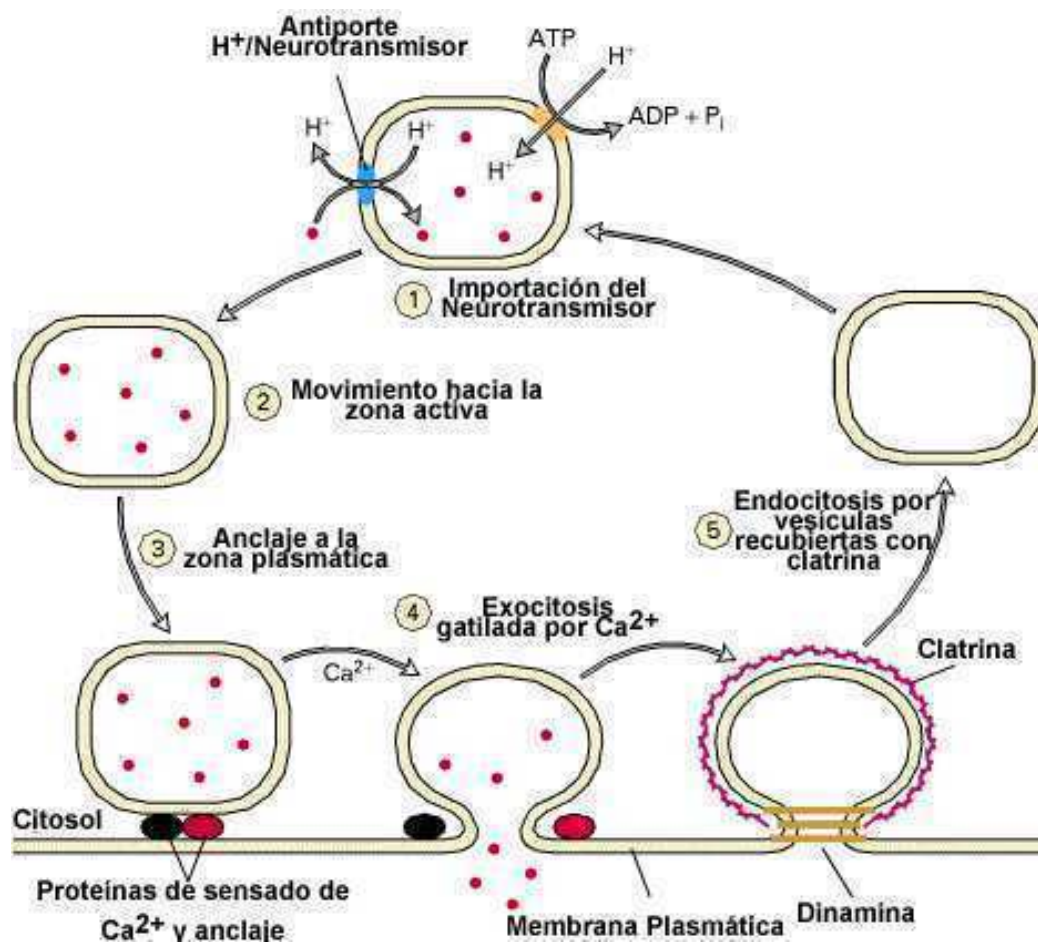


Figura 4. Mecanismo de incorporación de ACh en las vesículas de la neurona presináptica y su posterior liberación al espacio interneurona, o sináptico [13].

Las membranas pre y postsinápticas están separadas entre sí por un espacio de unos 50 nm y en el axón presináptico se sitúan vesículas sinápticas, las cuales contienen aproximadamente 10^4 moléculas de colina cada una. El impulso nervioso promueve la liberación de aproximadamente 300 vesículas lo que eleva la concentración de ACh de 10 nM a 500 μ M en menos de un milisegundo. Esta liberación es mediada por el Ca^{2+} el cual ingresa al interior de la neurona a través de canales dependientes de voltaje. La unión del neurotransmisor con su receptor en la membrana postsináptica promueve un cambio en su permeabilidad iónica para el ingreso de Na^+ y la salida de K^+ , lo que desencadena un potencial de acción [14](Figura 5).

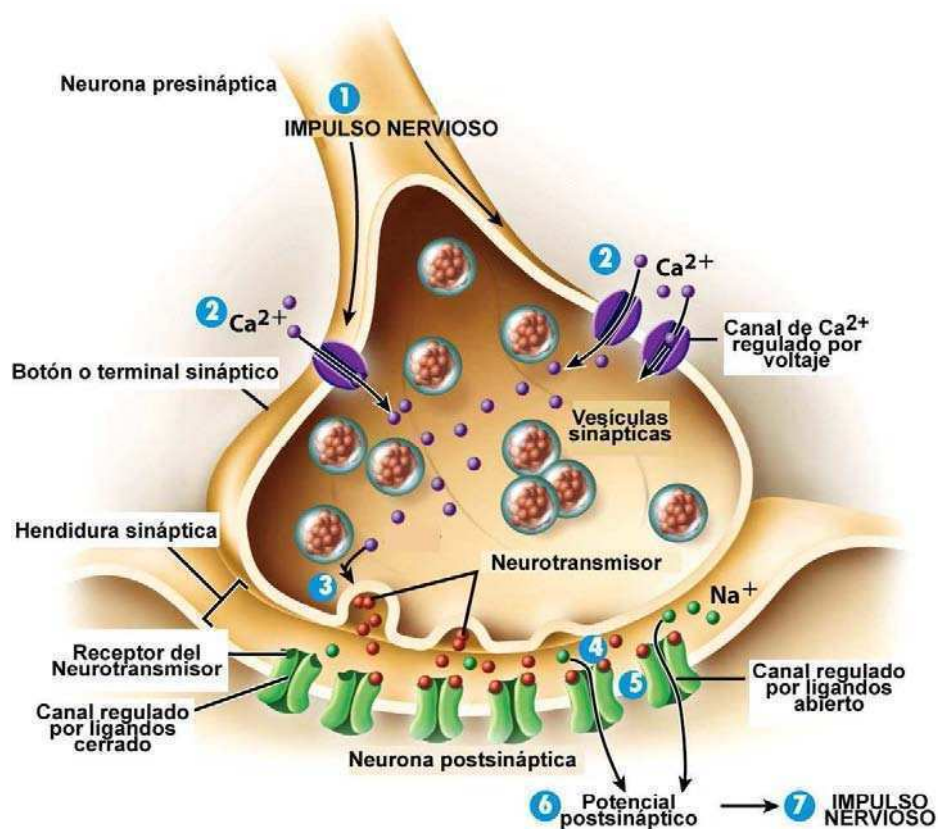


Figure 12-17 Principles of Anatomy and Physiology, 11/e
© 2006 John Wiley & Sons

Figura 5. Esquema representando los pasos que ocurren en el impulso nervioso entre una neurona pre y postsináptica [15].

Como se mencionó anteriormente, la AChE pertenece a una familia de enzimas colinesterásicas, las cuales son esterasas tipo B capaces de hidrolizar ésteres de colina (hidrolasa de serina), tales como la ACh. Su proceso catalítico implica acilación y desacilación en un residuo de serina de la triada catalítica en el centro activo de la enzima, el cual está localizado dentro de una cavidad estrecha y con unos 20 nm de profundidad o garganta, rodeada por 14 residuos de aminoácidos aromáticos, que pueden ser importantes para guiar al sustrato hacia el centro activo. Los aminoácidos componentes de la tríada catalítica son una serina (Ser 200), una histidina (His 440) y un glutamato (Glu 327) [16].

Las colinesterasas de vertebrados se clasifican en dos grupos, codificados por dos genes diferentes: la AChE y la BChE. La primera es menos activa sobre la butirilcolina (BCh) pero hidroliza a la ACh mucho más rápido que a otros ésteres de colina. La BChE hidroliza tanto a la ACh como a la BCh. Ambas enzimas son glicoproteínas que pueden estar unidas a membrana plasmática o libres en el espacio extracelular, y su heterogeneidad está dada por varias isoformas de cada enzima que pueden distinguirse por el número de subunidades catalíticas, las características de solubilidad y las propiedades hidrodinámicas. La AChE es predominante en músculo y en el SN, en donde los niveles de BChE son menores. La BChE es sintetizada en el hígado y luego secretada al plasma sanguíneo.

1.1.4.2 Receptores de neurotransmisores del SNA

Todas las actividades comandadas por el SNA en tejidos y órganos del cuerpo humano, incluyendo la contracción y relajación del músculo liso, alteraciones en la actividad del miocardio y control de la secreción glandular, son llevadas a cabo por 3 moléculas: adrenalina, noradrenalina y ACh. Estas moléculas son capaces de tener efectos estimulantes e inhibitorios, dependiendo de su blanco de acción. Esto es llevado a cabo principalmente por la presencia de distintos receptores de membrana capaces de unir específicamente dichas moléculas y gatillar así determinadas cascadas de señalización a partir de segundos mensajeros.

Respecto de la ACh, ésta es capaz de unir dos tipos de receptores colinérgicos, conocidos como receptores nicotínicos y muscarínicos. Inicialmente la clasificación de los receptores en el SN se basó en la actividad farmacológica de dos alcaloides: la nicotina y la muscarina. Esta clasificación ocurrió mucho antes que se estudiaran las estructuras moleculares de dichos compuestos, pero posteriormente se pudo saber que no todos los receptores nicotínicos eran iguales. Al igual que los receptores nicotínicos, los receptores muscarínicos difieren en su estructura y afinidad de unión con sus agonistas y antagonistas.

- Receptores nicotínicos : (Figura 6 der.) se encuentran en los cuerpos celulares de todas las neuronas postganglionares, tanto del sistema simpático como del sistema parasimpático, en los ganglios del SNA y en el músculo esquelético. La ACh, que es liberada por las neuronas preganglionares, une estos receptores nicotínicos y causa un rápido incremento en el flujo de Na^+ y Ca^{2+} , promoviendo así la despolarización de las neuronas postganglionares. En el SNC existen al menos 8 subunidades α y 3 subunidades β diferentes, componentes de los receptores nicotínicos. Las distintas combinaciones son las que proveen la especificidad de unión con sus agonistas.
- Receptores muscarínicos: (Figura 6 izq.) son responsables de la neurotransmisión postganglionar del SNA parasimpático. Se encuentran en las membranas plasmáticas de los tejidos y están ligados a la activación de la proteína G y sistemas de segundos mensajeros que llevan la señal para generar respuestas intracelulares. Estos últimos pueden tener efectos tanto excitatorios como inhibitorios dependiendo del tejido blanco. Se han clonado 5 genes diferentes, m1 a m5. Los subtipos difieren en la capacidad de unir distintas proteínas G y por lo tanto gatillar diferentes cascadas de señalización intracelular [17].

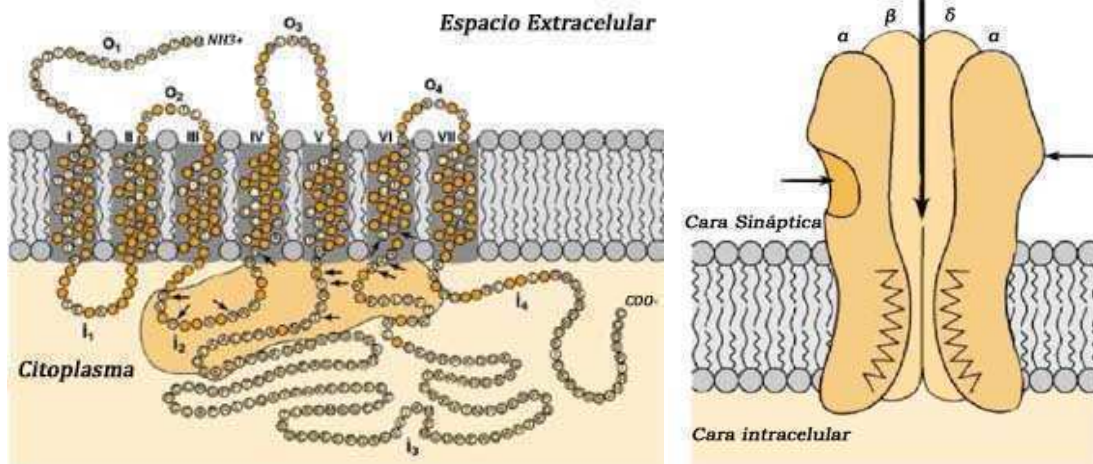


Figura 6. Izq. Predicción de la estructura de un receptor muscarínico M1, en naranja los aminoácidos compartidos por los tipos M1 a M4. Der. Vista longitudinal de la estructura propuesta de un receptor nicotínico. Las subunidades α , β y δ rodean un canal interno que atraviesa la bicapa lipídica.

En los OF de alta actividad insecticida, el grupo saliente es un grupo electronegativo que tiene una asociación lábil con el átomo central. Este hecho permite que el mismo se separe de la estructura del OF y de este modo el fósforo central pueda reaccionar químicamente con el sitio activo de la enzima AChE. El mecanismo involucrado es similar al que ocurre en la acetilación de la enzima durante la hidrólisis de la ACh previamente mencionado, pero a diferencia de ésta, la enzima fosforilada tiene alta estabilidad. En detalle, por fosforilación de los OF a la serina de la triada catalítica situada en el sitio activo de la AChE [18, 19] se forma un complejo enzima-inhibidor que bloquea a la AChE pero ésta, a diferencia de lo que ocurre con su unión a la ACh, hidroliza lentamente al complejo debido a la elevada estabilidad del mismo. De este modo, los OF son mejores sustratos de la AChE que los sustratos naturales de la misma [20]. A su vez, las Gly118, 119 y Ala201 [21] pueden establecer puentes de hidrógeno que aumentan aún más la estabilidad del complejo. Así, el grupo serina hidroxilo bloqueado por el OF no puede continuar su acción en la hidrólisis del neurotransmisor. Posteriormente, la hidrólisis de los grupos R1 y R2 provoca el fenómeno de envejecimiento de la enzima fosforilada que determina la irreversibilidad de la inhibición, o sea, la inactivación de la AChE debido a un incremento en la estabilidad del complejo

enzima-OF (Figura 7). El único modo de recuperación de la actividad de AChE es por la síntesis *de novo* de la proteína catalítica, lo que implica un mecanismo a largo plazo.

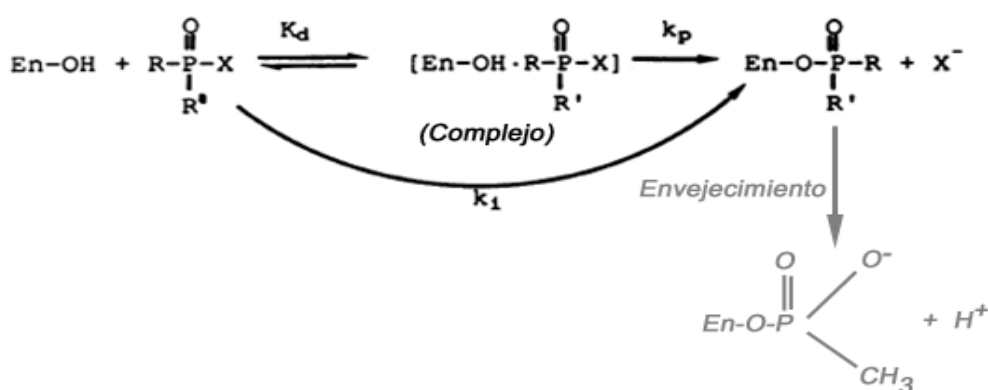


Figura 7. Reacción de inhibición y envejecimiento de la AChE. La reacción de inhibición tiene lugar en un proceso de dos etapas. **En-OH** representa la AChE con el grupo **-OH** enfatizado. K_d es la constante de disociación entre la enzima y el complejo inhibidor, K_p es la constante de fosforilación y K_i corresponde a K_p/K_d . Se destaca la reacción de “envejecimiento” que imposibilita la reactivación enzimática.

Los OF con grupos P=S son generalmente pobres anticolinesterásicos, sin embargo todos ellos son potentes insecticidas. La baja capacidad de los ésteres P=S de inhibir *per se* a la AChE es debido a que tienen baja reactividad, atribuida en parte a que dicha unión está polarizada respecto de la unión P=O, debido a la menor electronegatividad del azufre respecto del oxígeno. El hecho que en el enlace P=O el dipolo que se genera es mayor respecto del dipolo en el enlace P=S, provoca que el primero sea más susceptible al ataque de agentes nucleofílicos, entre ellos, el grupo serina hidroxilo de la enzima AChE. Por lo tanto, los OF que poseen el enlace P=S son menos reactivos y más estables para la degradación hidrolítica que el correspondiente éster P=O.

¿Qué sucede entonces con la capacidad insecticida de los OF que poseen el enlace P=S? Investigaciones en el metabolismo y modo de acción han revelado que

la toxicidad de los ésteres P=S es debida a la desulfuración oxidativa al P=O correspondiente. En el organismo, esta reacción se encuentra catalizada por las OFM, en tanto que en el ambiente ocurre bajo la influencia del oxígeno y la luz.

Los carbamatos, por su parte, dan lugar a una enzima carbamylada que es más estable que la enzima acilada, tomando minutos en vez de milisegundos para re-hidrolizarse. Los ésteres organofosfatos son verdaderos hemi-sustratos que por fosforilación en un residuo de serina, presente en el sitio activo de la enzima, forman una configuración tetrahédrica que simula el estado de transición formado durante la hidrólisis de la ACh. Si los grupos alquilos del OF son metilos o etilos, la regeneración espontánea podría requerir horas, e incluso más tiempo [22]. Esto implica el cese de la estimulación por ACh en la membrana postsináptica una vez que la señal nerviosa ha sido transmitida, como producto de la desensibilización de los receptores. A diferencia de los plaguicidas OF, los carbamatos se unen de manera reversible, por lo cual la inhibición es transitoria. O sea, el complejo carbamato-enzima, a diferencia de lo que ocurre con el complejo OF-enzima, no es susceptible de sufrir envejecimiento. Aún así, la inhibición provoca la acumulación de ACh en las sinapsis nerviosas y la consecuente disrupción de la función nerviosa. En la figura 8 se pueden observar las reacciones correspondientes a la función esterásica de la AChE con su sustrato fisiológico, la ACh, el modo de acción del carbaril como ejemplo de carbamato y el del Clp como ejemplo de un plaguicida OF al unir el sitio activo de la enzima AChE.

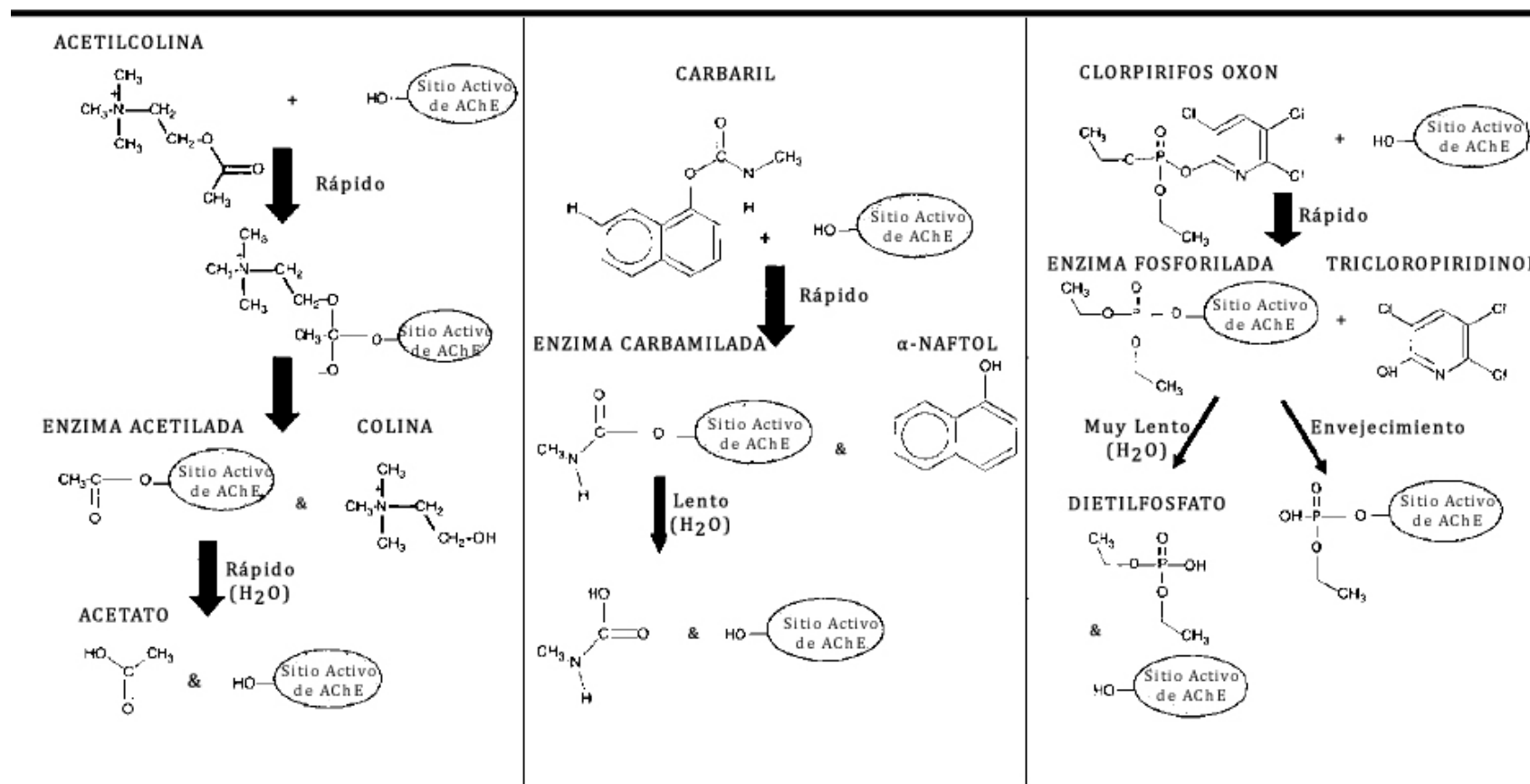


Figura 8. Ilustración esquemática de la interacción de la ACh, el carbamato carbaril y del Clp oxón con el sitio activo de la enzima AChE [23].

1.1.5 Clorpirifos (0,0-dietil 0- (3,5,5-tricloro-2-piridil fosforotioato)

La nomenclatura IUPAC del Clp es la siguiente: 0,0-dietil 0-3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotioato. Su fórmula molecular es $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$, y su masa molecular 350,6. Su estructura química es presentada en la figura 9. Tiene un aspecto de cristales blancos en estado sólido, con una evaporación despreciable a 20°C pero puede alcanzar un estado de pulverización considerable cuando se manipula en forma de polvo. Su punto de fusión es 42-44°C con una solubilidad en agua de 0,39 mg/l a 19,5°C [24].

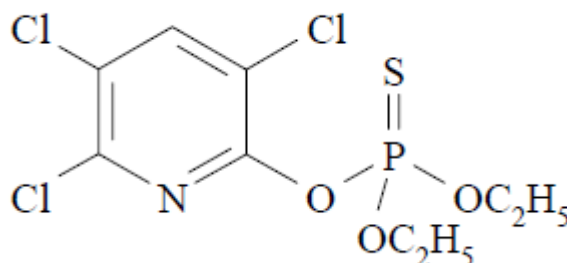


Figura 9. Estructura química del OF Clp.

Es un plaguicida OF que ha sido comercializado desde los años sesenta y uno de los más utilizados ya que es efectivo contra una amplia gama de insectos nocivos para los cultivos. Los nombres comerciales con los que se encuentra el Clp son Dursban y Lorsban, entre otros. Es principalmente producido desde el año 1.966 por la multinacional Dow Elanco antes conocida como Dow Chemical Co. En la figura 10 se puede observar que el uso de dicho plaguicida se encuentra dentro de los principios activos de mayor utilización en la región del Alto Valle de las provincias de Río Negro y Neuquén según un trabajo multicéntrico elaborado por investigadores del LIBIQUIMA [8] y con datos aportados por un consultor privado de la cámara de distribuidores de agroquímicos del Alto Valle. El Clp es utilizado en agricultura en cultivos de maíz, alfalfa y algodón, pero también existe un amplio uso doméstico (aproximadamente un 17% de acuerdo al *Journal of Pesticide Reform* para los EE.UU.). Durante 1.997 se reportó el uso de 100.000 kgs del OF Clp en 50 cultivos distintos, entre ellos el cultivo de manzanas.

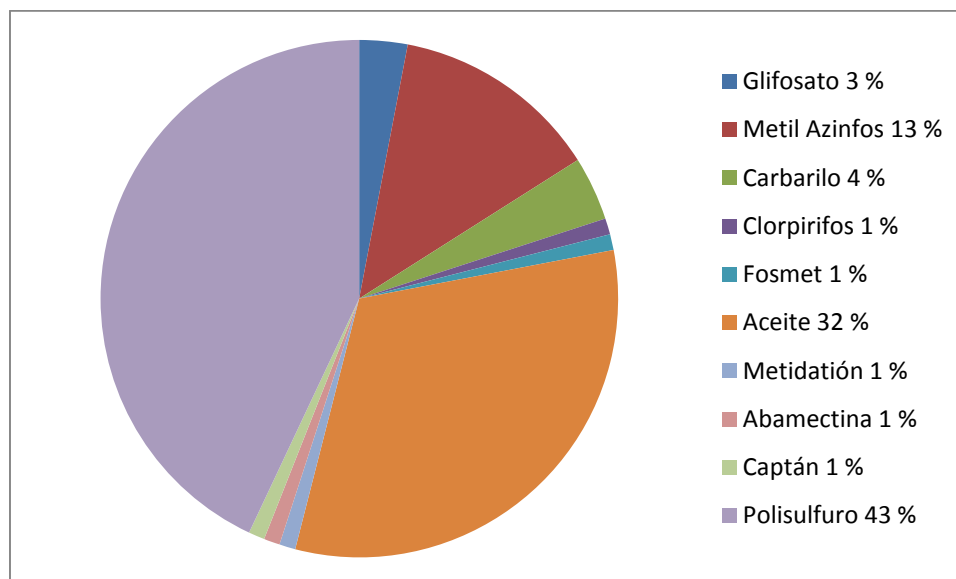


Figura 10. Principios activos de los plaguicidas más utilizados en la zona productiva de Río Negro y Neuquén, año 2004 [8].

La EPA, en su cuadernillo sobre el Clp, ha publicado los valores estimados de concentración del OF que pueden ser encontrados en aguas superficiales y subterráneas. Estiman para aguas superficiales un valor de concentración 0,026-0,4 $\mu\text{g/l}$ y para subterráneas de 0,007-0,103 $\mu\text{g/l}$. Respecto de los efectos no deseados del Clp, la EPA en el mismo informe publica un valor de NOAEL de 10 mg/l para mamíferos y una CL_{50} para organismos acuáticos de 1,8-595 $\mu\text{g/l}$ con una NOAEC reproductiva de 0,57 $\mu\text{g/l}$ [25].

Está clasificado como un plaguicida de clase II, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), moderadamente peligroso, pero es la principal fuente de envenenamiento agudo en EE.UU. de acuerdo a la EPA. Los efectos de la exposición crónica al Clp se encuentran actualmente en estudio dando lugar a un amplio debate, llegando incluso algunas agencias de protección a considerar que la exposición crónica puede conllevar a los efectos producidos por una exposición aguda. Incluso, hacia 1.997 la EPA implementó un programa de reducción de riesgo para el Clp, el cual incluye una serie de restricciones para su uso doméstico. El mismo fue llevado a cabo con el apoyo de las manufactureras, las cuales se comprometieron a eliminar los concentrados del plaguicida que deban ser

mezclados o diluidos, en un intento por disminuir los casos de intoxicación doméstica, sobre todo en niños.

1.1.5.1 El Clp como agente anticolinérgico

Como se mencionó previamente, y debido que el átomo central de fósforo en la molécula de Clp es un doble enlace P=S, su toxicidad está asociada al P=O producto de la activación metabólica. En los humanos, esta reacción ocurre en el hígado, a través de la OFM, dando como producto un potente inhibidor de la AChE, el Clp-oxón (Figura 11). Este es un ejemplo de una bioactivación gracias a la metabolización (desulfuración del fosforotionato) del xenobiótico en una reacción de fase I catalizada por una OFM, CYP450, fundamentalmente en el hígado. Esta toxicidad incrementada se da debido a que el oxón posee una mayor afinidad y capacidad para fosforilar el grupo serina hidroxilo del sitio activo de la AChE que su precursor. Otra reacción metabólica de importancia se da por hidrólisis del OF, dando lugar a los metabolitos 3,5,6-tricloro-2- piridinol (TCP) y dietiltiofosfato a partir de Clp o Clp-oxón. Esto da como resultado compuestos de baja toxicidad ya que ninguno de los productos es capaz de inhibir la actividad de la AChE. Esta reacción de desarilación oxidativa representa una vía de detoxificación mediada por una enzima hepática CYP450 cuando ocurre a partir del Clp, y una esterasa tipo A (PON-1) o tipo B cuando ocurre a partir de una molécula del Clp oxón [23].

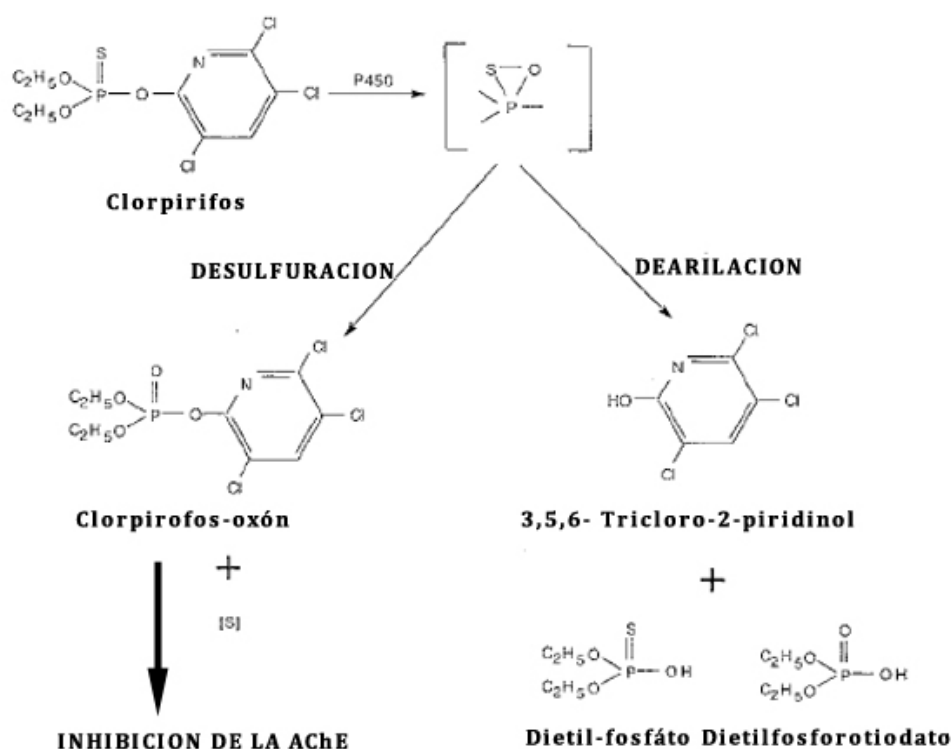


Figura 11. Esquema de la metabolización del Clp y sus metabolitos principales: Clp-oxon, tricloropiridinol (y sus conjugados), dietilfosfato y dietilpirofosfato [23].

1.1.5.2 Efectos no colinérgicos de los OF: antecedentes ante la exposición al Clp

Existen numerosas evidencias que denotan efectos no colinérgicos del Clp y el Clp oxón. Esto se ha venido estudiando en los últimos años debido que no era posible explicar las manifestaciones toxicológicas asociadas con la exposición al OF mediante una inhibición de la AChE. Se ha reportado que tanto el Clp como su metabolito activo, interactúan con algunos de los receptores muscarínicos M2/M4 de la ACh [26], unen y desensibilizan a los receptores nicotínicos [27], interfieren con el estatus de fosforilación de las proteínas, afectan la función inmune, y alteran las funciones cognitivas, reproductivas, el desarrollo y los sistemas sensoriales [28]. Entre los mecanismos de respuesta celular a tóxicos de mayor interés en la actualidad se encuentran la traducción de señales, su regulación *downstream* a través de las cascadas de fosforilación- defosforilación [29], y la regulación de la expresión de genes de estrés por FT [30]. En estos hechos se apoyó la decisión de

la EPA en el año 2.000 para restringir algunos usos agrícolas y domésticos de este plaguicida. Bomser y Casida en el año 2.000 [29] publicaron resultados que demostraban que el Clp oxón activa a las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK 44/42) en células CHOK1, presumiblemente mediante la inhibición de la diacilglicerol (DAG) lipasa, la cual ya ha demostrado ser sensible a la inhibición por muchos OF [31]. Otros estudios han demostrado que el Clp inhibe la proliferación y diferenciación neuronal [32, 33]. El grupo de Schuh y colaboradores [34], basándose en el hecho que la exposición a bajas concentraciones de Clp tiene un efecto neurotóxico para el desarrollo y que el mismo no es mediado por la inhibición de la AChE (ya que agonistas de sus receptores no han podido revertir sus efectos [32, 35]), decidió investigar las posibles vías de señalización que pudiesen estar afectadas por la exposición. Ellos demostraron que la inhibición en la síntesis de AMPc, producto de la exposición al OF reportado por otros autores, [36, 37], llevaba a un incremento de hasta 4 veces en la fosforilación de la proteína CREB (crítica en la supervivencia celular y la diferenciación durante el desarrollo del cerebro) de unión al sitio CRE del ADN, en células neuronales corticales y del hipocampo, pero no en cultivo de astrocitos.

La EPA define a los disruptores endocrinos como “agentes exógenos que interfieren con la síntesis, secreción, transporte, unión, acción o eliminación de las hormonas naturales responsables del metabolismo, la reproducción, el desarrollo y el comportamiento”. Se ha señalado que los OCl y OF (incluido el Clp, *U.S. EPA Endocrine Disruptor Screening Program*) son posibles disruptores endocrinos [38], incluso se ha demostrado que el Clp en particular altera la biosíntesis de GnRH en células hipotalámicas GT1-7, sugiriendo que podrían tener efectos disruptivos sobre las neuronas productoras de GnRH *in vivo* [39]. Algunos insecticidas pueden actuar a través de la unión a receptores, como el Aryl hydrocarbon Receptor (AhR), generando además una respuesta de estrés oxidativo [40]. La activación y la detoxificación de muchos tóxicos se encuentra altamente controlada por una batería de genes enzimáticos inducidos por la vía de AhR, entre los cuales encontramos los correspondientes a CYP1A, DT-diaforasa, GST y UDP-GT. La alteración de estos componentes colaboran con mecanismos de resistencia, innata y adquirida, en vertebrados. Entre los ligandos exógenos del AhR encontramos a

los PCBs (policlorinados bifenilos), TCDDs (tetraclorodibenzodioxinas) y algunos TCDFs (tetraclorodibenzofuranos). Una vez llevada a cabo la unión, el complejo ligando/AhR trasloca del citosol al núcleo, dimeriza con el ARNT-translocador nuclear del receptor Ah y se une a los elementos de respuesta a xenobióticos (XRE) que se encuentran río arriba de los genes regulados por AhR, iniciándose así la transcripción [41]. Grünfeld y Bonefeld-Jorgensen, en su trabajo publicado en el 2.004 [42], han demostrado el efecto de algunos plaguicidas OCl y OF, entre ellos el Clp, sobre los niveles de ARNm de los receptores α y β estrogénicos. Por otro lado, los receptores de serotonina (5HT), señal neurotrópica durante el desarrollo del cerebro, son afectados por el Clp, como así también el transportador presináptico de 5HT y la vía de señalización mediada por la misma durante la etapa gestacional de ratas [43]. Las vías de proteínas quinasas activadas por estrés también se ven afectadas por xenobióticos (e.g. dioxina), pudiendo alterar “decisiones” celulares a través de p53 y ERK/ JNK en cuanto al balance entre proliferación celular y apoptosis [44]. La alteración de vías de señalización pueden afectar a su vez la actividad de diversos FT en sus sitios de unión a ADN, como c-Jun y c-Fos en AP-1 sobre TRE [45, 46], *Specific Protein-1* en Sp-1-RE [47], c-Myc en cMyc-RE [48], CRE, retinoic acid RE, y T3-RE [30], donde RE corresponde al elemento de respuesta en el ADN. Si bien parte de los trabajos publicados describen efectos de plaguicidas OF como el Clp, la mayoría se basan en biocidas OCl, dioxinas e hidrocarburos aromáticos policíclicos.

1.1.5.2.1 *El factor de transcripción AP-1 y sus componentes*

AP-1 es un FT dimérico que contiene los miembros de las familias de protooncogenes c-Jun y/o c-Fos (Figura 12), ATF y MAF [49]. Todos los integrantes de las familias de estos genes de respuesta temprana dan como resultado, al homo- o heterodimerizar, a AP-1 (exceptuando a c-Fos que no homodimeriza). Los miembros las familias componentes de AP-1 contienen los dominios conservados: TAD: dominio de transactivación; DBD: Dominio de unión al ADN; BR: Región básica de unión al ADN; LZ: Cierre de leucinas.

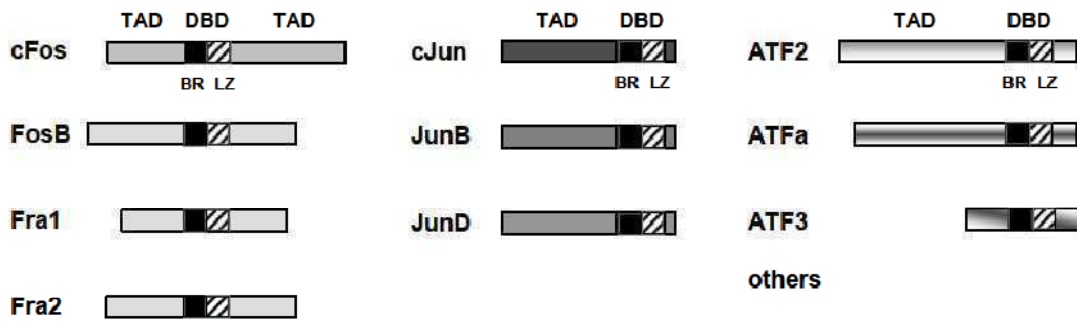


Figura 12. El FT AP-1 está compuesto por homodímeros o heterodímeros de los miembros de las familias de c-Fos, c-Jun y ATF [50].

Las variantes más comunes del FT se componen formando, a través de sus dominios de cierre de leucinas, ya sea el homodímero c-Jun/c-Jun o el heterodímero c-Jun/c-Fos (siendo el primero menos estable en la unión al ADN que el segundo), y homodímeros ATF o heterodímeros ATF/c-Jun. La figura 13 resume las variantes de AP-1 con sus correspondientes secuencias de reconocimiento en el ADN. Los distintos dímeros se unen preferentemente a elementos de respuestas tales como elementos de respuesta a AMPc (CRE) (para los componentes ATF), elementos de reconocimiento a MAF (MAREs) y el elemento de respuesta a antioxidantes (AREs). El principal elemento de respuesta en el ADN es el elemento de respuesta a TPA (TRE) para los homodímeros de c-Jun o heterodímeros c-Jun/c-Fos. C-Jun/ATF y ATF-c/Fos por su lado, son capaces de unir el sitio CRE.

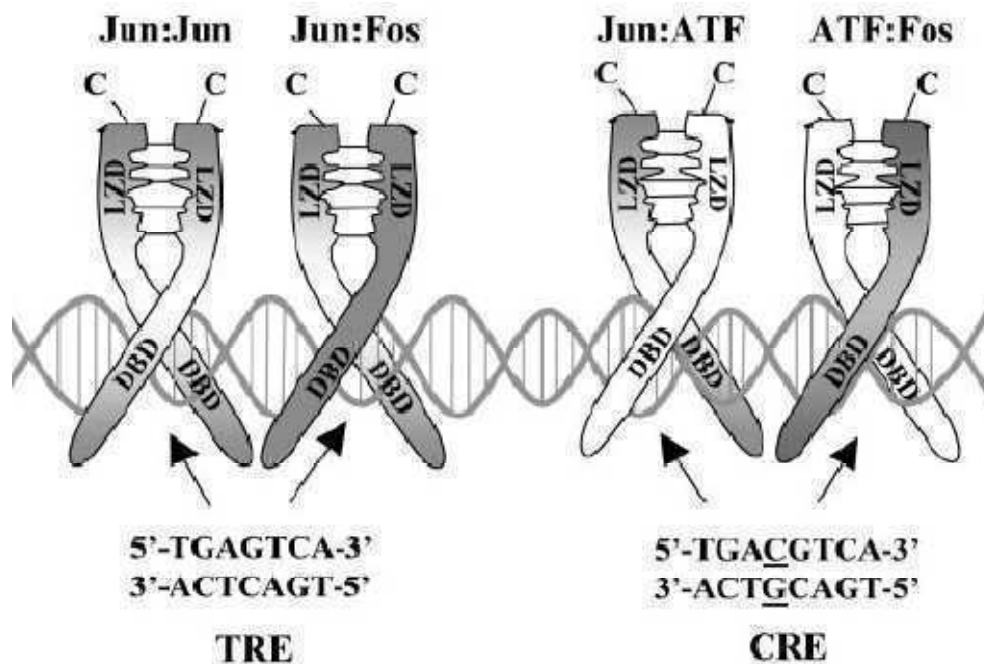


Figura 13. El dominio de cierre de leucinas (LZD) media la dimerización de las proteínas, acercando los dominios de unión al ADN (DBD) y facilitando la interacción de las proteínas con el mismo [51]. ATF: Factor activador de la transcripción; TRE: Elemento de respuesta al 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA); CRE: Elemento de respuesta al AMPc.

Los estados de fosforilación (activación) de los distintos componentes de AP-1 se encuentran bajo un estricto control por las vías de señalización (MAPK), así como también por el tipo de estímulo externo que recibe la célula. Los miembros de la familia JNK son los encargados de fosforilar a la proteína c-Jun y JunD en sus dominios TAD (de transactivación), siendo más efectiva la fosforilación de c-Jun que la de JunD. JunB, por su parte, no es fosforilado por JNK porque carece del sitio conservado de fosforilación [52]. Por otra parte, ERK participa en la fosforilación de todos los miembros de la familia de proteínas c-Fos en sus dominios TAD, lo que estabiliza a este último por algunas horas evitando su degradación (en general posee una vida media de 10 minutos) [50] (Figura 14).

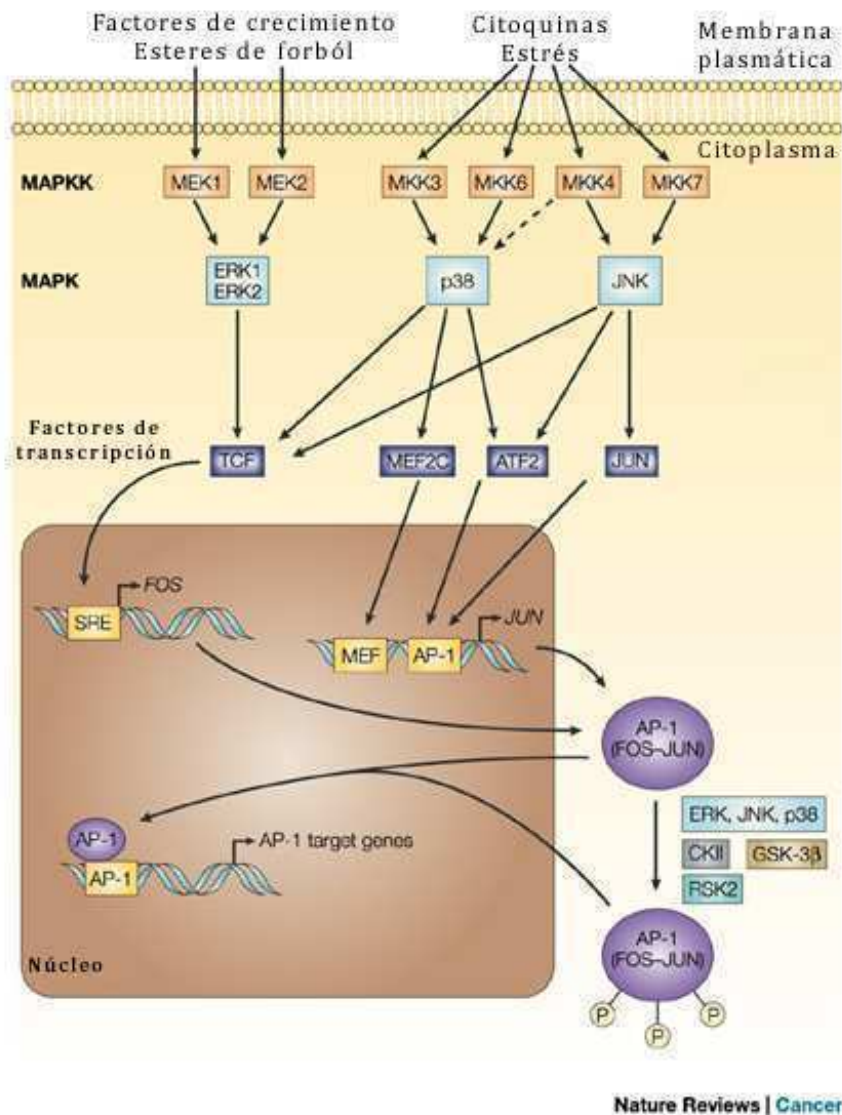


Figura 14. Vía de traducción de señales que converge en la activación del FT AP-1 y su unión al ADN [49]. Las MAPKK son activadas por fosforilación por sus correspondientes MAPKKK (no se muestran en el esquema).

Una característica interesante es que la transcripción de los componentes de FT AP-1 se encuentra auto-regulada negativa o positivamente. La figura 15 nos muestra los genes que codifican para los miembros c-Fos y c-Jun murinos. Se puede observar que dichos genes poseen secuencias consenso de interacción con el ADN, dimerización y anclado para JNK y ERK 1/2 (en el caso del gen *c-jun*) y ERK (en el caso del gen *c-fos*) que se encuentran altamente conservadas.

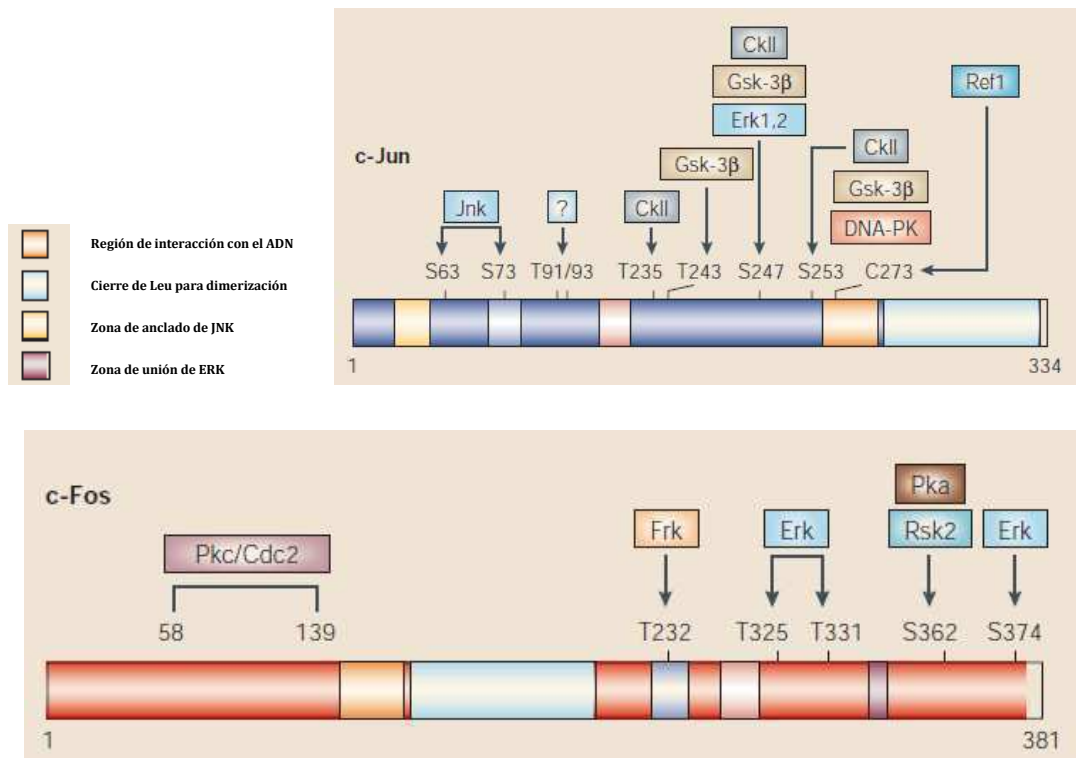


Figura 15. Genes correspondientes a *c-fos* y *c-jun* murinos [49].

La transcripción de *c-jun* está regulada por el propio AP-1 (ATF/c-Jun) ya que contiene un sitio TRE en su región promotora; en cambio, la regulación transcripcional de *c-fra* está dada por la unión del FT AP-1 (c-Jun/c-Fos) a su región promotora (Figura 16A). El gen de *c-jun* también contiene una región para ERK por lo que permite que su transcripción sea regulada por las dos vías de las MAPKs. La regulación de *c-fos* es similar en mamíferos y en anfibios, donde su región promotora contiene los sitios TRE, CRE (Elemento de respuesta a AMPc o Ca²⁺) y SRE [53] (Figura 16B).

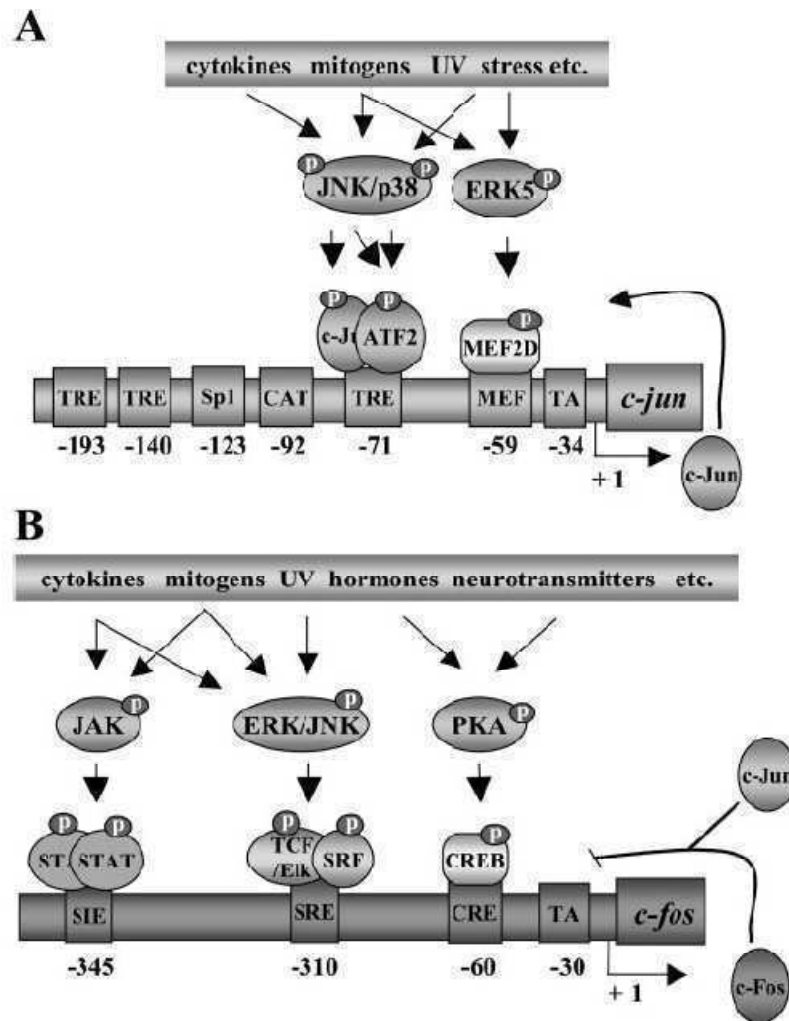


Figura 16. Regulación transcripcional de los miembros de AP-1: c-Jun (A) y c-Fos (B), con las señales extracelulares que activan vías intracelulares de señalización para la activación del promotor de la transcripción en los genes correspondientes.

La proteína c-Jun, según la base de datos del NCBI (NIH, número de acceso NP_001079363), posee 312 aminoácidos en *X. laevis*, lo que permite estimar un PM de 34,4KDa. En cuanto a la proteína c-Fos, se ha documentado que se han detectado mediante ensayos de *Western blot*, productos de distintos PM (56-72 KDa) [54], debido a extensas modificaciones post-transcripcionales que sufre su ARNm, donde la isoforma de 60 KDa, presente en los seres humanos, también ha sido detectada en anfibios con una elevada homología de secuencia [53].

La vía de traducción de señales que activa al FT AP-1 para su unión con el ADN puede estar afectada debido a la exposición a plaguicidas a través de la alteración en los niveles de sus componentes c-Jun y/o c-Fos [45, 46]. Se ha

demostrado que AP-1/c-Jun es requerida para el desarrollo temprano de *X. laevis* [55] y que existe un componente sensible al estado oxido-reducción (redox) de la célula, que induce las vías de las MAPKs, y por ende la expresión de los proto-oncogenes antes mencionados [56]. Utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*, Crumpton y colaboradores [47] demostraron que el Clp interfería negativamente con la unión de AP-1 pero no con SP-1 a sus sitios de unión en el ADN (RE). Por su parte, c-Fos ha sido implicado en mediar eventos de señalización a corto plazo, que se convierten luego en alteraciones a largo plazo, en la estructura y función del SNC por la regulación selectiva de la expresión génica [57].

Los estudios neuropatológicos que han sido utilizados para avalar el registro del Clp ante la EPA no han demostrado que el mismo posea efectos teratogénicos sobre el desarrollo del cerebro. Estos estudios, sin embargo, no han incluido los recientes resultados de exposiciones agudas a dosis farmacológicas en roedores jóvenes, donde se demuestra claramente que los mismos son más sensibles que los adultos. En particular, ratas de 17 días a las que se les administraron dosis orales de 15 mg/kg de Clp (5 veces menor que las dosis administradas en adultos para obtener los mismos efectos), mostraron cambios en el comportamiento, inhibición de la AChE y regulación negativa de los receptores muscarínicos en el cerebro [58]. Otros estudios han demostrado que ratas recién nacidas a las que les fue administrado Clp en dosis en las cuales no existió toxicidad sistémica (2 mg/kg con aplicación subcutánea en ratas de 2 días de nacidas), aunque no se midió la actividad específica de AChE, existió una disminución en la síntesis de ADN en el cerebro [59]. La alta susceptibilidad al Clp no parecería ser motivo de una AChE inmadura, sino de una carencia de hidrolasas de OF sanguíneas y hepáticas [60, 61]. Se ha sugerido también que la AChE facilita el desarrollo de los axones sirviendo como una molécula morfogénica en las neuronas, incluso se ha demostrado que esta proteína tiene una alta homología con otros agentes morfogénicos como son la neurotactina, glutactina, gliotactina y neurologina [62].

1.2 Estrés oxidativo y el sistema antioxidante

Un balance entre los agentes oxidantes y antioxidantes que resulte a favor de los primeros, y que potencialmente conlleve un daño celular a nivel de las biomoléculas, es lo que se conoce como estrés oxidativo. Por lo tanto, puede determinar que existan procesos carcinogénicos, peroxidación lipídica, daños en membranas celulares, mutagénesis, oxidación y fragmentación proteica, y daños en los hidratos de carbono [63]. En condiciones normales, el metabolismo aeróbico de los organismos da como resultado una serie de agentes oxidantes que deben ser neutralizados, por agentes antioxidantes endógenos, para no poner en riesgo la supervivencia de los mismos; pero situaciones patofisiológicas son también capaces de contribuir a estos procesos.

Algunos agentes oxidantes son los radicales: hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), alcoxilo y peroxilo ($\text{RO}\cdot$ y $\text{ROO}\cdot$ respectivamente), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), oxígeno singulete (O_2), semiquinona ($\text{Q}\cdot$), óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) y peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$); todos con dispar vida media. Los agentes antioxidantes son aquellos que se encuentran presentes a bajas concentraciones respecto de las moléculas oxidantes y que demoran o inhiben la oxidación de compuestos. Estos agentes se dividen en dos grupos: enzimáticos y no enzimáticos. El GSH es un antioxidante no enzimático que se encuentra presente en la mayoría de las células en altas concentraciones y participa de diversas reacciones metabólicas así como en la protección celular contra el daño provocado por los radicales libres. Cualquier reducción en los niveles de GSH puede llevar a una falta de protección, y por lo tanto, el consecuente daño celular dando finalmente la muerte de las células [1, 64]. Otros agentes antioxidantes presentes en la célula son la vitamina C y E, los β -carotenos, la bilirrubina, etc. Entre los antioxidantes enzimáticos podemos encontrar:

1. Glutación S-transferasas (GST): son enzimas de fase II involucradas en la biotransformación de xenobióticos y sustancias endógenas. Cumplen la función de conjugar los xenobióticos con el GSH y son inducidas por muchos insecticidas anticolinesterásicos así como también por otros plaguicidas [1, 65].
2. Catalasa: es una enzima citoplasmática que cataliza la reducción de H_2O_2 a H_2O y O_2 , previniendo así la acumulación de peróxido de hidrógeno y las consecuencias tóxicas que provocaría la reacción del mismo con los componentes celulares [66].
3. Glutación reductasa: permite mantener los niveles de GSH en la célula catalizando la reducción de glutación oxidado (GSSG) a glutación reducido (GSH), el cuál será utilizado por la glutación perxidasa (GPx) para la reducción del peróxido y lipoperóxidos, que son elementos tóxicos.
4. Superoxido dismutasa: es una metaloenzima que cataliza la dismutación del radical superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular, proporcionando una importante protección frente a la toxicidad del superóxido.
5. Otras enzimas del sistema antioxidante: GSH peroxidasas (GPx mencionada en el punto anterior), NADPH quinona oxidoreductasa, UDP-glucuronodil-transferasa, etc...

En el esquema de la figura 17 se puede observar cómo fuentes endógenas y/o exógenas pueden promover la formación de EROs (especies reactivas de oxígeno: $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot}) provocando un daño oxidativo a nivel subcelular y donde los sistemas de defensa antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos previenen la ocurrencia de dichos daños.

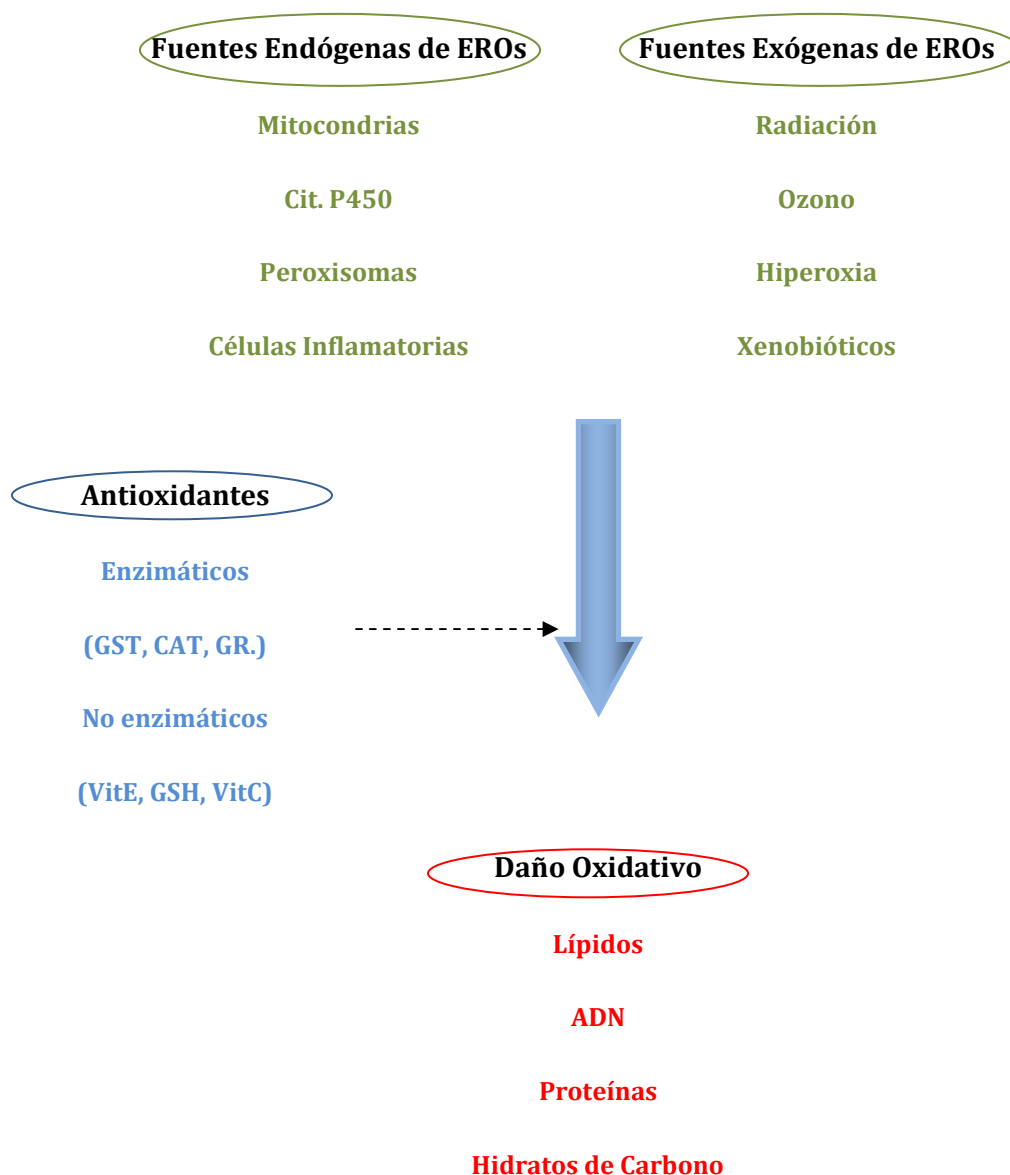


Figura 17. Fuentes de EROs y mecanismos de defensa antioxidante [67].

En la figura 18 se observan las vías involucradas en la generación de EROs y la defensa antioxidante en células de epidermis [68] ante la exposición a un xenobiótico, donde activan mecanismos enzimáticos (catalasa, GSH peroxidasas y SOD (superóxido-dismutasa)), y no enzimáticos (GSH), provocando a peroxidación lipídica (LPO) en la membrana plasmática celular.

Los agentes oxidantes que generan un incremento de EROs intracelulares son también capaces de activar vías de traducción de señales, incluso al mismo tiempo. Existen 4 vías principales, siendo 3 de ellas parte de las vías de las MAPKs:

ERK, JNK, p38 e IKK (no es miembro de las MAPKs). Las EROs, por su parte, son capaces de actuar como segundos mensajeros en una amplia gama de señales generadas por agentes extracelulares como EGF (*epidermal growth factor*), PDGF (*platelet-derived growth factor*), TNF α (*tumor necrosis factor alpha*), TGF β (*transforming growth factor beta*), LPS (lipopolisacáridos) e IL-1 (interleuquina-1) [44]. Los cambios celulares gatillados sobre proteínas por cambios en las EROs pueden dividirse en dos categorías: el efecto directo sobre las quinasas o los FT (NF- κ B y AP-1, ARE, AhR-ARNT entre otros) que pueden alterar sus conformaciones y actividades [69]; y el efecto sobre proteínas sensibles al estado redox, ricas en cisteínas, que ha demostrado jugar un papel importante en la regulación de las proteínas involucradas en respuestas al estrés celular (tioredoxina y GST) [45]. El heterodímero c-Jun/Nrf2 participa, frente a la exposición a xenobióticos o antioxidantes fenólicos, en la regulación de enzimas de detoxificación de fase II, a través de la interacción con ARE en las regiones promotoras de los genes: NAD(P)H:quinona oxidoreductasa, hemo oxigenasa-1, g-glutamyl-cisteina sintetasa y glutatión S-transferasa A2 [70-74].

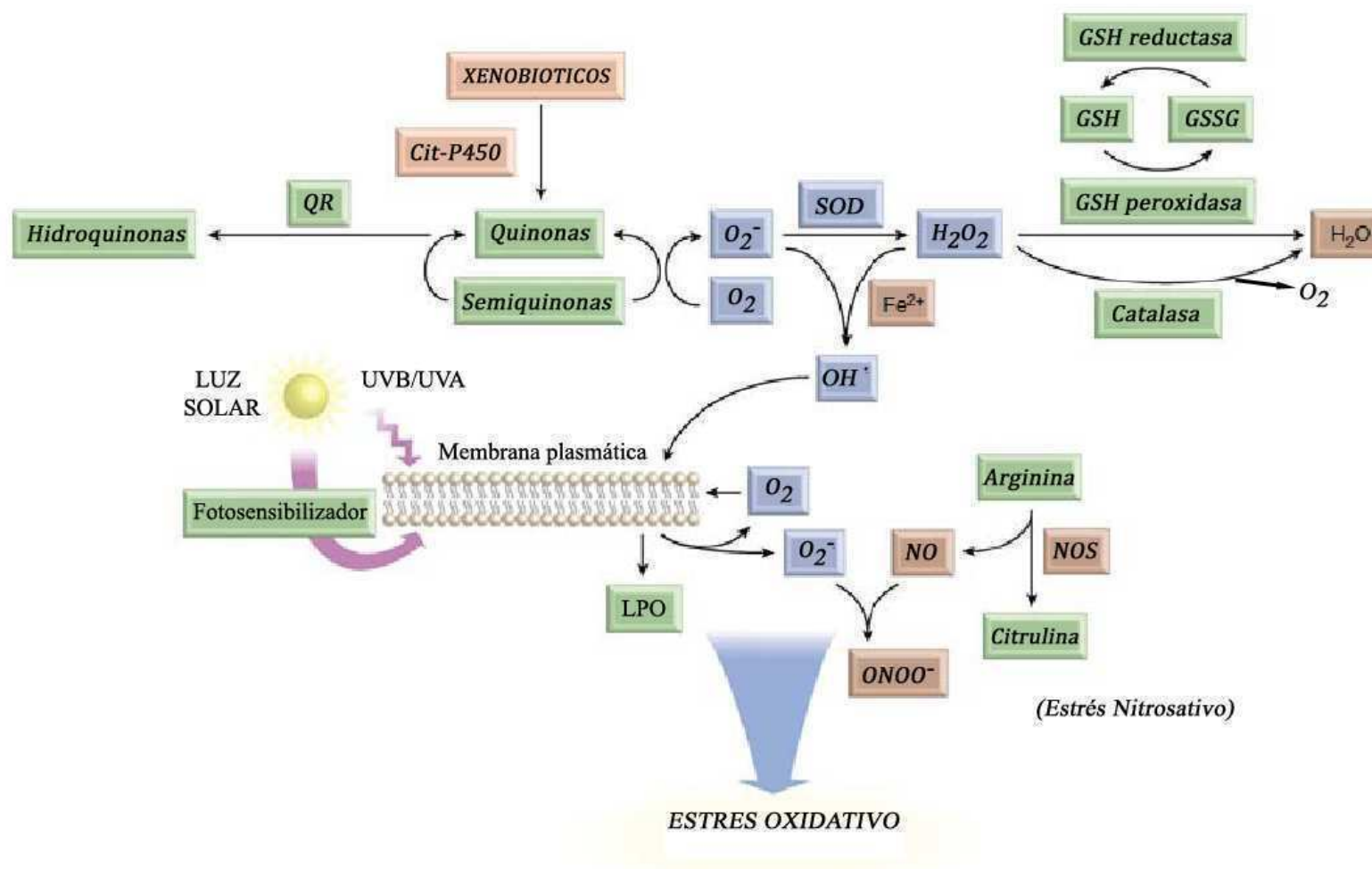


Figura 18. Vías involucradas en la generación de EROs y los mecanismos de defensa antioxidante en células de epidermis [68].

De acuerdo a lo que se mencionó anteriormente, los FT se pueden ver afectados por un desbalance redox. En la figura 19 podemos observar una representación esquemática de cómo los oxidantes y antioxidantes afectan la vía de traducción de señales que activan a los FT NF-κB y AP-1.

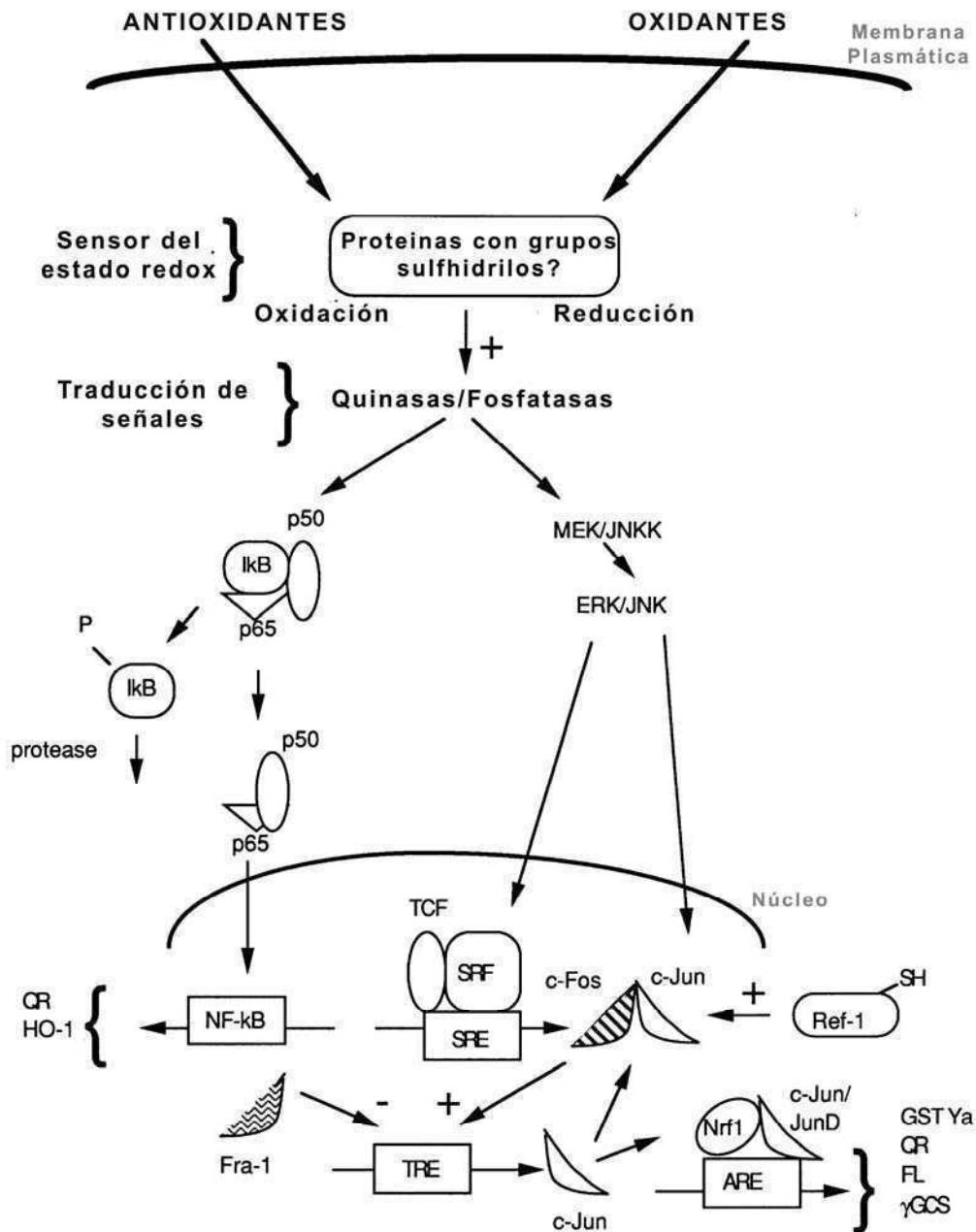


Figura 19. Representación esquemática de la vía de traducción de señales de AP-1 y NF-κB activadas por el efecto de oxidantes y antioxidantes (NF-κB formado por las subunidades p50 y p65) [56].

Por otro lado, se sabe que los sistemas antioxidantes poseen un rol preponderante en la regulación de los radicales libres y en los niveles de peróxido durante el desarrollo embrionario de varias especies; las que normalmente se encuentran expuestas a condiciones oxidantes durante su ciclo de vida, tienen la habilidad de incrementar rápidamente su eficiencia antioxidante como respuesta adaptativa.

Los plaguicidas OF y carbamatos han demostrado la capacidad de alterar los sistemas de defensa antioxidante al actuar como agentes pro-oxidantes incrementando los niveles de EROs y modificando las enzimas del sistema antioxidante [75].

1.3 Poliaminas

Las PAs naturales, Put (diamina, 1,4-diaminobutano: $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4 \text{NH}_2$), Spd (triamina, (mono-*N*-3-aminopropil-1,4-diaminobutano o 1,8-diamino-4-azaoctano: $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3 \text{NH}(\text{CH}_2)_4 \text{NH}_2$) y Spm (tetramina, (bis-*N*-3-aminopropil-1,4-diaminobutano o 1,12-diamino-4,9-diazadodecano: $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3 \text{NH}(\text{CH}_2)_4 \text{NH}(\text{CH}_2)_3 \text{NH}_2$), son poli cationes ubicuos solubles en agua, conteniendo grupos amino primarios o secundarios, distribuidos por la cadena lineal alifática (Figura 20). En embriones de anfibios, Put es la PA mayoritaria seguida de Spd, mientras que Spm es la minoritaria (a veces incluso indetectable) [76].

Las PAs están presentes en todas las células eucariotas y procariotas hasta ahora estudiadas, y han demostrado jugar un rol importante en la regulación del ciclo celular y la diferenciación [77, 78].

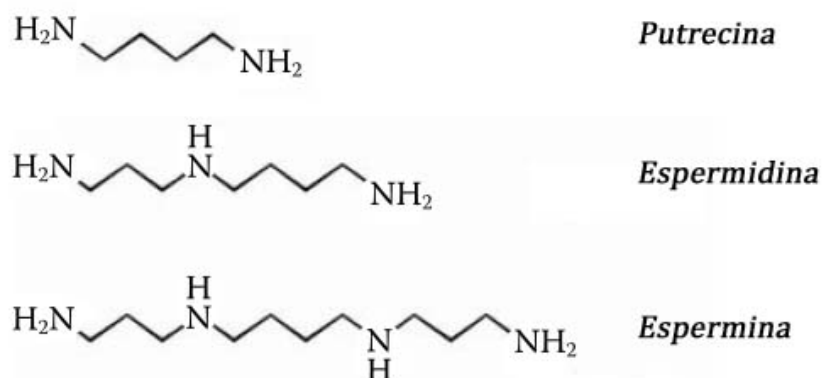


Figura 20. Estructura de las PAs Put, Spd y Spm.

En condiciones fisiológicas normales las PAs regulan una serie de actividades celulares entre las que se encuentran las de estabilizar los ácidos nucleicos y estimular su replicación, regular la transcripción de genes, la síntesis de proteínas y la regulación de receptores de membrana celular [77, 79-81]. Las PAs son capaces de unir al ADN por su esqueleto fosfodiéster de carga negativa; en particular Spm y Spd son capaces de causar la condensación del ADN, agregación, transición de conformaciones y alteración del plegamiento de la doble hélice [82]. Por otro lado, los niveles intracelulares elevados de las PAs se han correlacionado con la acetilación/desacetilación de histonas, que son parte de la regulación de la expresión génica, donde altos niveles de PAs estimulan la acetilación al estimular la actividad de las acetiltransferasas. Muchas acetilasas y desacetilasas son reguladas por promotores e inhibidores de la transcripción, que a su vez se encuentran bajo el control de las PAs; en general la desacetilación de histonas desestabiliza los nucleosomas y permite un mejor acceso de los FT al ADN promoviendo la transcripción de más genes. Por otro lado, muchas proteínas quinasas han sido identificadas como enzimas que estarían reguladas por las PAs, pero únicamente la caseína quinasa II (CKII) ha sido purificada por cromatografía de afinidad utilizando una PA. Cabe destacar que esta quinasa fosforila más de 50 proteínas distintas, incluyendo a la oncoproteína c-Myc [82]. Se ha venido estudiando en los últimos años la regulación molecular de las PAs en las vías de traducción de señales que dan lugar a la expresión de genes supresores de tumores

en varios tipos celulares. Se han reportado nexos entre las PAs y los factores EGF, TGF- β , TNF- α , y HGF (*hepatocyte growth factor*) [82, 83]. El nexo con las PAs también ha sido establecido para muchos oncogenes entre los que podemos nombrar: NF- κ B, c-Myc, c-Jun, and c-Fos [84]; y genes supresores de cancer como la proteína p53, Rb, p21WAF1/CIP1/SDI1, y p27Kip1 [82]. Debido que la oncoproteína c-Myc y los productos de la transcripción regulados por las proteínas supresoras mencionadas anteriormente se encuentran directamente involucradas en el ciclo celular y los procesos de apoptosis, las PAs pueden ser relacionadas con estos mecanismos claves de la proliferación, diferenciación y muerte celular programada en mamíferos.

1.3.1 Metabolismo y regulación de los niveles de PAs

Los niveles de PAs, que son esenciales en un amplio rango de procesos biológicos, se encuentran alterados en situaciones de estrés celular así como en toxicosis, llevando finalmente a la apoptosis por generación de peróxidos de hidrógeno y depleción de GSH durante el desarrollo embrionario [85]. En nuestro laboratorio se han analizado previamente los niveles de PAs endógenas como biomarcadores de efecto en estadios embrionarios avanzados y tardíos de *R. arenarum* expuestos al OF Mtn, observando una disminución en sus niveles [64]. Este efecto fue a su vez relacionado con alteraciones en el desarrollo y una morfogénesis anormal. El patrón de PAs determinado en embriones de *R. arenarum* es coincidente con el de otros anfibios como *X. laevis*.

La concentración intracelular de PAs se encuentra regulada por: 1) la biosíntesis, 2) ingreso al interior celular, 3) oxidación y 4) acetilación.

- 1) **Biosíntesis:** la etapa limitante en la biosíntesis de PAs es la formación de Put a partir de ornitina (cuyo precursor es la arginina), paso catalizado por la enzima ornitina descarboxilasa (ODC). En la figura 21 se resumen los pasos de la biosíntesis y de retroconversión a Put, en el cual se encuentran involucradas las enzimas SSAT (espermidina/espermina

N´acetil transferasa) y PAO (poliamino oxidasa). SAM (S-adenosilmetionina), producida gracias a la acción de la enzima SAMDC (SAM descarboxilasa) es donante de dos residuos de propilamina que se unen al N8 de la parte diaminobutano de la Spm.

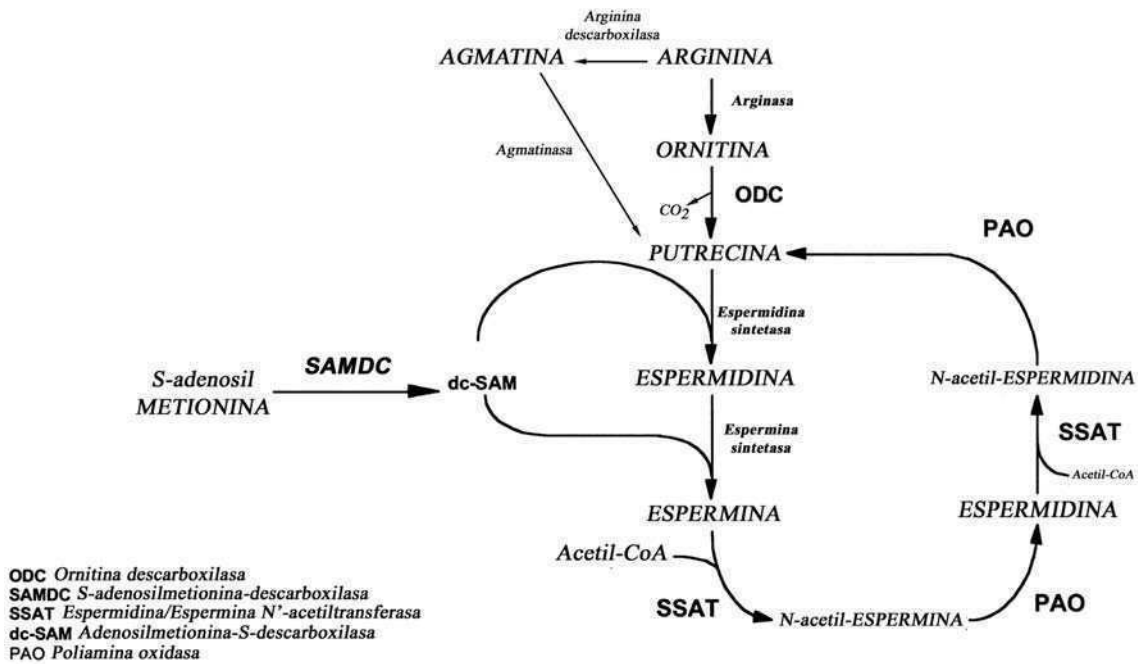


Figura 21. Caminos biosintéticos y catabólicos de las PAs. Adaptado de Siu y colaboradores [86].

- 2) Ingreso o "uptake": esta vía de regulación en la concentración de PAs en el interior celular ha sido estudiada principalmente en bacterias y levaduras, llegando a la conclusión que sus transportadores son proteínas de membrana, algunas de ellas de unión al ATP [87]. Este sistema aún no se encuentra completamente caracterizado en eucariotas superiores pero se ha reportado que el transporte se ve bloqueado por la inducción de la antizima (ver degradación de ODC) [88, 89].
- 3) Oxidación: junto con la excreción de las PAs, es el principal mecanismo por el cual se reducen los niveles de PAs intracelulares mediante reacciones catalizadas por oxidasas (poliamino oxidasa -PAO- y diamino oxidasa -DAO-). Esta reacción da como producto secundario la formación

de H₂O₂, afectando los niveles de GSH y promoviendo estrés oxidativo y, posteriormente, muerte celular [90].

- 4) Acetilación: Este tipo de reacciones lleva a una disminución en sus niveles y es catalizada por acetiltransferasas.

1.3.2 L- Ornitina descarboxilasa (ODC)

Como ya se mencionó previamente, ODC cataliza el primer paso en la vía biosintética de las PAs al formar Put a partir de ornitina [87, 91-93]. Esta enzima limitante tiene una vida media muy corta, 10 a 15 minutos en células eucariotas, y sus síntesis está inducida y regulada de manera hormonal [81].

Aún cuando en microorganismos y plantas la Put puede ser sintetizada a partir de arginina, ésta se realiza en una primera etapa gracias a la acción de la enzima arginina descarboxilasa, cuya presencia en mamíferos es controversial [94]. ODC es una descarboxilasa dependiente de piridoxal fosfato (PLP) que actúa como cofactor de la misma. Su estructura es la de homodímero con dos sitios activos compuestos por aminoácidos ambas subunidades [95]. Existen 2 dominios en cada monómero de ODC, un dominio NH₂- y uno COOH- terminal donde el sitio activo de la enzima está conformado por la zona de interacción entre el dominio NH₂- terminal de una subunidad y el dominio COOH- terminal de la otra. Esta unión es débil y existe un balance entre la forma activa y los monómeros de la enzima bajo condiciones fisiológicas.

Los niveles de ODC se encuentran altamente regulados y varían de acuerdo a la situación que esté atravesando la célula, ya que se altera en respuesta a diversos estímulos. Su degradación la determina la actividad de la antizima, que responde exclusivamente a los niveles de PAs. Su síntesis depende de diversos FT específicos, así como también existe una regulación a nivel traduccional.

1. Regulación transcripcional del ARNm de ODC: la región promotora del gen de ODC contiene múltiples secuencias para la unión de hormonas, factores de crecimiento y factores promotores de tumores, incluido el elemento de respuesta a

AMPC, motivos CAAT y LSF, sitios de unión a AP-1, AP-2, SP-1 y la caja TATA [96, 97]. Se encuentra reportado con anterioridad que el oncogen c-Myc también regula la síntesis de ODC positivamente [98, 99]. La activación de la vía Ras (raf/MEK/ERK) tiene efectos estimulatorios sobre el ARNm de ODC y a nivel de la traducción [100].

2. Regulación traduccional de la síntesis de ODC: el ARNm de ODC contiene una extensa secuencia de nucleótidos no traducidos en el extremo 5' (UTR). Por este motivo, la traducción se encuentra promovida por altos niveles de la proteína factor de iniciación eucariótico de unión a CAP en el ARNm (eIF4E), el cuál está implicado en el crecimiento y la proliferación celular, y cuya sobreexpresión ha sido relacionada con transformación celular, tumorigénesis y linfomagénesis [101]. El extremo 5'UTR también contiene un ORF (Open Reading Frame: Marco Abierto de Lectura) localizado unos 150 nucleótidos hacia el extremo 5' del codón de iniciación, y una secuencia rica en -GC localizada en los primeros 130 nucleótidos en el extremo 5'. Estas secuencias son altamente inhibitorias de la traducción de ODC tanto *in vivo* como *in vitro*. Por otro lado, la síntesis de proteínas en los ribosomas es inhibida por altos niveles de PAs. Tal como se especificó en el punto de regulación anterior, la vía de Ras tiene efectos sobre la traducción de ODC, la cuál sería a través de cambios en la fosforilación de eIF-4E-BP1 por activación de la vía fosfoinositol 3-kinasa (PI3K) y la señalización Raf/MEK/ERK [100].
3. Degradación de ODC: La rápida degradación de ODC se da por la acción del Proteosoma 26S pero independientemente de la ubiquitinación de la proteína (Figura 22). En su lugar, ocurre una unión no covalente con una proteína conocida como antizima la cuál dirige a ODC hacia el proteosoma incrementando dicha

interacción, pero no por un incremento en la velocidad de procesamiento del proteosoma. Para la degradación de ODC es imprescindible su extremo -COOH, en particular los últimos 37 residuos (regiones "PEST": segmentos ricos en los aminoácidos prolina, ácido glutámico, serina y treonina) incluyendo fundamentalmente la Cys⁴⁴¹, que aparentemente es el residuo clave [88]. La antizima, por su parte, interactúa con ODC en la región comprendida entre los residuos 117 y 140 de la última, que es la zona de unión al cofactor PLP. La región de la antizima que interactúa con ODC comprende los residuos 106-212 de la zona -COOH terminal. Esta región es capaz de inhibir ODC pero no es suficiente para dirigirla al proteosoma, sino que para ello es requerida la zona comprendida entre los residuos 55-105 de la antizima [88]. A su vez, la antizima es regulada a nivel de su traducción por eventos que afectan el marco de lectura del ARNm. Su ARNm contiene dos ORFs (ORF1 y ORF2) donde el segundo no posee un codón de iniciación sino que su síntesis depende de que el ribosoma no reconozca el codón de terminación del ORF1, lo cual es estimulado por las PAs. Altos niveles de PAs incrementan las síntesis de la antizima y disminuyen la degradación de la misma. Spd y Spm son más efectivos que la Put en estimular la traducción del ARNm [101]. Existen al momento 4 isoformas de antizimas y todas ellas han demostrado la capacidad de inhibir la actividad de ODC [101]. Recientemente se ha descrito una vía alternativa de degradación de ODC durante el estrés oxidativo, que es regulado por la NAD(P)H quinona oxidoreductasa (NQO1) y que no requiere del dominio -COOH terminal. NQO1 estabiliza ODC mediante su unión [101].

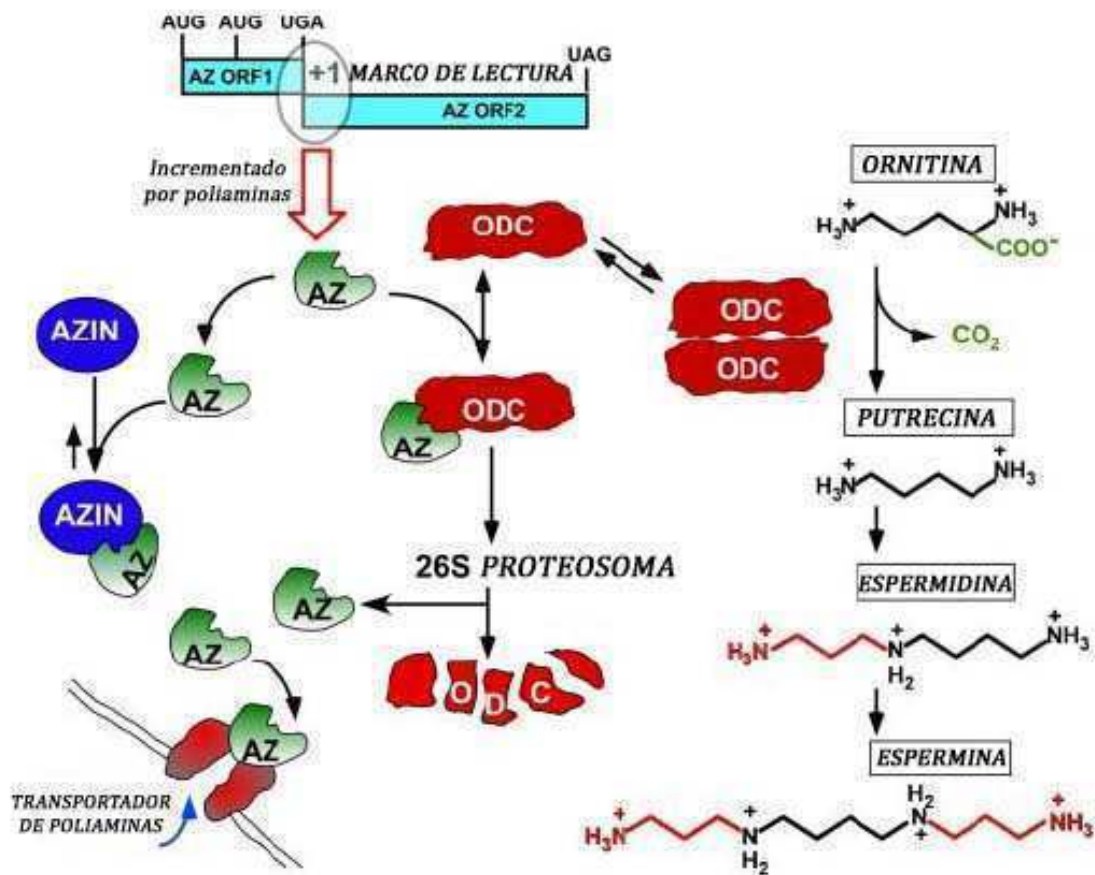


Figura 22. Rol de la Antizima (AZ) y ODC en el metabolismo de las PAs. El dímero de ODC cataliza la síntesis de Put que luego es convertida a PAs más complejas. La antizima es sintetizada vía el marco de lectura +1 en la traducción del ARNm, fusionando el ORF 1 (Open Reading Frame: Marco Abierto de Lectura) con el ORF 2 gracias a la estimulación de las PAs. La AZ puede unirse a ODC promoviendo su degradación por el Proteosoma 26S o bien puede unirse al inhibidor de AZ (AZIN).

AP-1 en sus dos formas tiene 3 sitios de unión en el gen que codifica para ODC [102], incluso Wrighton y colaboradores [103] han demostrado que c-Fos ejerce una estimulación directa en la transcripción de ODC. El FT c-Myc ha probado ser también regulador de la expresión de ODC [104], al igual que lo hace el AMPc [105].

1.3.3 Las PAs y la vía de traducción de señales de las MAPKs

La principal vía involucrada en el crecimiento celular es la vía de Ras/MAPK. La sobre-expresión de ODC incrementa la actividad de las MAPK y de las tirosina quinasas sin alterarse los niveles endógenos de las PAs [105, 106]. Se ha demostrado que en particular la Spm es la responsable de estimular la fosforilación de P42 y p44 [83] y que la inhibición selectiva de las MEKs (MAPK-activating enzymes) inhiben la fosforilación de ERK y la actividad específica de ODC [105]. La expresión de otros genes asociados al crecimiento, como los proto-oncogenes *c-fos* y *c-myc*, es activada por las PAs [84], siendo Put la más efectiva en estimular la transcripción de *c-fos* y *c-jun* [107]. La fosforilación de los FT c-Myc y AP-1 es controlada por la vía de las MAPKs, vías de regulación que se encuentran resumidas en la figura 23 [83].

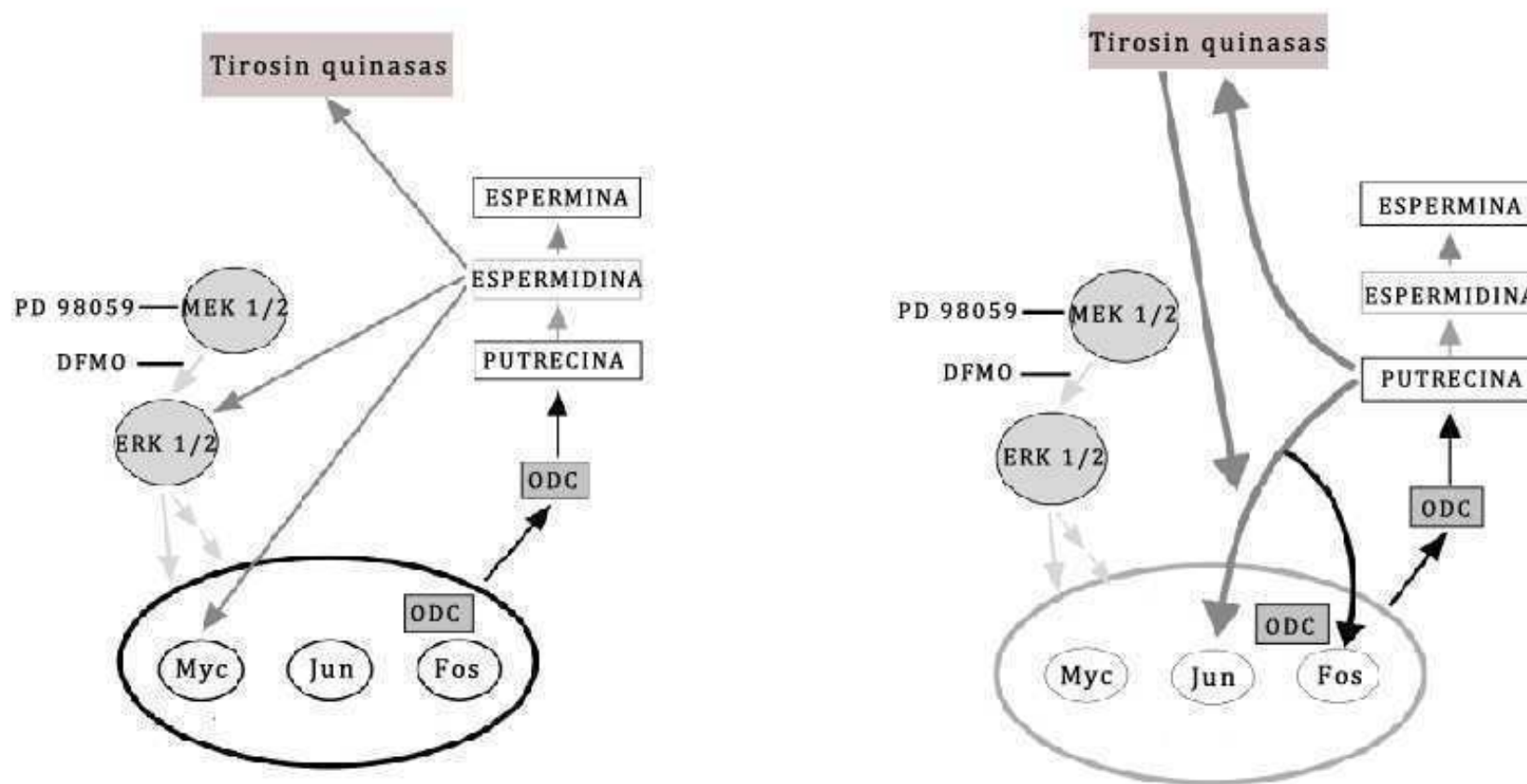


Figura 23. Efecto de Spd (izquierda) y Put (derecha) en eventos de traducción de señales. La Spd estimula la fosforilación de tirosinas quinasas, ERK 1/2 y el oncogen *c-myc*. La Put por su lado estimula las tirosinas quinasas y la expresión de *c-fos* y *c-jun*.

Como se mencionó previamente, las PAs son requeridas para el crecimiento normal de todos los tipos celulares: un incremento en los niveles endógenos conlleva un aumento en la proliferación celular (relacionado con procesos tumorales, altamente proliferativos), mientras que una disminución inhibe dichos procesos, incluso en algunos casos provocando muerte celular por necrosis o apoptosis [108]. Por lo tanto, un incremento desregulado en los niveles endógenos de las PAs han sido asociados con carcinogénesis, siendo su ensayo en análisis clínicos una herramienta importante para el diagnóstico de la enfermedad [81] (Figura 24).

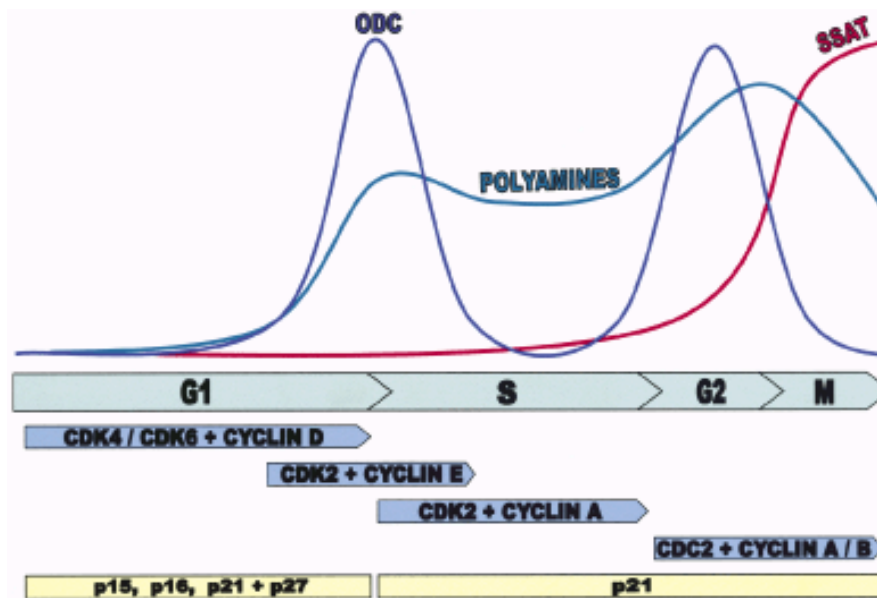


Figura 24. Relación entre el metabolismo de las PAs y las proteínas reguladoras del ciclo celular.

SSAT: espermidina/espermina acetiltransferasas [109].

1.4 Biomarcadores y especies bioindicadoras

En los últimos años se ha comprendido la importancia de las determinaciones a campo, en cuanto a los niveles de contaminantes presentes, acompañado por las determinaciones bioquímicas en los organismos que habitan el ecosistema y a fin de estudiar los impactos en la biología de los seres vivos.

Frente al efecto de una sustancia tóxica existen ciertas respuestas biológicas en los individuos (que abarca también el nivel de ecosistema) y se denominan biomarcadores. Si bien evidencian una respuesta del individuo a la agresión, no da información sobre el efecto que tiene a nivel poblacional. Este efecto en organizaciones superiores está dado por el concepto de bioindicador (asociado a especies). El uso de biomarcadores se ha venido desarrollando desde los años 80, tomando particular importancia en los últimos años, como herramienta para determinar los efectos tempranos de los tóxicos pero no el efecto de dosis muy bajas de los mismos (salvo en los casos de sustancias altamente agresivas).

Los autores Peakall y Kennedy [110] han propuesto la utilización de no sólo variables bioquímicas y fisiológicas sino también de respuestas histológicas, morfológicas y de comportamiento. Por otro lado, Van Gestel y Brummelen [111] proponen las siguientes definiciones:

- **Biomarcador:** cualquier respuesta biológica frente a una químico ambiental a nivel sub-individual, medido dentro del organismo, o en sus productos (orina, heces, pelos, plumas, escamas, etc...), indicando una alteración respecto a su estado normal que no puede ser detectado a partir del organismo en su conjunto. De este modo, los biomarcadores se restringen a determinaciones bioquímicas, fisiológicas, histológicas y morfológicas (incluyendo aspecto, pigmentación, malformaciones, etc...) del estado de "salud", excluyendo los efectos sobre el comportamiento.
- **Bioindicador:** es un organismo que aporta información sobre las condiciones ambientales de su hábitat mediante su presencia, ausencia y comportamiento. Los efectos fisiológicos no se incluyen en la definición de bioindicador.

Los biomarcadores se utilizan para detectar la presencia de una exposición, determinar las consecuencias biológicas de la exposición, detectar los estados iniciales e intermedios de un proceso patológico, identificar a los individuos sensibles de una población, e incluso, para fundamentar la decisión de intervenir

tanto a nivel individual como ambiental [11]. Un biomarcador ideal debe cumplir los siguientes requisitos [112]:

- a) Fácil recolección de la muestra y análisis
- b) Debe ser específico
- c) Debe reflejar únicamente un cambio sub-clínico y reversible
- d) Debe permitir adoptar medidas preventivas
- e) Debe ser éticamente aceptable.

La especificidad de los biomarcadores suele ser de rango muy amplio (o sea, no son muy específicos en general), por lo que se valora la complementariedad entre ellos y así se busca incrementar su grado de especificidad. En general pueden ser divididos en 3 clases [113]:

1. Biomarcadores de efecto: Otorgan información sobre los cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos en los organismos y están directamente relacionados con el riesgo de efectos adversos en la salud. La información obtenida a partir del monitoreo de los biomarcadores de efecto permiten comprender cambios a nivel poblacional y de comunidad, si se los asocia a las características de los ambientes en los que están inmersos dichos organismos, y así determinar el grado de impacto ambiental que tiene la aplicación de los plaguicidas así como cualquier otro tipo de contaminación.
2. Biomarcadores de exposición: miden directamente la exposición, y no los blancos o alteraciones bioquímicas/moleculares. En general se asocia a las medidas directas del tóxico o sus metabolitos medidos usualmente en fluidos corporales (sangre, orina) [114].

3. Biomarcadores de susceptibilidad: se utilizan para identificar a los individuos más susceptibles a daños en una población o, por el contrario, como medida de resistencia. Esto se puede deber a que tienen más activos los procesos de bioactivación o a que tienen disminuidas sus capacidades de detoxificar, de excretar o de reparar daños [11]. Se deben generalmente a factores genéticos, reconocibles por estudios de ADN y sus fragmentos de restricción (RFLPs), clonado de genes e investigación de polimorfismos de actividades enzimáticas [114].

Entre los biomarcadores de efecto más comúnmente utilizados en individuos de distintas especies expuestos a xenobióticos, se encuentran los siguientes:

- Actividad de las enzimas colinesterásicas (AChE, BChE, colinesterasas totales)
- Actividad de las enzimas ATPasa Na⁺-K⁺ y Mg²⁺ dependientes
- Actividad de las enzimas detoxificadoras
- Respuestas genotóxicas
- Parámetros hematológicos
- Proteínas de estrés
- Estabilidad de membranas de lisosomas
- Estudios histopatológicos
- Respuestas fisiológicas y morfológicas
- Parámetros endocrinos
- Expresión de genes relacionados con la detoxificación de xenobióticos.

Como ya se mencionó, la toxicidad de los plaguicidas OF y carbamatos radica principalmente en la inhibición de la enzima AChE actuando como sustratos alternativos a la ACh. Si bien la inhibición de la AChE ha sido utilizada en el diagnóstico de la exposición en humanos, en los últimos años se ha utilizado dicho parámetro en los estudios ecotoxicológicos para el monitoreo del impacto de los

xenobióticos en las poblaciones y ecosistemas. Esta inhibición responde de manera dosis-dependiente y es generalmente aceptado que en los vertebrados existe una variación en la inhibición natural de hasta un 20%. Entre el 20 y el 50% de inhibición esta correlacionada con efectos negativos en los organismos incluyendo problemas a nivel de comportamiento y reproductivo. Una inhibición por encima del 50% es considerada irreversible y en rangos letales. Por todo lo expuesto, la inhibición de la AChE es el primer biomarcador de exposición y efecto validado frente a la presencia de los plaguicidas OF y carbamatos [115]. Sin embargo, la relación entre la inhibición de las enzimas colinesterásicas y la letalidad no se cumple en todos los casos, estudios realizados en *O. mykiss* han demostrado que los mismos son capaces de sobrevivir aún cuando la inhibición de la colinesterasa de cerebro es prácticamente completa (95-97%). No obstante la enzima mayoritaria se encuentra en músculo y es significativamente menos sensible a los OF [116]) frente a la exposición de carbaril y metilazinfos [117]. Por otro lado, estudios realizados en embriones y larvas de *R. arenarum* donde se produjeron inhibiciones de hasta el 60% en la actividad de la AChE, no afectó el normal desarrollo de los individuos e incluso se logró una alta tasa de recuperación en la actividad específica de la enzima [2].

1.4.1 Los anfibios como modelos de estudio en toxicología ambiental

Los anfibios son los constituyentes más importantes en los bosques tropicales y representan una de las principales fuentes de nutrientes que fluyen desde los sistemas acuáticos hacia los terrestres. Sus estadios larvales regulan el crecimiento de las algas en el agua y sus formas terrestres controlan invertebrados (principalmente insectos), reptiles y pajaros [118]. La permeabilidad de su piel, su ciclo de vida bifásico (con formas acuáticas y terrestres) (Figura 25) y su ubicación estratégica en la cadena trófica los hacen sensibles a la contaminación ambiental. Durante su desarrollo embrionario y larval, su hábitat es acuático y su

desarrollo es altamente regulado por vías hormonales. Todo esto hace que sea considerado una especie bioindicadora de relevancia.



Figura 25. Ciclo de vida del sapo común (*R. arenarum*)

Se ha reportado que en los últimos años del siglo XX la población de anuros se ha visto amenazada y diezmada. Existe numerosa evidencia que demuestra que los contaminantes ambientales (incluidos los plaguicidas) pueden actuar como disruptores endocrinos en humanos y en la vida silvestre [119-121]. Este hecho es de particular importancia en el ambiente y en particular en el efecto que tiene sobre las poblaciones de anfibios, las cuales están declinando globalmente [122-126], pero el grado de impacto de los plaguicidas no está del todo claro aún. Otras causas reportadas han sido la destrucción de su hábitat natural, infecciones, competencia en su hábitat, consumo humano de ranas, lluvia ácida, radiación UV, etc...[118].

Si bien existe un número importante de estudios sobre los efectos toxicológicos de los plaguicidas en poblaciones de anfibios [127] la mayoría de

dichos estudios se centran en la toxicidad aguda, la morbilidad y la mortalidad. Se ha demostrado el retardo en el crecimiento y disminución en el tamaño de los adultos lo que conlleva una disminución en su capacidad predadora y los hace más propensos a ser depredados, lo que finalmente afectaría su capacidad de reproducción, especialmente en las hembras [128-130]. Herkovitz y colaboradores [131] han propuesto a los estadios embrionarios y larvales de los anfibios para realizar pruebas de toxicidad para el diagnóstico, protección y monitoreo ambientales con fines de restauración.

1.4.1.1 Estadios embrionarios de los anfibios

Las 3 fases esenciales de desarrollo son: huevo, embrión y larva; y los 3 procesos que dan origen o señalan el comienzo de la fase siguiente son: fecundación, eclosión y metamorfosis. Cada una de estas fases comprende un gran número de etapas (25 estadios [132]) de las cuales aquí detallamos únicamente las correspondientes al embrión [132, 133].

Los cigotos fertilizados comienzan una serie de transformaciones muy similares en todos los anfibios para adquirir la forma y alcanzar el estadio larval. Estos estadios son:

1. Segmentación (Figura 26): Este proceso comienza luego de la fecundación del huevo y es dependiente de la T° y debe ser constante. Poseen una media luna gris pigmentada que corresponde al polo animal con un límite bien definido del polo vegetal: Son huevos telolecitos de gran tamaño y con alto contenido de vitelo el cual está acumulado en la porción posterior del huevo formando el hemisferio vegetal o vegetativo; el otro 50% está constituido por el protoplasma y el núcleo y se denomina hemisferio animal. La primera segmentación divide al huevo en dos partes iguales (blastómeros) atravesando el polo animal y vegetal y comenzando por el primero. Antes que se complete la segmentación en el polo vegetal, comienza la

segunda hendidura por un plano meridional y perpendicular al primero. La 3^{er} hendidura se realiza por un plano por encima apenas del ecuatorial, perpendicular a los dos anteriores. Esto da lugar a 8 blastómeros desiguales, 4 microcélulas del hemisferio animal y 4 macrocélulas del vegetal. Se dice que la segmentación es holoblástica (bilateral y desigual) porque el clivaje es completo aunque no existen, por lo anteriormente dicho, estadios netamente con 2 y 4 blastómeros, pero sí con 8. En la parte interior del huevo los blastómeros dejan desde el comienzo un espacio llamado cavidad de segmentación o blastocelio. La segmentación es siempre más rápida en el polo animal porque posee menor cantidad de vitelo y por lo tanto menor interferencia. El 4^{to} y 5^{to} hendimiento dan lugar al estadio de blástula.

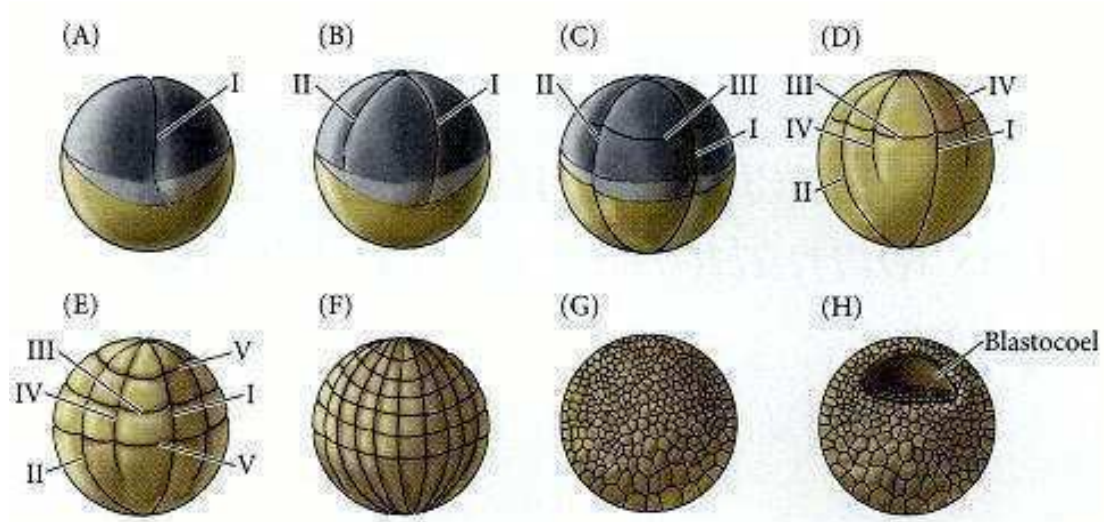


Figura 26. Segmentación del cigoto fertilizado en anfibios. Las líneas de clivaje están designadas por números romanos en orden de aparición (A, B) Debido que el vitelo vegetal impide el clivaje, la segunda división comienza en la región animal del huevo antes que la primera división haya dividido el citoplasma vegetal. (C) La tercera división es desplazada hacia el polo animal. (D-H) El hemisferio vegetal contiene finalmente menos blastómeros pero de mayor tamaño que la parte animal. H Representa una sección transversal en un embrión en el estadio de gástrula media [134].

2. Gastrulación (Figura 27, ANEXO III): Es la formación de la gástrula con 3 capas embrionarias. Las células del margen se mueven hacia adentro para formar el labio dorsal del blastoporo, y los precursores mesodérmicos retornan bajo la superficie del blastocele. El arquenterón se forma y desplaza al blastocele, las células migran de los labios laterales y ventrales hacia el interior del embrión. Las células del hemisferio animal migran hacia la región vegetal, desplazando el blastoporo hacia una región cercana al polo vegetal. Hacia el fin de la gastrulación, el blastocele es obliterado, el embrión se rodea de ectodermo, el endodermo ya ha sido internalizado y las células del mesodermo se han posicionado entre el ecto y endodermo.

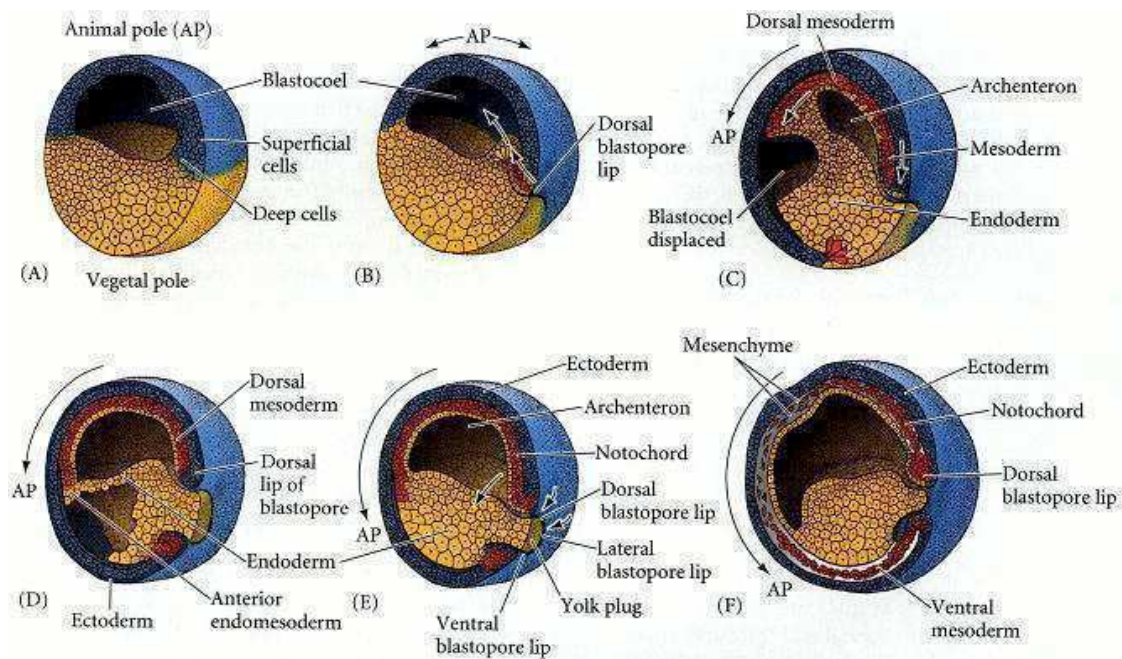


Figura 27. Proceso de gastrulación. AP marca la posición del polo animal, que varía a medida que avanza la gastrulación. (C, D) Gástrula media. (E, F) Gástrula tardía [134].

3. Neurulación: La gástrula que tiene forma oval, adquiere una forma alargada y ligeramente convexa en la parte dorsal del ectodermo (neuro-ectodermo) por la formación de la placa neural. Los márgenes laterales y transversos de la placa originan

un repliegue que se eleva y junta por su parte superior formando el tubo neural, que dará origen al SNC. El embrión en este estado es conocido como néurula.

El dorso del embrión se endereza y en la parte anterior se proyecta un brote que formará la cabeza, y otro pequeño saliente en la parte posterior, que formará la cola por detrás del blastoporo. Al mismo tiempo comienza el modelado de la extremidad cefálica: ojos, fositas olfativas y auditivas, el aparato de fijación de la larva, arcos y aberturas branquiales. Se alarga la parte ventral por disminución del vitelo a medida que es utilizado. En el estadio de TN se produce la eclosión de los embriones de sus cubiertas.

La exposición a OF ha dado como resultado algunas alteraciones morfológicas y de comportamiento que se han caracterizado por embriones con el cuerpo retorcido e hidropesía, alteraciones en la notocorda, desarrollo de branquias defectuosas, reducción de peso y tamaño así como mayor tiempo de desarrollo para alcanzar la metamorfosis [135].

Los embriones en desarrollo se encuentran provistos de una considerable cantidad de proteínas y ARN materno que permiten la síntesis de proteínas estructurales y reguladoras, en ausencia de síntesis *de novo* de ARN, en los estadios iniciales. Una transición en la transcripción hacia un estado activo (incrementándose unas 200 veces), así como una desincronización del ciclo celular, ocurre en lo que se conoce como transición de la blástula media (TBM) [136]. Al comienzo de la gastrulación, los productos génicos embrionarios regulan por primera vez el ciclo celular y controlan la muerte celular programada. Se ha descrito que muchos de los FT, pero no todos (Ej. c-Myc, p53), son retenidos en el citoplasma lo que constituye un punto extra de regulación para evitar la transcripción previa a la TBM. Otras proteínas involucradas en la maquinaria transcripcional también son reguladas previo a la TBM, así como también la dinámica de remodelación de las cromátina (actividad de las histonas y metilación del ADN) [136].

En *X. laevis* se ha determinado que c-Jun (AP-1) está involucrado en la formación del mesodermo ventral a través de la regulación de FGF y BMP (Fibroblast Growth Factor y Bone Morphogenic Protein) [55, 137]. JNK presenta en esta especie isoformas p40 y p49 que en los embriones se mantiene en altos niveles de actividad hasta alcanzar el estadio de gástrula temprana, según los autores, probablemente como regulador de la apoptosis en un rol no genómico de esta vía de traducción de señales [138]. Por otro lado, c-Fos ha demostrado en organismos adultos de esta especie una vida media similar a la de su contraparte en mamíferos, de aproximadamente 10 minutos. Contrariamente, en embriones posee una estabilidad incrementada, con una vida media que alcanza algunos días. El ARNm materno de este protooncogen acumulado es degradado luego de la fertilización, disminuyendo a menos de un tercio en el estadio de gástrula respecto de los ovocitos. C-Myc se comporta de manera similar. Para el estadio de BC existen en el embrión sólo 10^4 moléculas de ARNm por embrión respecto de las 2×10^5 transcritos que existen en el ovocito, contrariamente a lo que ocurre con c-Myc que se encuentra unas 500 veces por encima de los niveles de transcritos de c-Fos [139]. Se ha demostrado que c-Fos en *X. laevis* posee regiones altamente conservadas con el humano, rata, ratón y gallina, especialmente en las regiones putativas de unión al ADN, cierre de leucina y la zona C-terminal de transactivación [140]. En *Rana esculenta* se ha reportado un PM de c-Fos que va desde los 52 a los 68 KDa de PM, heterogeneidad atribuída a la fosforilación de la proteína en los grupos serina (Ser 362-364, 368-371 y 373-374) que regulan la actividad transcripcional del complejo AP-1 [141]. Otros autores han demostrado que en *X. laevis* c-Fos es una proteína exclusivamente nuclear de 55 KDa de PM [140] a diferencia de mamíferos donde se encuentra tanto en núcleo como en citoplasma.

Las actividades específicas de AChE y BChE de *R. arenarum* han mostrado importantes variaciones entre los distintos estadios del desarrollo, comenzando a detectarse a partir de la etapa de gástrula y alcanzando el pico de su actividad en OC [2]. A su vez, la exposición de los embriones a OF no siempre ha demostrado una inhibición de las colinesterasas, bien porque poseen formas resistentes a agentes anticolinesterásicos o bien debido a que tienen un tiempo de recuperación

relativamente rápido. Por este motivo se ha sugerido especial cuidado al tomar este parámetro como biomarcador de la exposición [135].

Los niveles endógenos de PAs, por su parte, se ven disminuídos frente a la exposición al OF Mtn, que son catabolizadas por la poli y diaminoxidasas, generando compuestos que consumen el GSH. El malatión también es degradado con consumo de GSH magnificándose el estrés oxidativo y el daño celular [118].

Dos isoformas de GST han sido descriptas para *Bufo bufo*, bbGSTP1-1 y bbGSTP2-2. En embriones se encontraría únicamente la primera durante todo el desarrollo y en etapas metamórficas-postmetamórficas habría un cambio en la expresión hacia bbGSTP2-2. Esto se encuentra relacionado con el hecho que sólo esta última tiene la capacidad de metabolizar hidroperóxidos orgánicos y que la primera es capaz de cumplir con la detoxificación en el desarrollo en etapa acuática, donde no existen altas presiones de oxígeno promoviendo altos niveles de metabolitos tóxicos, mas alla de una detoxificación de ciertos metabolitos citotóxicos formados durante esta etapa [142].

1.5 Toxicología Acuática

En 1.930 se realizaron diversos estudios para establecer relaciones causa/efecto en poblaciones del pez dorado (*Carassius auratus*) lográndose determinar que algunos peces eran particularmente más resistentes que otros (ej. Trucha, *Salmo trutta L.*). Posteriormente se procedió a realizar los estudios con una amplia gama de organismos acuáticos que demostraron claramente las diferencias de susceptibilidad entre especies a las exposiciones agudas a distintos compuestos químicos. En 1.948 se iniciaron diversas acciones legislativas globales, entre las que se encontró la redacción del acta federal sobre el control de la contaminación acuática, que serían el puntapié inicial para la expansión de la investigación en este campo. En 1.960 ocurrieron dos hechos que fortalecieron el crecimiento de la toxicología acuática: el primero fue la redacción del acta de calidad de aguas,

diseñado para la protección de organismos acuáticos a la exposición crónica a contaminantes ambientales; y el segundo fue el desarrollo de procedimientos para el cultivo de todo tipo de especies en el laboratorio. El próximo paso relevante en este campo de investigación fue en la década de los setenta cuando los investigadores trasladaron el énfasis de sus trabajos desde lo que ocurría en organismos enteros a lo que ocurría a nivel tisular y celular, llevando posteriormente sus trabajos a predecir los impactos para la calidad de vida de los seres humanos.

La toxicología acuática estudia los efectos de productos antropogénicos de origen químico que pueden tener efectos adversos sobre los organismos acuáticos a distintos niveles, desde un impacto a nivel subcelular hasta un efecto sobre las comunidades y ecosistemas. Es una especialidad multidisciplinaria relativamente nueva que incluye el desarrollo, la aplicación y la validación de métodos que determinen el efecto de los estresores en los organismos. Las investigaciones están basadas en la bioacumulación de tóxicos desde el agua, el alimento y los sedimentos (las fuentes de contaminación pueden ser puntuales -plantas de tratamientos, desagües-, o difusas -zonas agrícolas, urbanas-); los factores físicos, químicos y biológicos que afectan dichos procesos, y las relaciones entre los procesos llevados a cabo en el laboratorio y los procesos que ocurren en los ecosistemas acuáticos en las respuestas a los contaminantes. La toxicología acuática incluye estudios de estandarización de métodos de testeo de exposiciones crónicas y agudas, toxicidad de los sedimentos y ensayos dietarios, y estudios de sensibilidad a los contaminantes por especies en riesgo como son los peces, los anfibios y moluscos [143]. En cuanto a los bioensayos, las exposiciones se clasifican de acuerdo a la magnitud del período de exposición al xenobiótico en: crónicas (duran entre el 10% y 100% del período de vida del organismo), subcrónicas (corta duración, menos del 10% del período vital) y agudas (un sólo evento) [11]. Según la renovación del tóxico las experiencias pueden ser estáticas (el medio de exposición no se renueva), semiestáticas (estáticas con renovación) y de flujo continuo.

Cuando se obtienen respuestas definidas para cada concentración es posible realizar gráficos de concentración-efecto (o dosis-respuesta) graficando en Y los efectos causados en los organismos a la exposición a un tóxico y en X los distintos valores de concentración del tóxico a los que fueron expuestos los organismos. En el caso de las poblaciones se obtienen porcentajes de la población que presentan determinada respuesta ante cada concentración. En estos casos se grafican en el eje Y el % de población que presenta un determinado valor de la respuesta y en el X el logaritmo de las concentraciones obteniendo una curva de forma sigmoidal. A partir de estos conceptos es posible entonces graficar las curvas dosis (o concentración) – respuesta. Para representar estas curvas se acostumbra a utilizar concentraciones que producen una respuesta igual a la mitad de la Emax: CE₅₀ (concentración efectiva 50) y CL₅₀ (concentración letal 50) [11]. Otros parámetros muy utilizados en toxicología son:

- LOAEL (*lowest Observed Adverse Effect Level*): nivel experimental más bajo, en el estudio crítico, en el que se observa que se produce el efecto adverso.
- NOAEL (*Non Observed Adverse Effects Level*) es el nivel de exposición experimental que representa el máximo nivel probado al cual no se observan efectos tóxicos.

En cuanto a los efectos causados por los plaguicidas, cabe destacar que la naturaleza lipofílica de los mismos favorece el particionamiento en los sistemas biológicos. Existen pocos estudios sobre exposiciones a concentraciones sub-letales o de exposición a mezclas de plaguicidas. Esto es de fundamental importancia ya que los organismos acuáticos en realidad se encuentran mas probablemente expuestos a bajas concentraciones de distintos plaguicidas [144].

1.6 Marco geográfico e importancia regional del estudio de plaguicidas

Dos terceras partes de la República Argentina son parte de la Patagonia, con 770.000 km², donde la cría ovina, el gas y el petróleo son las actividades principales de la zona. Debido a las características del suelo y el clima, la actividad agropecuaria es parte de la economía nacional y regional.

La Provincia de Río Negro situada en el norte de la Patagonia posee una superficie de 203.013 km² y una población de 633.374 habitantes, donde los factores geográficos y climáticos (las lluvias anuales varían de este a oeste entre los 180 mm y los 3.800 mm) definen la actividad económica y poblacional. La Provincia de Neuquén, ubicada en la región noroeste de la Patagonia, tiene una superficie de 94.078 km² (2,5% del total nacional) y una población de 550.344 (Censo 2010, <http://www.censo2010.indec.gov.ar/>).

La actividad frutícola de la zona Nor-Patagónica se concentra en cuatro zonas distintas: el Alto Valle, el Valle Medio, Gral. Conesa y Río Colorado. El Alto Valle es una unidad económica productiva con una parte en la Provincia del Neuquén y otra en Río Negro. Se trata de un valle donde la confluencia de los ríos Neuquén y Limay da origen al río Negro (Figura 28). Este valle de forma de "Y", se encuentra limitado en ambos lados por barrancas de formación sedimentaria y se extiende a lo largo de 65 km junto al río Neuquén, 50 km a lo largo del Río Limay y 120 km aguas abajo de la confluencia del Río Negro.



Figura 28. Izq. Vista aérea de la confluencia de los ríos Negro y Neuquén (Google Earth), der. Vista aérea de la zona del Valle productivo (INTA, web).

1.6.1 Tipos de plaguicidas aplicados en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén

La región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén es productora principalmente de manzanas y peras, con aproximadamente 50.000 has destinadas al cultivo de dichos frutales. La principal plaga que afecta los manzanos y perales es la carpocapsa (*Cydia pomonella*), la cual es combatida principalmente con la aplicación de plaguicidas OF. Los principales principios activos utilizados en la región para combatir dicha plaga se resumen en la tabla 1 [8].

Principio activo	Clase toxicológica	Volumen vendido (L ó kg)	Superficie tratada	Aplicaciones por hectárea
Metil azinfos	IB	613.405	199.068	3,83
Carbarilo	II	179.480	49.856	0,96
Clorpirifós	II	22.500	6.250	0,12
Fosmet	II	25.425	7.063	0,14
TOTAL		840.810	262.236	5,00

Tabla 1. Principios activos más importantes utilizados para el control de carpocapsa [8].

La aplicación de los plaguicidas afecta al ecosistema en general a través de la contaminación, ya sea por escurrimiento, percolación o corrientes de aire, siendo absorbidos por constituyentes bióticos y abióticos y transportados y almacenados a distintos niveles por absorción o acumulación de los plaguicidas a través de la cadena alimentaria [145] (Figura 2). Esto termina teniendo un efecto negativo en la salud humana, ya sea por ingestión, contacto y/o inhalación de los mismos causada no sólo por la contaminación ambiental sino también por el uso ocupacional. Por otro lado, cabe destacar que los residuos originados a partir de la aplicación de estos plaguicidas (envases, contenedores) son también contaminantes potenciales del ambiente sobre todo por el hecho que los establecimientos que aplican dichas sustancias no siempre cumplimentan las normativas de desecho de los recipientes (el 100% de los encuestados en el trabajo realizado por Anguiano y colaboradores conoce el mecanismo de triple lavado pero sólo el 23% lo realiza correctamente [8]), y los que así lo hacen, padecen los problemas asociados a los mecanismos de recolección y deposición de los mismos, que es llevado a cabo por los municipios de la región, y que no posee un eje coordinador que lo haga realmente efectivo (84% acumula los recipientes para su recolección y deposición final que lo realiza un organismo público o privado [8]).

Según Eddleston y colaboradores, 3 millones de intoxicaciones agudas ocurren cada año, 220.000 de ellas fatales [146]. Se ha reportado por otro lado que las exposiciones prolongadas a bajas dosis de plaguicidas afectan el sistema respiratorio y hormonal de los pobladores rurales con efectos teratogénicos, hepatotóxicos, genotóxicos, carcinogénicos y otros. Toda la población se encuentra expuesta a los plaguicidas, ya sea por contaminación ambiental (productos de degradación física y biológica en aire, agua y alimentos) u ocupacional (formulación, manufactura y aplicación de los plaguicidas) [8]. A su vez, la población infantil se encuentra particularmente afectada por los plaguicidas ya que se encuentran en contacto constante con superficies contaminadas. Otros estudios han demostrado que existe un efecto negativo sobre mujeres embarazadas y recién nacidos causados por la exposición prenatal a plaguicidas [147, 148]. Por todo lo anteriormente expuesto es de fundamental importancia la implementación de políticas educativas y de prevención para la población en general y en particular a

aquellos que están en contacto con los plaguicidas, a fin de que reconozcan los riesgos y se comprometan con la manipulación de los mismos y el manejo de desechos. Debe aplicarse desde el estado, a su vez, una seria política de recolección y manejo de los residuos contaminantes e implementación de buenas políticas agrícolas. A la par de dichas políticas preventivas, deben desarrollarse a su vez técnicas de diagnóstico rápidas y efectivas utilizando biomarcadores de exposición tempranos a plaguicidas OF, más sensibles que los que se han venido utilizando en los últimos años y que denoten efectos de exposición temprana aún cuando las actividades específicas de las enzimas no se han visto afectadas (Ej.: AChE).

1.7 Antecedentes en nuestro laboratorio

Existe una preocupación fundada en la región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén acerca de los múltiples efectos colaterales e indeseados como resultado del alto nivel de aplicación de plaguicidas en la producción fruti-hortícola. Los organismos acuáticos muestran una alta sensibilidad a los compuestos OF, lo cual se explica parcialmente por el proceso de bioacumulación de dichos compuestos en los organismos desde el agua debido a la naturaleza lipofílica de los mismos [149]. Los anfibios son particularmente sensibles a numerosos contaminantes ambientales durante sus estadios embrionarios debido a la permeabilidad de su piel hacia sustancias tóxicas y la vulnerabilidad que causa la metamorfosis en el desarrollo larval [150]. Diferentes xenobióticos son capaces de afectar el normal desarrollo de anfibios durante su vida acuática, y/o impactar también la etapa adulta fundamentalmente a nivel reproductivo [151]. En nuestro laboratorio se han reportado los efectos de diversos plaguicidas OF, OCl y carbamatos sobre el crecimiento de los embriones y larvas de *R. arenarum* (sapo común sudamericano ampliamente distribuido en Argentina, Brasil, Chile y Uruguay, entre otros), influenciando su tamaño y su capacidad reproductiva, afectando en definitiva la supervivencia de los anfibios [152]. También se han venido estudiando desde hace un par de décadas, y se ha documentado ampliamente, los efectos deletéreos que

provocan distintos insecticidas en el desarrollo embrionario del sapo común *R. arenarum*. Por otro lado, se han detectado niveles subletales para los organismos acuáticos de OF y carbamatos en aguas superficiales de la zona del alto valle pero que excederían los parámetros necesarios para preservar la vida acuática, manteniéndose los mismos durante toda la época de crecimiento de los cultivos (Noviembre a Marzo) [153].

A partir del estudio a nivel bioquímico de los blancos enzimáticos y mecanismos de respuesta, se ha sugerido el empleo de los mismos como biomarcadores de exposición y efecto de diferentes agroquímicos en anfibios [135]. Los biomarcadores de toxicidad abarcan sistemas enzimáticos blanco de OF, como las colinesterasas y otras estererasas [154-156], las enzimas del sistema de defensa antioxidante [157], y algunos mecanismos de señalización y regulación de la expresión génica [158].

La exposición de las especies acuáticas a agroquímicos habitualmente usados en la región suele ocurrir en pulsos de breve duración. Es deseable entonces el empleo de modelos experimentales de exposición que se aproximen a las condiciones de campo para una mejor interpretación de la respuesta de los biomarcadores. El uso de diferentes biomarcadores a campo permitiría establecer el grado de exposición a contaminantes y adoptar medidas preventivas y correctivas para evitar un mayor impacto ambiental.

Resultados preliminares del LIBIQUIMA sugieren la alteración de la unión del ADN a FT relacionados a AP-1-RE y CRE y del patrón de fosforilación de proteínas en embriones de *R. arenarum* expuestos a los OF Mtn y metil azinfos [64].

2. HIPOTESIS

La exposición aguda de embriones de *R. arenarum* a concentraciones sub-letales de plaguicidas OF, en particular el Clp, afecta los mecanismos moleculares de señalización y control de reguladores de la expresión génica, aún cuando no se ven afectados los biomarcadores bioquímicos.

2.1 Objetivo general

Estudiar los efectos de los plaguicidas OF a nivel macroscópico, bioquímico y molecular durante el desarrollo temprano en anfibios. Determinar los mecanismos de acción y vías de señalización involucradas en los embriones ante el estrés producido por la exposición al plaguicida OF.

2.2 Objetivos particulares

- a) Determinar la toxicidad aguda al OF Clp en diferentes estadios embrionarios de *R. arenarum* a través de distintos parámetros toxicológicos.
- b) Determinar el poder teratogénico del Clp en el desarrollo embrionario de *R. arenarum*.
- c) Estudiar el efecto del Clp sobre el blanco primario de los OF, AChE, y su relación con la toxicidad aguda y la teratogenicidad.
- d) Analizar el posible estrés oxidativo y su respuesta por exposición al OF Clp en el desarrollo embrionario de *R. arenarum* a través de parámetros bioquímicos.
- e) Analizar la relación de efectos del Clp sobre el desarrollo y el metabolismo de las PAs.
- f) Analizar efectos del Clp a nivel molecular en vías de regulación de la expresión génica.

3.1 Compuestos Químicos

El plaguicida Clp (0,0-dietil 0- (3,5,5-tricloro-2-piridil fosforotioato) (pureza del 99%) fue comprado a Chem Service (West Chester, Pennsylvania, USA).

El GSH reducido, la acetiltiocolina (AsCH), la Albumina Sérica Bovina (BSA), el 1, cloro,2,4-dinitrobenzeno (CDNB) y el ditio-bis-nitrobenzoato (DTNB), fueron adquiridos a la empresa Sigma Co.(St. Louis, MO).

El reactivo Folin- Ciocalteau fue adquirido de la marca Anedra. Todos los otros reactivos utilizados fueron de grado analítico.

3.2 Anticuerpos

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-c-Fos (SC-253), anti-c-Jun (SC-44), anti-ERK 1/2 (SC-154), anti-PKC (SC-10800), anti-JNK (SC-572) y anti-p-c-Jun (SC-7981), todos adquiridos en Santa Cruz Biotechnology. El anticuerpo secundario utilizado en todos los casos fue anti ratón, conejo y rata acoplado a fosfatasa alcalina (B-1404) (Sigma Co.).

3.3 Mantenimiento de los ejemplares

Ejemplares adultos de la especie *R. arenarum* fueron adquiridos a un proveedor de la provincia de Buenos Aires (hasta el año 2.007) o capturados en el área de Los Barreales, Provincia de Neuquén (2.007 en adelante), y mantenidos al aire libre en un sapario ubicado en el predio de la Universidad Nacional del Comahue.

3.4 Inducción de las ovulaciones y fertilización

Un día antes de la inducción de la ovulación, se ingresaron hembras adultas de *R. arenarum* al laboratorio y se las mantuvieron en un recipiente con agua de la canilla (aproximadamente 1 cm) a 25°C con iluminación. Las ovulaciones de las hembras fueron inducidas en horario tarde/noche mediante una inyección intraperitoneal de 2.500 u. de Gonadotrofina Coriónica Humana (Laboratorios ELEA), o bien con la inyección de homogenato de hipófisis femenina y masculina en una proporción 2:1 por cada dos hembras a inyectar. Las hembras inyectadas fueron mantenidas en el recipiente con una base de agua y en un ambiente cálido, con luz encendida durante 12-12 hrs (ON) y hasta que comenzaran a expulsar los primeros ovocitos por la cloaca. Posteriormente, se procedió a desmedular las mismas utilizando una aguja fina, y los ovocitos fueron extraídos de los ovisacos cuidando de no cortar la red vascular. Los ovocitos así obtenidos fueron fertilizados inmediatamente en placas de Petri con un mínimo de solución Ringer para anfibios a fin de mantenerlos humectados (NaCl 0,65 g/l, KCl 0,01 g/l, CaCl₂ 0,02 g/l). Simultáneamente se ingresaron ejemplares machos al laboratorio donde se desmedularon y se les extirparon los testículos, los cuales fueron homogeneizados en solución Ringer en un mortero. Se procedió a inseminar los ovocitos con la solución concentrada de Ringer-esperma y luego de 15 minutos se completó con solución Ringer hasta cubrir los ovocitos, a fin de evitar la polispermia, y se los mantuvo en los recipientes durante 15 minutos más. Luego fueron transferidos a bandejas con Ringer anfibios hasta que alcanzaron el estadio de segunda hendidura. Se monitoreó su desarrollo utilizando una lupa estereoscópica.

3.5 Tratamientos

Se prepararon soluciones madre de Clp utilizando acetona en concentraciones de acuerdo a las necesarias para llevar a cabo las distintas experiencias. Las concentraciones nominales utilizadas en los distintos experimentos fueron de 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 20, 24, 28 y 32 mg/l, dependiendo el caso. A los recipientes utilizados para las exposiciones se agregó el volumen necesario para alcanzar las concentraciones a testear y manteniendo la proporción de 1 embrión/ ml medio Ringer anfibios completando hasta un 0,3% v/v del vehículo acetona. Los controles fueron llevados a cabo agregando la mayor concentración del solvente acetona presente en cada serie.

Se realizaron ensayos subcrónicos en condiciones semi-estáticas (estáticas con renovación), renovando el medio cada 48 hrs. Los embriones fueron mantenidos en recipientes iguales (entre los diferentes tratamientos y duplicados) para su desarrollo a una temperatura ambiente de 20–22°C y hasta alcanzar los estadios deseados en un cuarto denominado de acuáticos, destinado para tal fin. Se mantuvo un fotoperíodo de 12 hrs luz - 12 hrs oscuridad (Figura 29).



Figura 29. Exposición seriada a Clp de embriones de *R. arenarum* en el área de acuáticos del laboratorio de plaguicidas, LIBIQUIMA, Universidad Nacional del Comahue.

3.6 Toma de muestras y degangado

Cuando la toma de muestras se realizó en estadios en los cuales los embriones estaban inmersos en su ganga, hasta BC aproximadamente, se utilizó una solución de tioglicolato (1%) neutralizada con KOH en solución Ringer anfibios. En primer lugar, los embriones fueron lavados 4 veces en solución fría Ringer anfibios. El degangado consistió en colocar los embriones dentro de un pequeño vaso de precipitado y agregar 20 ml de ác. tioglicólico 1%. Se agitó suavemente hasta el desprendimiento de los embriones y se removió el ácido con pipeta Pasteur de plástico, para posteriormente enjuagar con solución Ringer anfibios. Un último enjuague fue llevado a cabo con buffer fosfato de potasio (PiK) 143 mM, EDTA 6,3 mM (pH 7,5).

3.7 Estudios toxicológicos

3.7.1 Determinación de la CL₅₀, asignación de estadios y estudio de las malformaciones

Brevemente, se realizó una búsqueda de rango para cada uno de los estadios estudiados y a partir de los resultados obtenidos, se procedieron a determinar los límites de las series definitivas de concentraciones utilizadas en cada caso.

Grupos de 50 embriones en el estadio de segunda hendidura fueron expuestos al OF en 50 ml de buffer Ringer a 2, 4, 8,10, 12, 14, 16, 20, 24, 28 y 32 mg/l de Clp, a fin de obtener la CL₅₀ en BC, LC y OC, y para determinar concentraciones subletales para los estudios posteriores. Los embriones control fueron desarrollados como se ha descrito previamente. Los tratamientos fueron realizados por triplicado y el desarrollo fue controlado diariamente con lupa

estereoscópica. Los embriones no fueron alimentados durante las experiencias. El desarrollo fue seguido utilizando la tabla de estadios de Del Conte y Sirlin [132] hasta alcanzar los estadios de GT, BC, RM, LC y OC, dependiendo el tipo de estudio, controlando luz y temperatura. Con cada toma de muestra se documentaron junto con los datos de estadios, las malformaciones, número de muertos y comportamiento de los embriones. El criterio de mortalidad fue imposible de determinar en los estadios previos a RM por lo que se utilizó como parámetro de efecto del OF el arresto de los embriones en el estadio inmediato anterior. En los estadios posteriores, los criterios de mortalidad fueron la ausencia de latido cardíaco y circulación sanguínea en branquias y aleta caudal. Con los datos obtenidos se construyeron las curvas de toxicidad como se muestra en los resultados. Los datos de mortalidad fueron sometidos al análisis de Probit [159] con el programa BASIC [160] para obtener las CL_{50} .

La concentración mas alta que no causa efecto observable (NOEC) fue determinada experimentalmente como la concentración máxima a la cual la mortalidad observada no fue significativamente diferente de los valores controles analizado por el test de varianza ANOVA- Dunnett.

Se documentaron los estadios y las malformaciones utilizando una cámara digital SONY Cybershot y una lupa esteresocópica marca Wild.

3.7.2 Estudios histológicos

Para la *fijación* de las muestras se tomaron 5 embriones de *R. arenarum*, controles y expuestos a 2 mg/l de Clp, y se fijaron embebiendo los mismos completamente en reactivo de Bouin durante 24 hrs a 4°C. Luego se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (70°, 90°, 95° y 100°) durante 10 minutos en cada uno para luego sumergirlos otros 10 minutos en xilol:etanol (1:1). Las muestras deshidratadas se embebieron en xilol puro (10 minutos), xilol-parafina (1:1) a 25°C por 25 minutos. Finalmente se pasaron 3 veces por parafina a 58°C por 25 minutos para formar el taco de inclusión. Todas las soluciones utilizadas en esta etapa fueron nuevas, no reutilizadas, y la parafina comprendió una mezcla

50/50 de Histoplast /Paraplast (Biopack). Se realizaron cortes transversales de los embriones de 5 μm en un micrótopo, dejándolos en agua 10 a 15 segundos a 42-46°C para luego montarlos en portaobjetos (Frosted HiFix, TNT). De esta manera se obtuvieron los preparados que posteriormente se utilizaron en el análisis histológico y en estudios inmunohistoquímicos.

Para la *rehidratación* se pasaron los preparados por xilol 100% dos veces durante 10 minutos y luego por una serie de etanol 100%, 95%, 90% y 70%, 5 minutos en cada uno. Finalmente se dejaron los preparados rehidratados en buffer TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM) (pH 7,5).

Tinción con Hematoxilina- Eosina: brevemente, los cortes rehidratados se sumergieron 5 minutos en Hematoxilina (Biopur diagnostics), 5 minutos en agua de la canilla (para eliminar el exceso de colorante), y 10 veces en etanol/ácido clorhídrico 1% v/v, para luego pasarlos nuevamente bajo el agua corriente. Finalmente se sumergieron en Eosina (Biopur diagnostics) durante 5 minutos y eliminando el exceso durante 2 minutos con agua corriente. Los cortes fueron deshidratados, siguiendo el protocolo previamente mencionado, y montados en bálsamo de Canadá (Biopack).

La técnica de *despigmentación* (o blanqueado) que se utilizó en el caso de los pruebas inmunohistoquímicas para poder mejorar la detección y evitar el enmascaramiento de la marca específica con los pigmentos presentes en los embriones, consistió en:

1. Remover parafina en xilol 100% durante 30 minutos a TA.
2. Acetona durante 5 minutos.
3. Solución blanqueadora durante 1 hora a 37 °C (20 ml Alcohol bencílico, 10 ml Acetona, 5 ml H₂O₂ 10% 33 vol. y 25% de solución de amoníaco).
4. Lavado con acetona: H₂O (1:1) durante 10 minutos.
5. Lavado con H₂O destilada durante 10 minutos.

Inmunohistoquímica: se bloqueó con una solución 2% BSA, 0,75% leche en polvo (Svelti Molico, Nestlé) durante 50 minutos a TA. La incubación con el anticuerpo primario (c-Fos) 1:100 fue realizada ON en cámara húmeda a 4°C para pasarla luego a TA durante 30 minutos. Se realizaron 2 lavados de 10 minutos a TA en Tris Salino-Tween (TTBS) (pH 7,5) (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, 5% Tween-20) y se incubó con TBS conteniendo 1:40.000 avidina-fosfatasa alcalina (Sigma A-7294) y 1:4.000 del anticuerpo secundario (Sigma A-1404) durante 90 minutos con agitación a TA en cámara húmeda. Finalmente se lavaron los preparados 2 veces en buffer TTBS durante 10 minutos a TA y se incubó en 5 ml de buffer de revelado para fosfatasa alcalina (AP) (Tris-HCl 100 mM (pH 9,0), NaCl 150 mM y MgCl₂ 1 mM), 33 µl de NBT (*nitro blue tetrazolium*) y 16,5 µl de BCIP (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate*) en oscuridad hasta el desarrollo de color. La reacción se detuvo con el agregado de H₂O destilada.

3.8 Biomarcadores bioquímicos

La concentración de plaguicida elegida para la medición de AChE fue de 2 y 8 mg/l para la determinación en embriones en estadios de GT, BC y LC y de 2, 4, 8 y 16 mg/l de Clp en el caso de en embriones en los estadios de BC en otra serie de experimentos. Para la determinación de la actividad específica de GST y catalasa se expusieron embriones hasta los estadios de GT y BC a una concentración subletal de 2 mg/l. Para la determinación del contenido endógeno de GSH se expusieron embriones hasta el estadio de BC a 2, 4, 8 y 16 mg/l del OF Clp.

3.8.1 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas para los ensayos enzimáticos fue determinada por el método de Lowry modificado [161]. Brevemente, se tomó 10 μ l del sobrenadante obtenido por homogenato de los embriones y centrifugación, y se llevó a un volumen final de 200 μ l con NaOH 0,1N. Se agregó a cada tubo 1 ml de solución mezcla conteniendo: Na₂CO₃ 2% en NaOH 0,1N, CuSO₄ 0,5% y tartrato de potasio 1%. Se dejó a TA durante 10 minutos y posteriormente se añadió 0,1 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1/2. Se mantuvo a TA por 30 minutos y se leyó la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1603, visible). Se utilizó BSA para realizar la curva estándar.

3.8.2 Actividad específica de acetilcolinesterasa (AChE)

Se utilizó el método de Ellman [162] con algunas modificaciones. Debido a que la actividad de dicha enzima es muy baja en los primeros estadios del desarrollo de *R. arenarum*, previamente reportado por nuestro laboratorio [2], se determinó la actividad específica de la AChE utilizando un lector de placas (Microplate reader, Thermo Max, Molecular Devices) con mediciones secuenciales durante media hora por lapsos de 30 segundos.

La enzima AChE cataliza la hidrólisis del sustrato, AsCH, para producir tiocolina y acetato. La tiocolina a su vez, reduce el DTNB a TNB, el cual absorbe a una longitud de onda de 412 nm. Los embriones fueron lavados en solución Ringer anfibios, mantenidos en hielo brevemente y homogenizados en 1 ml de buffer fosfato de potasio (PIK-EDTA) (PIK 143 mM, EDTA 6,3 mM) (pH 7,5). El homogenato fue centrifugado a 10.000 $\times g$ por 20 minutos a 4°C y el sobrenadante fue utilizado como fuente enzimática, las cuales fueron guardadas a -20°C hasta la determinación. La mezcla de reactivos utilizada contenía AsCH (100mM) en agua destilada como sustrato y DTNB (12mM) en buffer Tris HCl 10 mM (pH 8,0). Los blancos de reacción fueron realizados utilizando buffer en lugar de la muestra. La actividad específica fue calculada como se detalla más abajo y expresada en μ moles de producto liberado (5-tio-2-nitrobenzoato) por minuto por mg de proteína,

considerando un coeficiente de extinción molar de $13,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Como el sustrato utilizado fue AsCH, la enzima medida es mayormente AChE, sin embargo, al no haber utilizado ningún inhibidor selectivo de la BChE, las actividades medidas pueden ser consideradas de colinesterasas en general.

$$AE \text{ AChE } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg proteina}) = \frac{(\Delta\text{abs}_{412\text{nm}})/\text{min} \times VT \text{ (ml)} \times \text{dil}}{13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times V_{\text{enz}} \text{ (ml)} \times [\text{proteína}] \text{ (mg/ml)}}$$

3.8.3 Actividad específica de GSH S-aril transferasa (GST)

La actividad de GST fue ensayada mediante el método de Habig [163] con algunas pequeñas modificaciones. Los embriones fueron lavados en solución Ringer anfibios, mantenidos en hielo brevemente y homogenizados en 1 ml de buffer fosfato frío 66 mM, conteniendo sacarosa 25 mM (pH 7,0). El homogenato fue centrifugado a $16.000 \times g$ durante 20 minutos a 4°C y el sobrenadante fue utilizado como fuente enzimática. La actividad de GST fue determinada utilizando CDNB 0,5 mM disuelto en acetonitrilo 1% (v/v) y GSH 2,5 mM como sustrato, en un volumen final de 3 ml. Se inició la reacción con el agregado de 40 μl de muestra y se leyó la absorbancia de manera continua a 340 nm con lecturas de 1 minuto a 30°C [1].

La reacción enzimática es como sigue, lo que provoca un incremento en la absorbancia debido que el CDNB se utiliza como agente cromogénico:



Los valores de actividad fueron corregidos por reacción química espontánea monitoreando periódicamente los blancos de reacción.

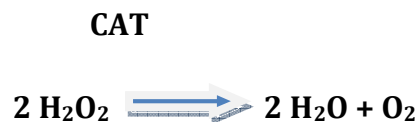
La actividad fue calculada como se muestra en la fórmula siguiente y se expresó como μmoles de CDNB conjugado por minuto por mg de proteína, utilizando el coeficiente de extinción molar para el producto de $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

$$AE \text{ GST } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg } \textit{proteína}) = \frac{(\Delta\text{abs}_{340 \text{ nm}})/\text{min} \times VT \text{ (ml)} \times \textit{dil}}{9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times V_{\text{enz}} \text{ (ml)} \times [\textit{proteína}] \text{ (mg/ml)}}$$

3.8.4 Actividad específica de Catalasa

La actividad específica de Catalasa fue determinada monitoreando el decrecimiento constante de la absorbancia a 240 nm de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (modificado de Beers and Sizer y Regoli [164, 165]).

La catalasa cataliza la siguiente reacción:



Para la medición se procedió a realizar un homogenato con 50 embriones en 1 ml de buffer PIK-EDTA (pH 7,5). Se centrifugó a $10.000 \times g$ a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ y se utilizó el sobrenadante. La mezcla de reacción para la medición de la enzima utilizada contenía 3 ml de buffer fosfato 50 mM (pH 7,0), y H_2O_2 25 mM. Utilizando una cubeta de cuarzo, se corroboró que la absorbancia del buffer y el sustrato estuviesen en 1 unidad de absorbancia. Hasta 20 μl de homogenato fue añadido para iniciar la reacción catalítica. La actividad específica fue expresada como mmol

de H₂O₂ hidrolizada por minuto por mg de proteína usando el coeficiente de extinción molar de 40 M⁻¹ cm⁻¹[3].

$$AE\ CAT\ (mmol/min/mg\ proteína) = \frac{(\Delta abs_{240nm})/min \times VT\ (ml) \times dil}{40\ mM^{-1}\ cm^{-1} \times V_{enz}\ (ml) \times [proteína]\ (mg/ml)}$$

3.8.5 Determinación del contenido de GSH endógeno

A fin de determinar la concentración de GSH endógeno, se procedió a degangar los embriones mecánicamente utilizando pinzas de tipo relojero, para evitar el uso de tioglicolato en el proceso de degangado químico que provoca una notable sobreestimación en el contenido de GSH. El grupo reducido de SH en el GSH reacciona con el reactivo de sulfhidrilos DTNB. El producto TNB por ruptura del puente S-S en el DTNB se detecta con un máximo de absorbancia a 412 nm.

50 embriones fueron homogenizados en ácido tricloroacético 5% a 4 °C luego del lavado con solución Ringer anfibios frío. Los homogenatos fueron centrifugados a 10.000 x *g* durante 20 minutos a 4 °C, y los sobrenadantes fueron utilizados para la determinación de GSH. A 200 µl de sobrenadante se agregó 1 ml de reactivo de Ellman (DTNB 1,5 mM en buffer PIK 0,25M (pH 8,0)). Luego de 15 minutos a TA se determinó la absorbancia a 412 nm. El contenido de GSH fue medido como tioles ácido solubles y expresado como nmoles de GSH/µg de proteínas Para realizar la curva de GSH estándar, se utilizó GSH reducido 0,1 mM [3, 64].

3.9 Poliaminas

3.9.1 Determinación de la actividad específica de L-Ornitina descarboxilasa (ODC)

La actividad de ODC fue determinada monitoreando la formación de [^{14}C] CO_2 a partir de L-[1- ^{14}C] ornitina, de acuerdo a la técnica detallada por Gaines y colaboradores [166]. Se homogenizaron 50 embriones en BC expuestos a 2, 4, 8 y 16 mg/l de Clp en 1 ml de buffer H (Hepes 10 mM, MgCl_2 1,5 mM, KCl 10 mM) (pH 7,4) y se centrifugaron durante 40 minutos a 20.000 x *g*. A 25 μl de muestra se le agregó 25 μl de buffer de reacción conteniendo: buffer base, inhibidores (Leupeptina 1 mg/ml, Aprotinina 1 mg/ml, PMSF 50 mM, y NaF 25 mM), piridoxal fosfato 5 mM, DTT 100 mM final, ornitina 100 mM (2 mM final), L-[1- ^{14}C] ornitina (200.000 dpm/ tubo) y H_2O destilada hasta volumen final. Para los blancos de actividad, las muestras se inactivaron con DMFO durante 15 minutos a 30 °C con agitación. Se prepararon tubos marca Polistor conteniendo un tubo de tipo eppendorf de 0,2 ml y papel de filtro rotulado y embebido en KOH 2 M donde se atrapó el $^{14}\text{-CO}_2$ producido. La reacción se inició con el agregado de muestras en el buffer de reacción y se incubó 1 hr; se detuvo con 50 μl de ácido perclórico 0,25N (1hr en agitación). Se secaron los papeles de filtro y se colocaron en viales de plástico conteniendo 500 μl de Triton X-20 1% v/v para el control de cuentas radioactivas en 5 μl de buffer de reacción. Se midieron las muestras en un contador de centelleo líquido. La AE fue expresada como nmol de $^{14}\text{-CO}_2$ liberado por hr por mg de proteína. La concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) fue calculada por regresión no lineal mediante un programa en BASIC desarrollado en el laboratorio.

3.9.2 Determinación de los niveles de poliaminas

La determinación de poliaminas (PAS) fue realizada mediante el uso de la técnica de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Se tomaron 50

embriones en el estadio de BC expuestos a 2, 4, 8 y 16 mg/l de Clp y se los degangaron como previamente se describió (3.4). Se homogenizaron los embriones en 1ml de buffer PiK-EDTA manteniéndolos en hielo y 50 µl de homogenato fueron utilizados para la determinación de la concentración de proteínas. Se procesaron 900 µl para la medición de PAs, a los cuales se les agregó 225 µl de HClO₄ 1N (concentración final 0,2 N) manteniendo los tubos con agitación en hielo por 1 hr. Luego se centrifugaron a TA durante 10 minutos a 12.000 rpm y se trasvasó el sobrenadante a un tubo limpio. Se prepararon los derivados dansilados de las PA, Put, Spd y Spm, y sus niveles fueron determinados de acuerdo al método de Schenkel [167]. Las muestras con concentraciones conocidas (estándares) de PA, fueron preparadas como se detalla a continuación (tabla 2):

Put	Tubo 1	2nmol/tubo	5 µl de Put 96,7 nmol/ml + 45µl de HClO ₄ 0,2N
	Tubo 2	20nmol/tubo	50 µl de Put 96,7 nmol/ml
Spd	Tubo 3	0.5nmol/tubo	5 µl de Spd 65,3 nmol/ml + 45µl de HClO ₄ 0,2N
	Tubo 4	5nmol/tubo	50 µl de Spd 65,3 nmol/ml
Spm	Tubo 5	0.2nmol/tubo	5 µl de Spm 67 nmol/ml + 45µl de HClO ₄ 0,2N
	Tubo 6	2nmol/tubo	50 µl de Spm 67 nmol/ml

Tabla 2. Detalle de preparación de los estándares de concentración de Put, Spd y Spm para la determinación de los niveles de PAs endógenas.

A 50 µl de muestra (mismo volumen de estándares), se les agregó 30 µl de solución saturada de Na₂CO₃ (para neutralizar el HClO₄), 75 µl acetona y 75 µl cloruro de dansilo (20 mg/ml acetona). Las muestras se dejaron dansilar en oscuridad a TA durante 16 hrs y se detuvo la reacción con el agregado de 50 µl de prolina (0,1 g/ml de agua) a cada uno de los tubos. Luego de agitar los tubos unos segundos, se dejó reaccionar durante 2 hrs en oscuridad. Para finalizar la reacción,

se agregaron a cada tubo, 300 μ l de tolueno y se tomaron 200 μ l de la capa superior orgánica. El remanente líquido se evaporó bajo corriente de N_2 y el *pellet* fue resuspendido en 200 μ l de acetonitrilo. Los niveles de PA dansiladas fueron determinadas por HPLC en fase reversa en el departamento de química biológica de la Universidad de Buenos Aires. La cromatografía líquida fue realizada utilizando un cromatógrafo líquido Spectra-Physics (Spectra-Physics Analytical, Inc., Fremont, California) con una bomba de gradiente SpectraSERIES P200 y un detector de fluorescencia Spectra SYSTEM FL-2000 (exc. λ 342, em. λ 512). Se utilizó una columna μ Bondapak C18 (tamaño de la partícula 10 μ m, Waters Corporation, Milford, MA) de 3,9 mm \times 30 cm. La misma fue equilibrada con acetonitrilo en agua al 40% previo a la inyección de las muestras (20 μ l). Las PAs fueron eluidas con un gradiente lineal de 30 minutos a partir de acetonitrilo al 40% en agua hasta acetonitrilo 100%. La tasa de flujo fue de 1 ml/min.

3.10 Estudios moleculares

3.10.1 Extracción de proteínas nucleares

Se realizó una extracción de proteínas a partir de 200 embriones en los estadios de GT y BC expuestos a 0, 2, 8 y 14 mg/l de Clp (según corresponda), en buffer de homogenato (H) (Hepes 10 mM (pH 7,4), $MgCl_2$ 1,5 mM, KCl 10 mM), DTT 50 mM, Leupeptina 1 mg/ml y Aprotinina 1 mg/ml como inhibidores de proteasas. Se centrifugó a 1.000 $\times g$ por 10 minutos a 4 °C, el *pellet* fue lavado 3 veces con Buffer H (s/inhibidores) y resuspendido en buffer de extracción (E) (Hepes 20 mM (pH 7,4), glicerol 25%, NaCl 0,42 M, $MgCl_2$ 1,5 mM, EDTA 0,2 mM), conteniendo DTT 50mM, PMSF 50mM, Aprotinina 1 mg/ml y Leupeptina 1 mg/ml. Las muestras fueron homogeneizadas y transferidas a un tubo limpio donde se las dejó reposar por 30 minutos en hielo. El homogenato se agitó por 30 minutos a 4 °C y se centrifugó nuevamente a 16.000 $\times g$ por 20 minutos a 4 °C.

3.10.2 Ensayo de Retardo de la Movilidad Electroforética

A fin de determinar el efecto del OF sobre la unión del FT AP-1 y su sitio de unión en el ADN, se utilizaron las muestras obtenidas tal como se detalla en el punto 3.10.1 como fuente de proteínas. Previo al ensayo, se constató la integridad de los oligonucleótidos TRE (GATCATGACTCAGGA) corriendo los mismos en un gel de agarosa al 1%. Una vez verificado lo anterior, se prepararon los oligonucleótidos doble cadena (ds) mezclando 100 ng de oligonucleótidos sentido y 100 ng de antisentido (1:1 en masa) a fin de obtener 100 ng/ μ l de oligonucleótidos ds final. Dicha mezcla se calentó a 100 °C en H₂O por 5 minutos y se dejó enfriar hasta llegar a TA. Para la marcación de los oligonucleótidos, se utilizó el kit de marcación T4 Kinase (Invitrogen), agregando a la reacción 100 ng de ADN ds y 100 μ Ci de ³²P- γ ATP. Se purificó la sonda marcada utilizando una columna de Sephadex G-25 con ADN de esperma de salmón y eluyendo con 200 μ l de buffer TE (Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), EDTA 1 mM) que se fue recolectando en los distintos tubos. A una fracción de estos (2 μ l) se les midió la radioactividad en un contador de centelleo (Wallac, Winspectral) y se determinó en cual de las fracciones se eluyó la sonda marcada radioactivamente con ³²P- γ ATP. A dicho tubo se le agregó NaOH 0,2 N final (Figura 30).

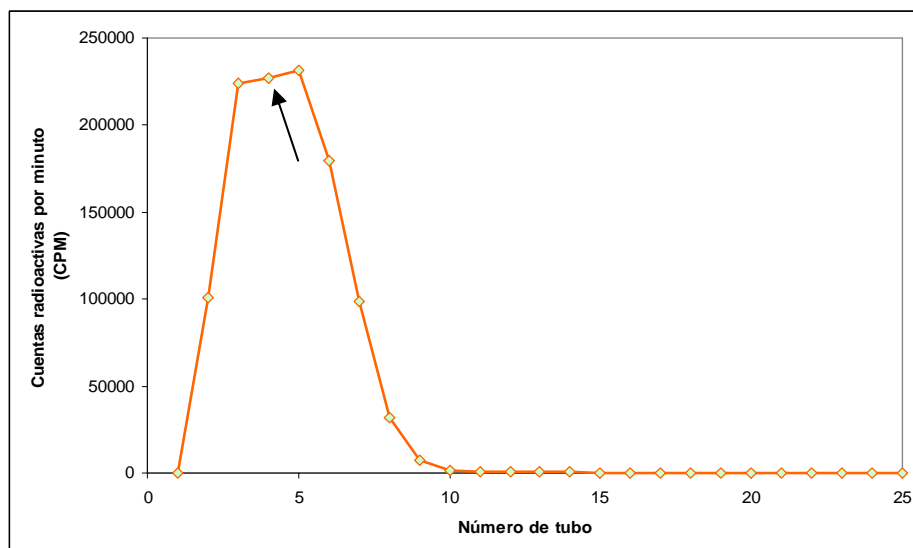


Figura 30. Cuantificación de las cuentas por minuto (CPM) de las distintas fracciones provenientes de la mezcla de marcación de la sonda luego de ser purificadas utilizando una columna de Sephadex G-25. En los tubos 4, 5 y 6 se obtuvo a sonda purificada. La flecha indica el tubo del cual se tomó la sonda marcada radioactivamente para la realización del EMSA.

Posteriormente se realizó la unión proteínas/ oligonucleótidos utilizando una mezcla de reacción 6x (ClK 1,2 M, EDTA 6 mM, DTT 6 mM y MgCl₂ 30 mM), el heteroduplex sintético de ADN para prevenir el pegado inespecífico, poli dI-dC 0,15 µl, 200.000 cpm de los oligonucleótidos ds marcados, 20 µg del extracto de proteínas nucleares correspondientes a embriones en el estadio de BC, y Tris-HCl 50mM (pH 8,0) hasta un volumen final de 30 µl. Se incubó la mezcla durante 30 minutos a TA con o sin oligonucleótidos específicos fríos conteniendo sitios de unión para los FT AP-1 o SV40 (competidores específicos o inespecíficos respectivamente de la unión del oligonucleótido). Por último se prepararon aproximadamente 70 ml de un gel de poliacrilamida al 4% y se lo recorrió a 150 V durante 30 minutos a TA. Se sembraron las muestras y una vez que el buffer de carga (LB) alcanzó la mitad del gel, se secó el mismo en un secador de geles sobre papel de filtro Whatman. El gel sobre el papel de filtro fue expuesto en placas radiográficas marca "KODAK" a -20°C durante 48 hrs y las mismas fueron reveladas manualmente utilizando líquidos revelador y fijador comerciales (KODAK).

Para los ensayos de *supershift* se utilizó el anticuerpo comercial para anti c-Jun (SC-44, SCBT) en una proporción 1:30, preincubandolos con los extractos proteicos nucleares durante 30 minutos a TA.

3.10.3 Ensayo de fosforilación

La fosforilación de proteínas se realizó de acuerdo a la técnica de Rubin y col. [168] adaptada por Randi y col. [169], con algunas modificaciones menores. Los embriones en el estadio de BC colectados luego de las exposiciones a 0 y 2 mg/l de Clp, fueron homogenizados en 10 volúmenes de buffer Hepes 25 mM (pH 7,4) conteniendo sacarosa 250 mM y los inhibidores de proteasas, Aprotinina 2 µg/ml y PMSF 2 µM. Se centrifugó a 1.000 x g durante 15 minutos para obtener la fracción nuclear (precipitado) y la reacción de fosforilación se realizó de manera inmediata a la obtención de las fracciones subcelulares. Se utilizó como buffer de reacción, Hepes 50 mM (pH 7,0) conteniendo: MgCl₂ 30 mM, EGTA 0,32 mM y β-mercaptoetanol 10 mM (agregado en el momento). En cada tubo (volumen final

100 μ l); se agregaron 100-150 μ g de proteína de la fracción correspondiente (resuspendidas en buffer de reacción), iniciando la reacción con el agregado de ATP 2 μ M y 20 μ Ci de 32 P- γ ATP.

Luego de 1, 5 o 10 minutos de incubación en un baño a 30 °C con agitación, se detuvo la reacción con el agregado de 50 μ l de buffer de *cracking* concentrado (buffer Tris 30 mM (pH 7,8), SDS 9% p/v, β -mercaptoetanol 6% v/v, sacarosa 10% p/v, azul de bromofenol 2% p/v), calentando las muestras a 100 °C durante 3 minutos. Además se realizaron determinaciones en paralelo utilizando ortovanadato 200 μ M final como inhibidor de tirosina fosfatasa y genisteína 2,5 μ M final como inhibidor de tirosina quinasas, colocándolos en el medio de reacción, y preincubando durante 10 minutos antes del agregado del 32 P- γ ATP. Las muestras fueron mantenidas a -20 °C hasta ser procesadas por electroforesis de proteínas (*SDS-PAGE* 10%) seguida de autorradiografía.

La electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida *SDS-PAGE* se realizó según la técnica de Laemmli [170]. Se utilizó un equipo Mini Protean II (BioRad) y Hoefer miniVe (Amersham Pharmacia Biotech), para geles verticales en placa. Los porcentajes de acrilamida/bisacrilamida del gel de separación variaron entre 7 y 12%, y el gel de concentración fue del 4,5%. La proporción de acrilamida/bisacrilamida se mantuvo constante (30 / 0,8 % p/v). La composición final del gel de separación fue: Tris-HCl 375 mM (pH 8,8) conteniendo EDTA 2 mM; SDS 0,1% p/v; y la cantidad necesaria de acril/bisacrilamida (30,8 %p/v). El gel de concentración utilizado contenía Tris-HCl 125 mM (pH 6,8), EDTA 2 mM, SDS 0,1% p/v, y la cantidad necesaria de acril/bisacrilamida (30,8 %p/v). Se utilizó un buffer de electrodo compuesto por Tris 50mM (pH 8,3), glicina 0,38 M y SDS 0,1%.

Las muestras provenientes de la fosforilación *in vitro*, a las cuales se les detuvo la reacción con el agregado de buffer de *cracking* concentrado, se sembraron directamente en los geles de *SDS-PAGE* correspondientes. La corrida electroforética se realizó a intensidad de corriente constante de 20 mA por gel, durante aproximadamente 2.0 - 2,5 hrs para posteriormente ser reveladas por exposición en autorradiografía del mismo modo que se describió anteriormente para el gel secado (sección 3.10.2).

La tinción inespecífica de proteínas totales, luego de la separación electroforética, se realizó con azul brillante de Coomassie (Coomassie blue). Brevemente, los geles se colocaron en un recipiente con agitación, junto con la solución colorante (metanol 40% v/v, ácido acético 10% v/v, y azul brillante de Coomassie (Sigma Co.) 0.1%) hasta tinción total, y se decoloraron hasta la aparición de bandas nítidas utilizando una solución decolorante (metanol 40% v/v y ácido acético 10% v/v).

3.10.4 Análisis de proteínas por *SDS-PAGE* y *Western Blot*

100 µg de proteínas nucleares obtenidas tal como se encuentra detallado en el punto 3.10.1, fueron separadas en un gel 10% *SDS-PAGE* y luego transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Sigma Co.) durante 60 minutos a 300 mA, de acuerdo al método de Laemmli [170]. Las membranas fueron teñidas con Ponceau S para corroborar que en todas las calles había igual carga de proteínas. Luego se bloquearon las membranas con 5% de leche descremada en buffer TTBS durante una hora. Todos los geles fueron corridos con un marcador de peso molecular "Rainbow Marker" (Amersham, GE) el cual también fue utilizado para controlar la correcta y completa transferencia de las proteínas desde los geles hacia las membranas de nitrocelulosa. Los anticuerpos primarios fueron utilizados en una dilución 1:250 en buffer TTBS e incubado con la membrana a TA por 90 minutos. Las membranas fueron lavadas 3 veces durante 10 minutos con agitación e incubadas con el complejo: 1:40.000 avidina-fosfatasa alcalina (Sigma A-7294), 1:4.000 del anticuerpo secundario (Sigma A-1404) en TBS durante 90 minutos con agitación a TA. Luego de 2 lavados de 10 minutos con agitación, se incubaron las membranas con 5 ml de buffer AP, 33 µl de NBT y 16,5 µl de BCIP en oscuridad hasta el desarrollo de color. La reacción se detuvo con el agregado de H₂O destilada, las membranas fueron secadas en papel de filtro tipo Whatman y finalmente escaneadas para su posterior análisis. Para la determinación de los niveles de expresión, se sembraron la misma cantidad de proteínas en todas las calles y se corroboró con el teñido de las membranas transferidas utilizando

Ponceau S y la coloración de azul de coomasie al gel para determinar la transferencia completa de las proteínas.

3.11 Análisis de datos y estadística

Para el análisis de las actividades específicas de las enzimas testeadas y en la determinación de las PA, las medias y desviaciones estándar ($MEAN \pm SEM$) fueron calculadas para cada estadio embrionario utilizando los datos de dos experimentos independientes por duplicado y sus medidas promedios. Las diferencias estadísticas entre estadios y tratamientos fueron determinadas por el test de ANOVA y el test post hoc de Fisher de mínimas diferencias significativas (LSD).

El análisis de probit para determinar la CL_{50} fue realizado usando el programa PriProbit, versión 1.63, diseñado por Masayuki Sakuma (Kyoto University, Kyoto, Japan) (<http://bru.gmprc.ksu.edu/proj/priprobit/index.asp>).

Las corridas electroforéticas de los geles de movilidad, *Western blots*, y geles de fosforilación fueron analizadas utilizando el programa Image-J (National Institutes of Health, USA).

4.1 Estudios toxicológicos del Clp en embriones de *R. arenarum*

En este capítulo se exponen los resultados obtenidos frente a la exposición a concentraciones crecientes del plaguicida OF Clp, en los estadios embrionarios de BC, LC y OC. Los datos recolectados fueron arresto de los embriones en el estadio de BC y ausencia de latido cardíaco y circulación sanguínea en branquias y aleta caudal para los estadios de LC y OC, tal cual se encuentra especificado en materiales y métodos (sección 3.7.1).

Al analizar arresto en el estadio de BC (Figura 31), vemos que a partir de la exposición de embriones a concentraciones mayores a 16 mg/l del OF, el porcentaje de embriones arrestados se eleva considerablemente, alcanzando el 100% frente a una exposición a 32 mg/l. Concentraciones por debajo de 16 mg/l de Clp provocaron el arresto de menos del 20% de los embriones. A su vez, estimamos una NOEC (concentración más alta que no causa efecto observable) de 8 mg/l para el Clp en el estadio de estudio, la cual fue determinada de acuerdo a lo detallado en materiales y métodos.

En la figura se observa la gráfica sigmoidea teórica calculada utilizando la ecuación:

$$y = A1 + (A2-A1)/(1 + 10^{((LOGx0-x)*p)})$$

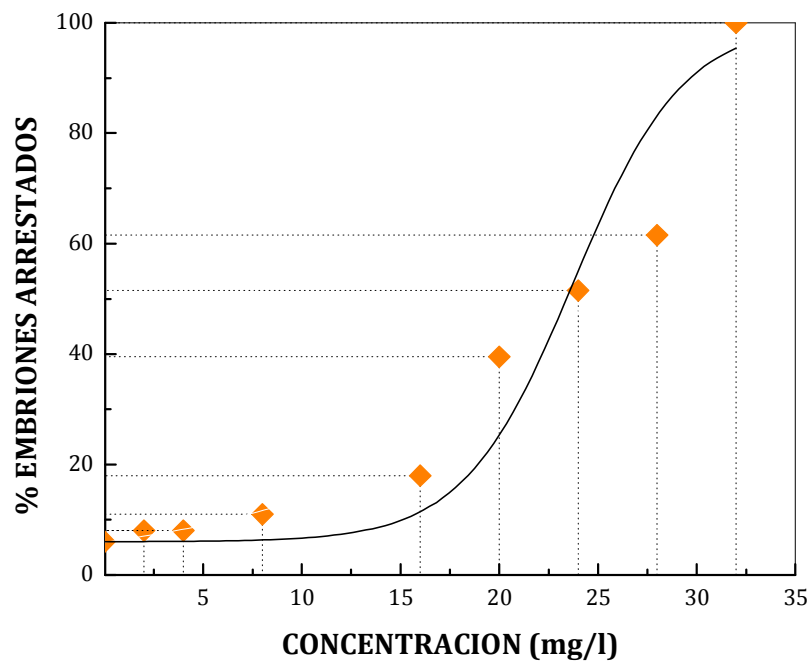


Figura 31. Porcentaje (%) de embriones arrestados en función de la concentración de Clp a la que fueron expuestos (entre 2 y 32 mg/l) hasta alcanzar el estadio de BC (48 hrs. de exposición). Datos promedio de dos experimentos independientes.

En la tabla 3 se pueden observar los resultados obtenidos a partir del análisis de probit para los estadios de BC, LC y OC. La mortalidad de los controles se encontró, en todos los casos, en valores alrededor del 10 %. Tal como se puede deducir de la tabla, la concentración necesaria para causar efecto disminuye a medida que nos acercamos al fin del desarrollo embrionario, principio del estadio larval, de los individuos (OC). La CL_{50} muestra una disminución de aproximadamente un 42% en OC respecto a la CL_{50} necesaria para causar arresto en BC, siendo dicha diferencia significativa tal cual se desprende del análisis de los intervalos de confianza (95%), donde no se solapan los límites. La CL_{50} obtenida para LC no evidencia diferencias significativas respecto de la obtenida para OC pero si de la CL_{50} en BC. En cuanto a la CL_{90} , no existen diferencias significativas entre los tres estadios. Aún así, en BC se estimó un valor 30% superior en relación al valor obtenido para OC. Al analizar las CL_{10} , nos encontramos con que en los estadios de LC y OC las mismas se encuentran dentro de los parámetros de mortalidad de los controles (sin valor estadístico) por lo cual sólo se informa dicho

estimado para el estadio de BC. Las pendientes obtenidas disminuyen a medida que nos acercamos al final del desarrollo, manifestando una mayor variabilidad entre individuos para el efecto observado en los estadios tardíos (en BC responden más homogéneamente a la exposición). Por otro lado, el análisis del Chi cuadrado que mide la bondad de ajuste (test de Pearson) y que se utiliza para analizar dispersiones, nos indica que existe un buen ajuste a los datos al modelo de probit, siendo LC el que mejor ajusta y BC el que menos lo hace.

	BC	LC	OC
Tiempo de exposición (hrs)	48	120	144
CL₁₀ (mg/l)	16,30 ^a	-	-
IC 95% (mg/l)	(12,39 , 18,62)	-	-
CL₅₀ (mg/l)	23,33 ^a	14,33 ^b	13,54 ^b
IC 95% (mg/l)	(21,04 , 25,70)	(13,30 , 16,20)	(11,04 , 15,38)
CL₉₀ (mg/l)	33.40 ^a	22.98 ^a	23.54 ^a
IC 95% (mg/l)	(29,47 , 43,00)	(19,06 , 36,99)	(19,53 , 39, 60)
χ²	12,87	1,90	3,20
Pendiente	8,22 ± 1,67	6,25 ± 1,71	5,33 ± 1,41

Tabla 3. Resultados obtenidos del análisis de Probit en los estadios de BC, LC y OC. Embriones recién fertilizados fueron expuestos a las concentraciones indicadas y durante el tiempo de desarrollo. Letras distintas acompañando los resultados de CL₁₀, CL₅₀ y CL₉₀ denotan diferencias significativas (p = 0,05).

4.2 Identificación y análisis de las malformaciones relacionadas con la exposición al OF Clp

4.2.1 Alteraciones morfológicas en los embriones tras la exposición a Clp

En este apartado en particular se muestran las alteraciones morfológicas del desarrollo de embriones expuestos a distintas concentraciones de Clp, hasta alcanzar diversos estadios del desarrollo embrionario. Las siguientes figuras nos permiten comparar algunos de los efectos a nivel morfológico, obtenidos en los estadios de GT (24 hrs), BC (48 hrs), RM (96 hrs), LC (120 hrs) y OC (144 hrs), y a concentraciones crecientes del OF (0 a 32 mg/l). En general, no se observaron diferencias entre embriones no tratados y aquellos que fueron expuestos a 2 mg/l de Clp en los primeros estadios.

En la figura 32 se muestran los efectos morfológicos obtenidos tras la exposición de los embriones al OF hasta alcanzar el estadio de GT (24 hrs de exposición). Ante la exposición a 2 mg/l no se observaron diferencias de ningún tipo respecto de los controles, pero a medida que se incrementó la concentración del OF se observó un fenómeno de gastrulación anómala. Se puede observar (indicado con flechas) en los embriones más afectados que no se completó el círculo en el labio dorsal del blastoporo lo que impide que se internalice el endodermo, producto de la epibolia del ectodermo y la involución de las células del mesodermo que migran hacia el interior del blastoporo y por debajo de la superficie. Incluso no fue posible individualizar las células que componen el botón vitelino, a diferencia de los que ocurrió con los embriones no tratados o expuestos a bajas concentraciones de Clp.

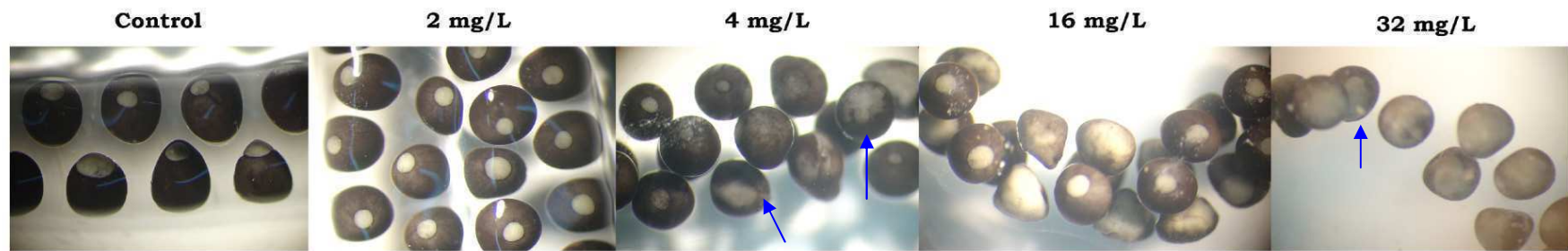


Figura 32. Embriones en el estadio de GT (24 hrs de exposición al OF Clp). De izquierda a derecha:
Embriones expuestos a o (control), 2 mg/l, 4mg/l, 16 mg/l y 32 mg/l.

En el estadio de BC temprano (48 hrs de exposición), los controles y los embriones expuestos a 2 mg/l no mostraron alteraciones notables (Figura 33 A-B) pero con exposiciones de 16 mg/l, (Figura 33 C) se documentaron algunos embriones presentando una curvatura axial dorsal pronunciada (flecha). Frente a la exposición a 32 mg/l de Clp, los embriones en BC mostraron un desarrollo totalmente irregular, resultando todos ellos en embriones no viables (considerados arrestados). Algunas de las malformaciones observadas a concentraciones superiores a 16 mg/l, aparte de la curvatura axial dorsal previamente reportada (Figura 33 C, Figura 34 A y B) fueron el cierre incompleto del tubo neural y embriones resultantes de eventos de exogastrulación (flechas) (esta última fue de las alteraciones morfológicas más recurrentes) (Figura 34 C). También se observaron otras alteraciones como embriones semi-formados, descamación celular y acumulación de células en el interior de la membrana de fertilización. El tiempo de desarrollo embrionario fue otro punto donde se observaron diferencias entre individuos controles y expuestos. Los tiempos que se detallan en las figuras corresponden al tiempo promedio que tardaron los embriones sin exponer en alcanzar los estadios indicados. Sin embargo, los embriones expuestos a altas concentraciones sufrieron retrasos para alcanzar los estadios respecto de los controles así como una marcada desincronización del desarrollo de los individuos de cada cohorte. Por otro lado, los embriones se encontraron rodeados por la ganga hasta la finalización del estadio de BC, comienzo del estadio de RM donde el mismo movimiento de los individuos colaboró en la eclosión de los mismos. Las gangas rodeando los embriones expuestos a concentraciones superiores a 16 mg/l evidenciaron diferencias respecto de la que rodeaba embriones no expuestos, siendo de mucha menor consistencia. Este hecho fue notable al momento de realizar el degangado, ya sea por métodos químicos o mecánicos.

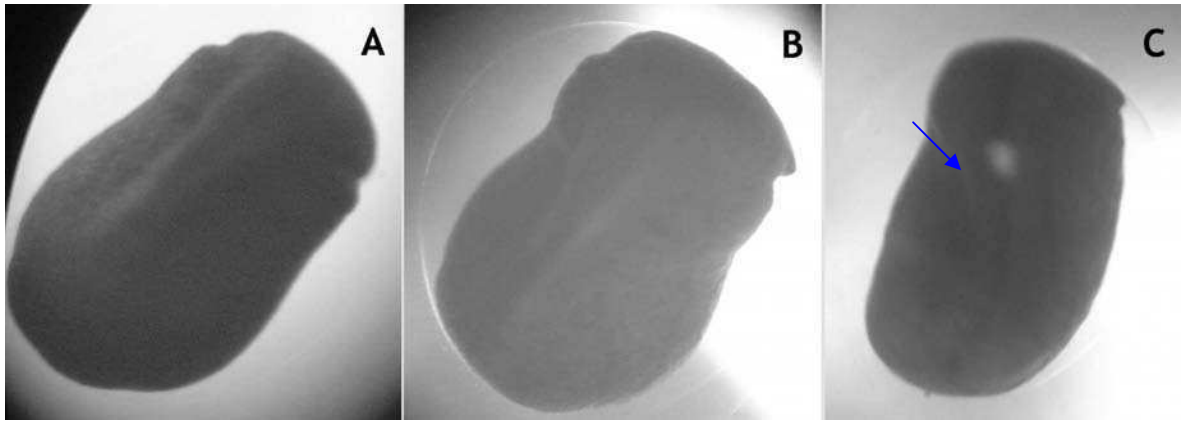


Figura 33. A) Control, B) 2 mg/l, C) 16 mg/l. Estadio de BC (48 hrs de exposición).

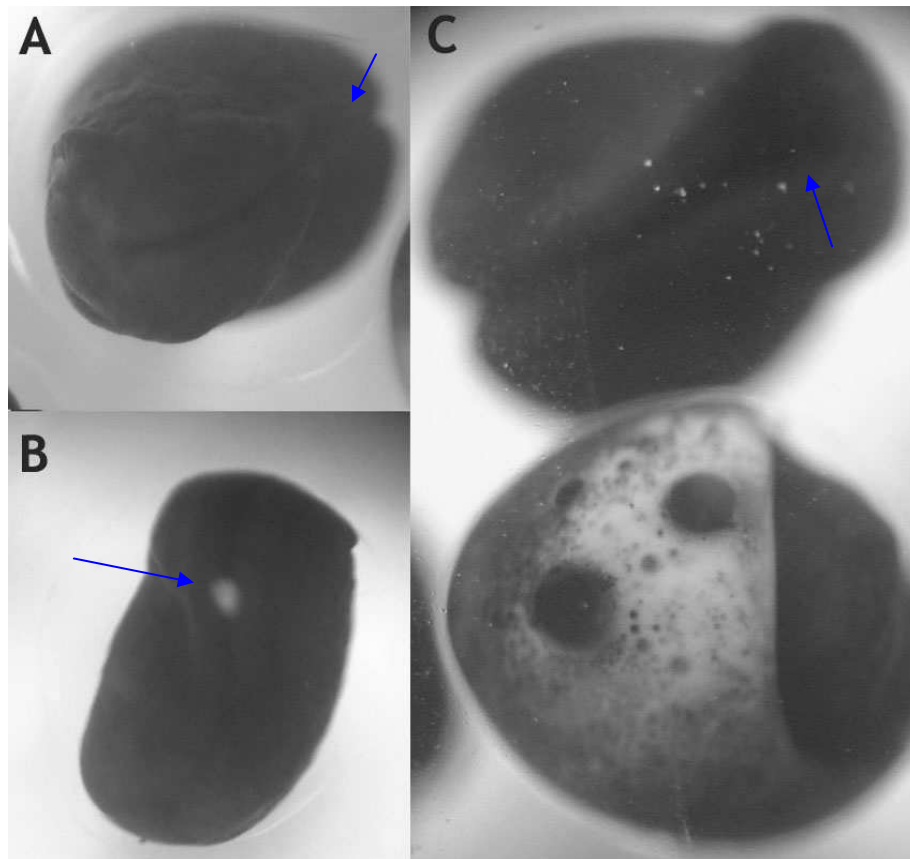


Figura 34. Vista de A) frente y B) superior de embriones en el estadio de BC. C) Cierre incompleto del tubo neural y exogastrulación observada en embriones en BC expuestos a 16 mg/l (48 hrs de exposición).

En la figura 35 (centro) se muestran anomalías respecto de la morfología corporal en embriones en el estadio de RM (96 hrs de exposición) expuestos a bajas concentraciones de Clp (2 mg/l) (Figura 35 izquierda). Otras malformaciones observadas fueron el acortamiento y la curvatura de la cola, y malformaciones de la cabeza, en individuos expuestos a 8 mg/l de Clp (Figura 35 derecha). Son claras las diferencias a nivel de la zona del pro- y mes-encéfalo, la curvatura hacia el interior del embrión de la columna vertebral y la irregularidad del contorno en general. En los estadios previos no se observaron malformaciones en embriones expuestos a tan bajas concentraciones del plaguicida. Otra diferencia notable se pudo observar en el movimiento de los embriones expuestos y los no expuestos, ya que en lugar de presentar la contracción característica del estadio, se observaron contracciones espasmódicas y sostenidas en el tiempo, en los embriones expuestos a altas concentraciones.

Los embriones expuestos a 8 mg/l del OF durante 120 hrs, y hasta alcanzar el estadio de LC, o estadio 19 de acuerdo a del Conte y Sirlin [132], mostraron un ensanchamiento de la zona ventral (ex endodermo vitelino) respecto de los controles y los embriones expuestos a bajas concentraciones (2 mg/l). Sólo en algunos individuos expuestos a 2 mg/l del OF se pudo observar curvatura axial, en cambio, embriones expuestos a 8 mg/l presentaron curvatura axial y de la aleta caudal (Figura 36). En la figura 37 se muestra en detalle el acortamiento de la aleta caudal y la curvatura dorsal

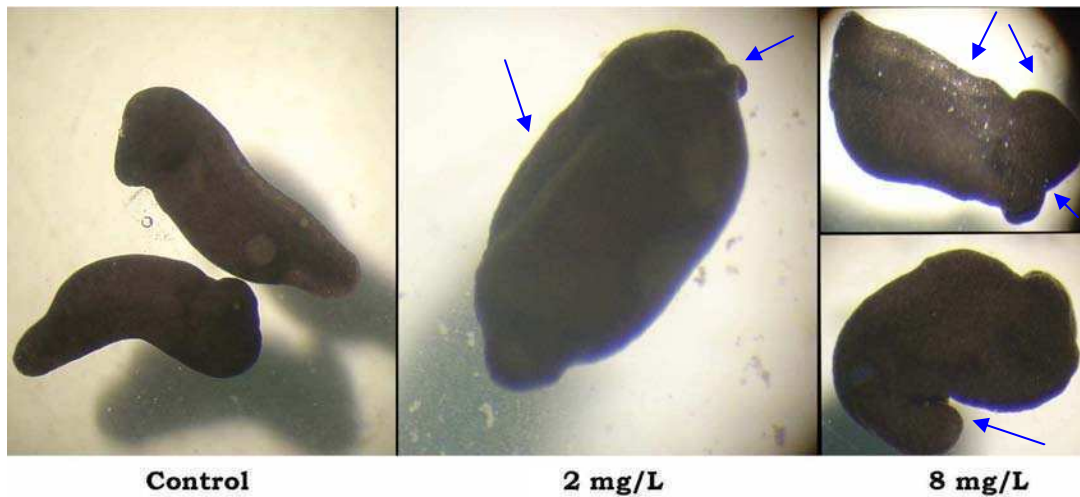


Figura 35. Izq.) Control, centro) 2 mg/l, der.) 8 mg/l. Estadio de RM (96 hrs de exposición).

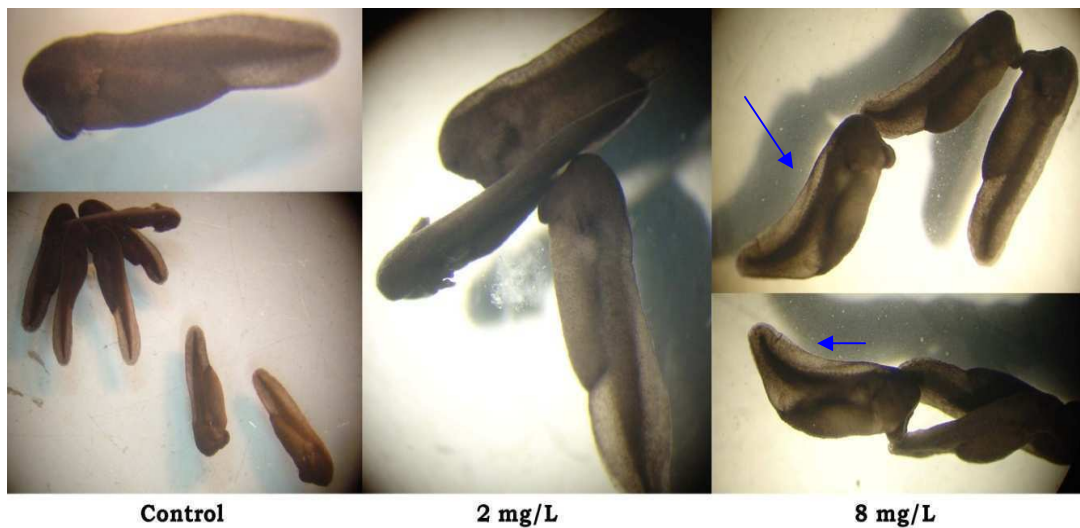


Figura 36. De izquierda a derecha: embriones expuestos a 0 (controles), 2 mg/l y 8 mg/l de Clp hasta alcanzar el estadio de LC (120 hrs de exposición).

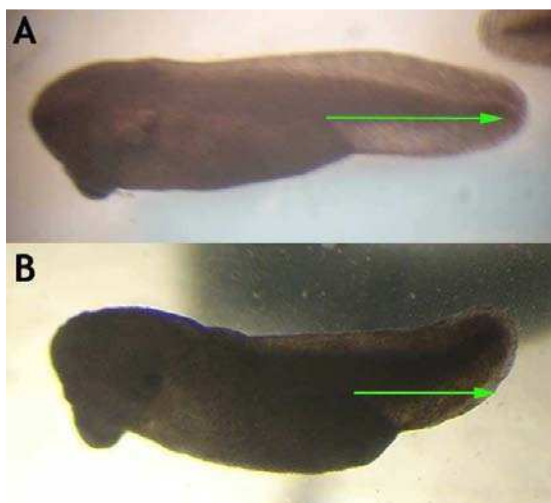


Figura 37. Embriones en el estadio de LC, A) control y B) expuesto a 8 mg/l del OF (120 hrs. de exposición).

Finalmente se analizaron anomalías en los embriones expuestos al OF hasta alcanzar el estadio de OC (estadio 25)[132], durante 6 a 10 días, de acuerdo a las distintas ovulaciones. En la figuras 38 (A-C) se muestran embriones control con desarrollo normal. En la figura 38 (A) se puede observar un embrión en detalle donde se individualiza la apertura de la boca así como estructuras internas, esto último gracias a que su pigmentación se ha visto reducida a lo largo del desarrollo embrionario lo que permite una piel más translúcida. La figura 38 (B) presenta embriones en una vista ventral y la figura 38 (C) nos permite visualizar dorsalmente el individuo. Se puede observar en esta última foto la posición lateral de los ojos. Las fotografías (D-F) muestran embriones en OC expuestos a 12 mg/l del OF. Las alteraciones producidas por la exposición al Clp fueron la curvatura total de la aleta caudal, pliegues en láminas, arqueamiento del eje corporal, reducción del tamaño del cuerpo y la cabeza, atrofia, disparidad en el crecimiento de los individuos y falta de movimiento. La exposición a concentraciones mayores de Clp (14 y 16 mg/l) permitió observar los mismos efectos previamente descritos pero más homogéneamente distribuidos en la cohorte expuesta, haciendo más evidente la teratogenicidad del OF en concentraciones cercanas a la CL_{50} . La figura 38 (G) muestra una vista lateral de la cabeza visiblemente malformada en comparación con lo que se observa en los individuos no expuestos figura 38 (A), así como también un desarrollo anormal del cuerpo del embrión, donde resulta imposible observar estructuras internas. También se observaron abultamientos (edema abdominal) en la zona posterior a la conexión cuerpo-cola (Figuras 38, I-J).

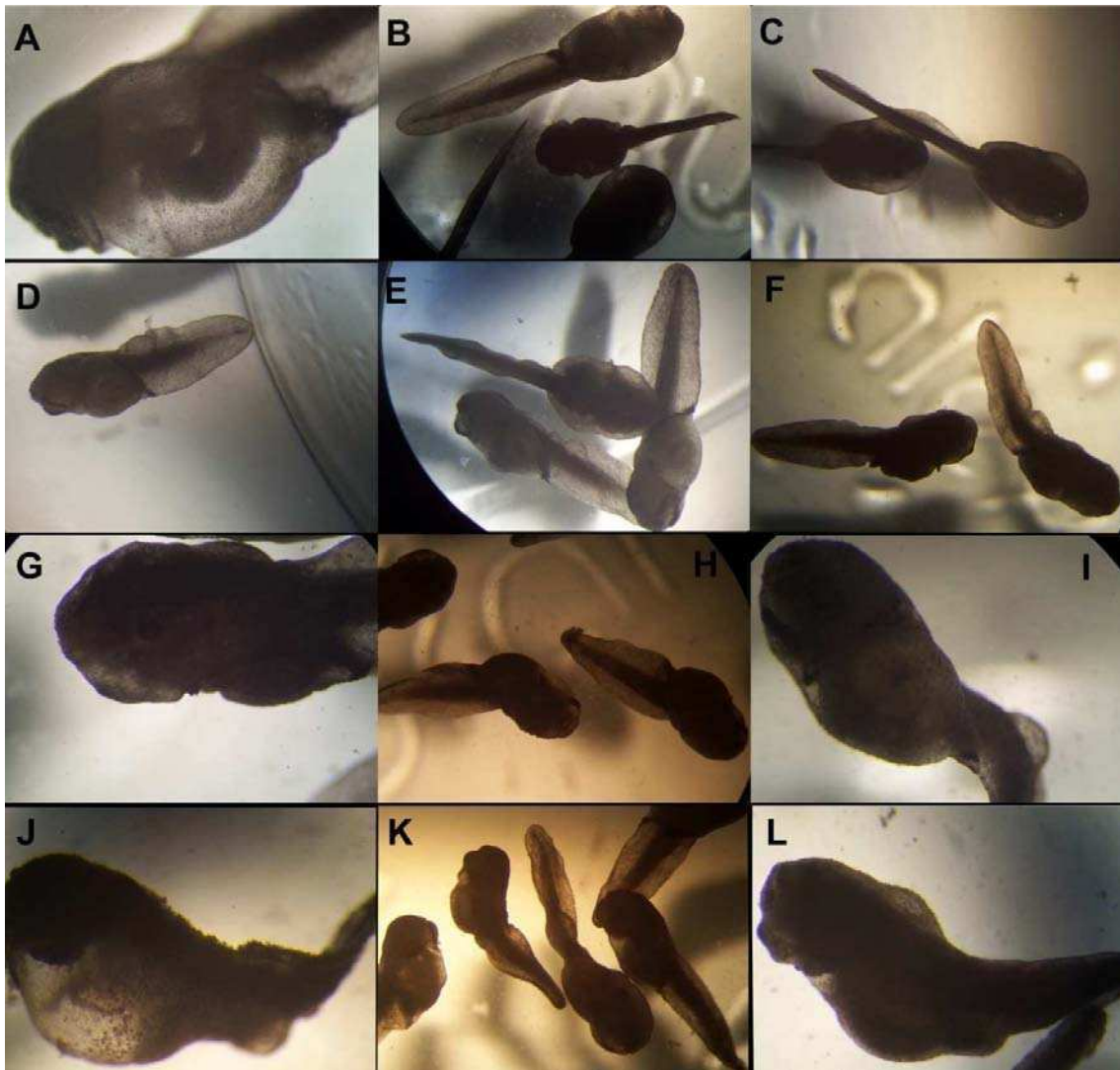


Figura 38. Alteraciones morfológicas observadas en el estadio de OC (6–10 días de exposición) en embriones de *R. arenarum*. (A-C) embriones no expuestos, (D-F) embriones expuestos a 12 mg/l de Clp, (G-I) embriones expuestos a 14 mg/l de Clp, y (J-L) embriones expuestos a 16 mg/l de Clp.

4.2.2 Análisis cuantitativo de las malformaciones inducidas por Clp

El Clp fue capaz de inducir distintas malformaciones morfológicas que se volvieron más evidentes a medida que la concentración de Clp se incrementaba, sobre todo a partir de embriones expuestos al menos durante 120 horas (LC) y a concentraciones por encima de 8 mg/l (Figura 39). Los embriones que alcanzaron el estadio de BC no presentaron un gran número de malformaciones a bajas concentraciones (2 mg/l), pero dentro de las pocas malformaciones observadas se detallaron anteriormente las más recurrentes (Figuras 33-34). En el estadio de LC se incrementaron las malformaciones en la población expuesta a concentraciones por encima de 8 mg/l del OF en estudio, y tras la exposición a 14 mg/l de Clp se alcanzó en la población aproximadamente un 30%. En cambio, el plaguicida en el estadio de OC, mostró un efecto que se incrementó bruscamente cuando se expusieron a los embriones a concentraciones superiores a 12 mg/l de Clp. A 14 mg/l el porcentaje de embriones malformados en OC alcanzó prácticamente el 70% de la población expuesta.

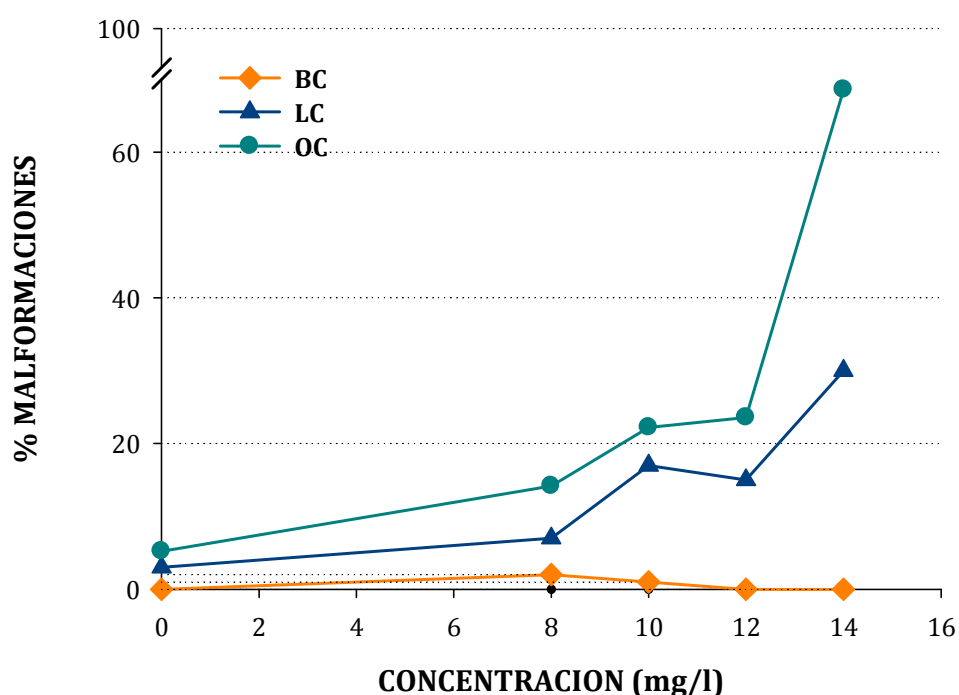


Figura 39. Gráfico dosis-respuesta: malformaciones en función de concentraciones crecientes del plaguicida OF Clp.

Acorde con la hipótesis inicial de trabajo, y una vez realizado el estudio tal como se muestra anteriormente, se optó por continuar con los experimentos utilizando como estadio de estudio principalmente el de BC (posterior a la transición de la blástula media, TBM) y una concentración subletal, para la mayoría de los experimentos, de 2 mg/l (inferior a 1/10 de la CL₅₀).

4.3 Estudios Histológicos

En la figura 40 se muestran tinciones con hematoxilina-eosina de cortes transversales de secciones en el eje antero-posterior de embriones de *R. arenarum* en estadio de BC temprano.

En los embriones expuestos a 2 mg/l de Clp se observan alteraciones a nivel del mesodermo dorsal, particularmente se observa una disminución en el tamaño de los bloques de células que forman las somitas (que darán lugar al cartílago, músculo, esqueleto y dermis), mesodermo intermedio con primordios pronéfricos de gran tamaño y en el mesodermo ventral donde hay ausencia o malformación de la aorta.

Otras alteraciones observadas fueron a nivel del ectodermo con tubo neural (da origen a la médula espinal y el cerebro) engrosado en cantidad de células, así como un canal central más grande. En general, en los distintos cortes no se observaron gran cantidad de células de la cresta neural en los cortes de embriones expuestos analizados.

Respecto de los derivados endodérmicos, no se observaron alteraciones a nivel del arquenterón, pero si un ensanchamiento del endodermo vitelino.

Las inmunohistoquímicas realizadas no pudieron ser analizadas debido al alto contenido de pigmentos en los embriones en el estadio de BC (datos no mostrados), los cuales interfirieron con los resultados, aún luego de aplicar las técnicas de despigmentación descriptas en materiales y métodos.

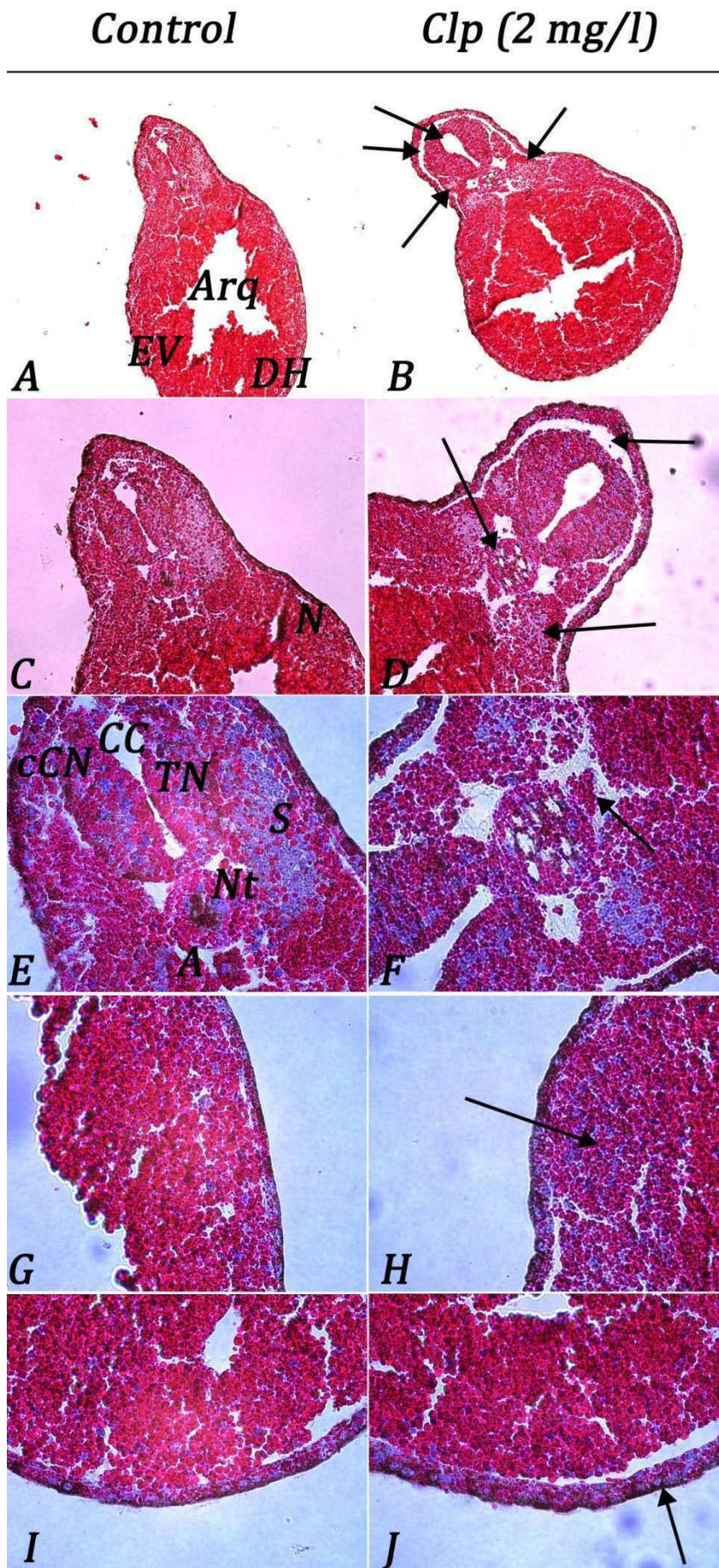


Figura 40. Tinción con hematoxilina-eosina en cortes transversales de embriones en el estadio de BC: (A-B) 10X, (C-D) 20X dorsal, (E-F) 40X dorsal, (G,H) 40X nefrótomos y (I-J) 40X ventral.

Izquierda:
Embriones control.

Derecha: exposición
a 2 mg/l de Clp.

(Arq) arquenterón,
(EV) endodermo vitelino, (DH) divertículo hepático, (N) nefrótomo, (CC) canal central, (cCN) células de la cresta neural, (TN) tubo neural, (S) somitas, (Nt) notocorda y (A) aorta.

4.4 Biomarcadores bioquímicos

Con el objetivo de analizar los efectos bioquímicos del OF Clp en el desarrollo embrionario, se decidió estudiar el efecto sobre la AChE (biomarcador primario de los OF) en GT, BC y LC; y las actividades específicas de enzimas involucradas en el sistema de defensa antioxidante catalasa y GST en embriones expuestos hasta GT y BC. Por otro lado, se analizó el contenido de GSH endógeno en individuos expuestos hasta alcanzar BC..

4.4.1 Cuantificación del efecto del Clp sobre la actividad específica de la AChE

La actividad de AChE se vio incrementada a lo largo del desarrollo embrionario de *R. arenarum* (Figura 41), lo cual se encuentra en concordancia con resultados previamente publicados [171]. La AChE mostró una actividad específica de 2.24 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ proteína en LC y de sólo 0.24 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ proteína en BC, lo que representa un incremento aproximado de la actividad de 9 veces en el estadio más avanzado del desarrollo. En GT se obtuvo una actividad de sólo el 50% de la registrada en BC (Figura 41, controles). En BC, con 2 mg/l del OF, hubo un incremento en la actividad de la enzima del 22%. En GT y BC, la exposición a 8 mg/l no afectó significativamente la actividad específica de la AChE, pero se observó un efecto inhibitorio; en BC disminuyó 32% respecto del control. Por otro lado, en LC, el efecto de inhibición fue significativo en embriones expuestos a la concentración más baja (34% de inhibición) y se incrementó aún más con 8 mg/l de Clp (66% de inhibición).

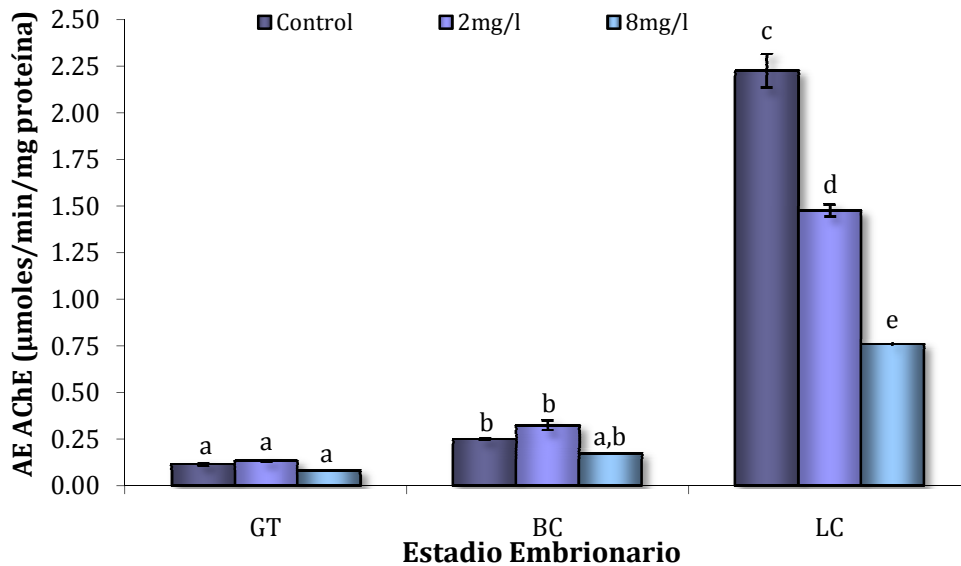


Figura 41. Actividad específica de la enzima AChE expresada como μ moles de producto liberado (5-tio-2-nitrobenzoato) por minuto por mg de proteína, en los estadios de gástrula tardía (GT), brote caudal (BC) y latido cardíaco (LC) en embriones controles y expuestos durante 24, 48 y 96 hrs respectivamente. Letras distintas denotan diferencias significativas entre los tratamientos, $p=0,05$.

Datos promedio de dos experimentos independientes.

A continuación se presentan los resultados obtenidos al analizar el efecto de distintas concentraciones del OF sobre la actividad específica de la enzima AChE en el estadio de BC. Se puede observar que a concentraciones de 2 y 4 mg/l la actividad se incrementa significativamente respecto del control (47% y 27% respectivamente). La respuesta del sistema ante la exposición a 8 mg/l se encuentra en los mismos niveles que los organismos control, sin diferencias significativas, pero a concentraciones mayores el efecto inhibitorio se hace evidente con una diferencia significativa respecto de los controles ($p=0,05$) (Figura 42). El grado de inhibición de AChE obtenido con la mayor concentración de Clp testada, hasta el estadio de BC, fue aproximadamente del 38% (0.48 μ moles/min/mg proteína en embriones expuestos a 16 mg/l frente a 0.77 μ moles/min/mg proteína en el control).

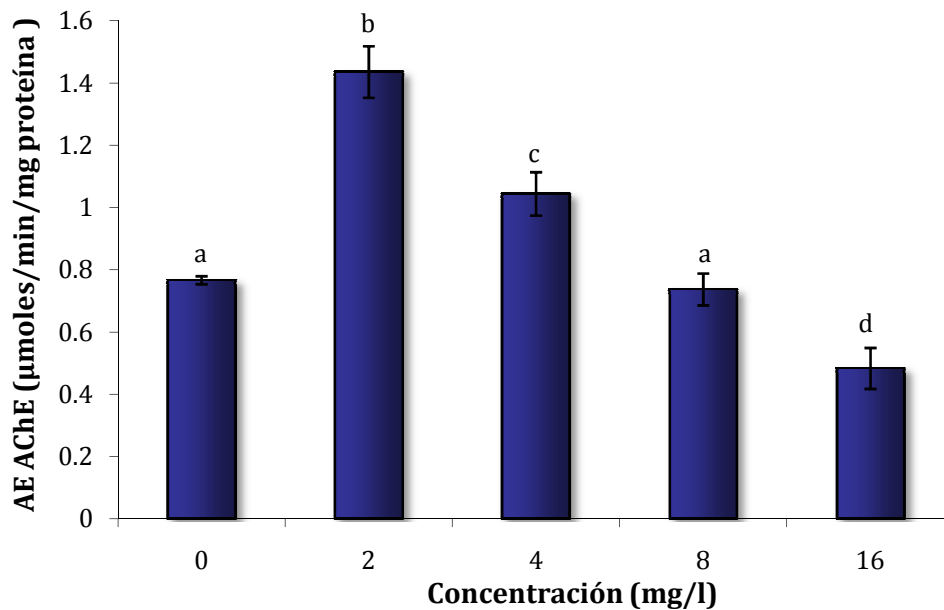


Figura 42. Actividad específica de la enzima AChE expresada como μ moles de producto liberado (5-tio-2-nitrobenzoato) por minuto por mg de proteína, en el estadio de brote caudal (BC) en embriones sin exponer y expuestos a concentraciones crecientes de Clp. Letras distintas denotan diferencias significativas entre los tratamientos, $p=0,05$. Datos promedio de dos experimentos independientes.

4.4.2 Efectos sobre el sistema de defensa antioxidante

Se determinaron las actividades específicas de GST y catalasa en embriones expuestos a concentraciones subletales de Clp, y hasta alcanzar los estadios de GT y BC. Luego se analizó el efecto del OF sobre los niveles de GSH.

Se observó una menor actividad de la enzima GST en los embriones expuestos a una concentración de 2 mg/l de Clp, respecto de los que no ha sufrido exposición al plaguicida en ambos estadios de desarrollo (Figura 43). El efecto pudo observarse en forma temprana a las 24 hrs, y al alcanzar el estadio de GT, con un porcentaje de inhibición de la actividad en embriones expuestos respecto de control del 26%. Este efecto se mantuvo a las 48 hrs, al alcanzar el estadio de BC, mostrando un porcentaje de inhibición, en individuos expuestos comparados con su control, del 44%. La actividad específica de la enzima fue similar en los controles de ambos estadios.

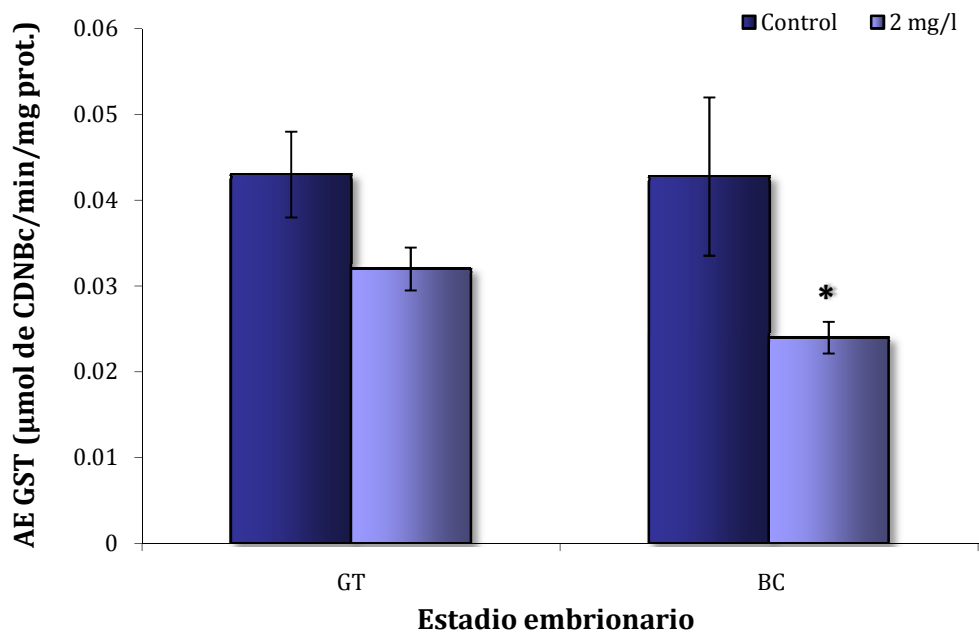


Figura 43. Actividad específica de la enzima GST expresada como μ moles de CDNB conjugado por minuto por mg de proteína, en los estadios de GT y BC en embriones expuestos a una concentración de 2 mg/l de Clp (*denota diferencias significativas entre control y tratado, $p = 0.05$). Datos de un experimento representativo de 2 experiencias independientes.

La actividad específica de catalasa mostró una disminución de la actividad específica en embriones en BC sin exponer respecto de individuos controles en el estadio de GT, o sea, su actividad disminuye significativamente con el estadio embrionario (alrededor de un 28%), al menos en etapas tempranas del desarrollo. En embriones expuestos a 2 mg/l del OF a 24 hrs (GT) la actividad específica se mantuvo prácticamente constante, sin verse afectada por la exposición al OF. En cambio, en embriones en BC expuestos a 2 mg/l de Clp la actividad de catalasa se vio disminuida respecto de embriones sin exponer, con un porcentaje de inhibición de aproximadamente un 28% (Figura 44).

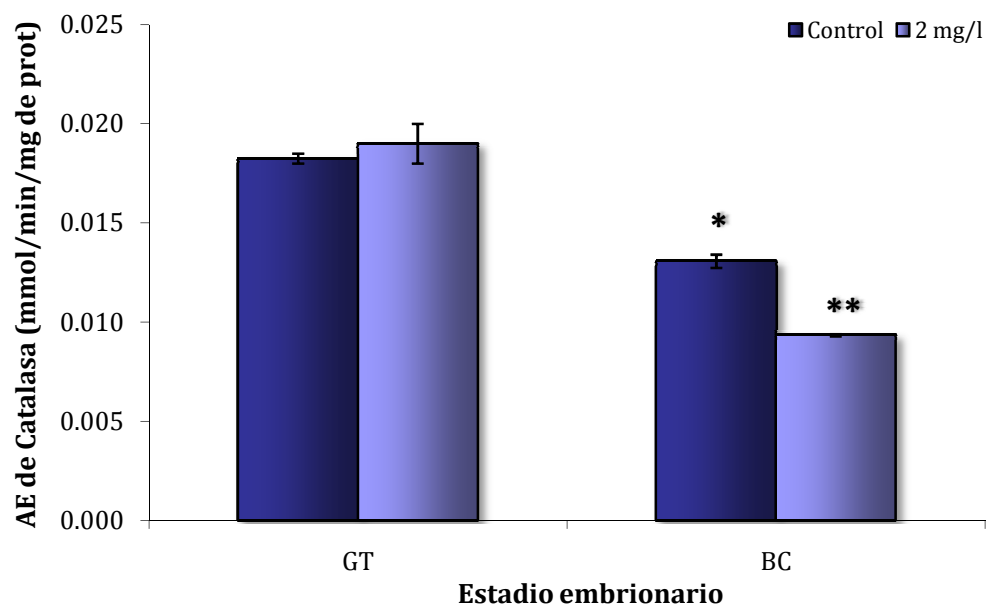


Figura 44. Actividad específica de la enzima catalasa expresada como mmol de H₂O₂ hidrolizada por minuto por mg de proteína en los estadios de GT y BC en embriones expuestos a una concentración de 2 mg/l de Clp (*denota diferencias significativas entre los controles y ** entre control y tratado del mismo estadio, p = 0.05). Datos de un experimento representativo de 2 experiencias independientes.

Se analizó el efecto del Clp sobre el contenido endógeno de GSH en embriones expuestos, hasta alcanzar el estadio de BC, a 2, 4, 8, y 16 mg/l de Clp. Como se puede observar en la figura 45, a 2-8 mg/l de exposición, se obtuvieron niveles de GSH similares y significativamente mayores que los niveles encontrados en los organismos sin exponer al xenobiótico (13 %). Sin embargo, a 4 mg/l el contenido de dicha molécula no se vio afectado significativamente respecto de los controles, observándose sólo una tendencia al incremento. A concentraciones superiores (16 mg/l), se observó una disminución significativa del GSH respecto de los controles (16%).

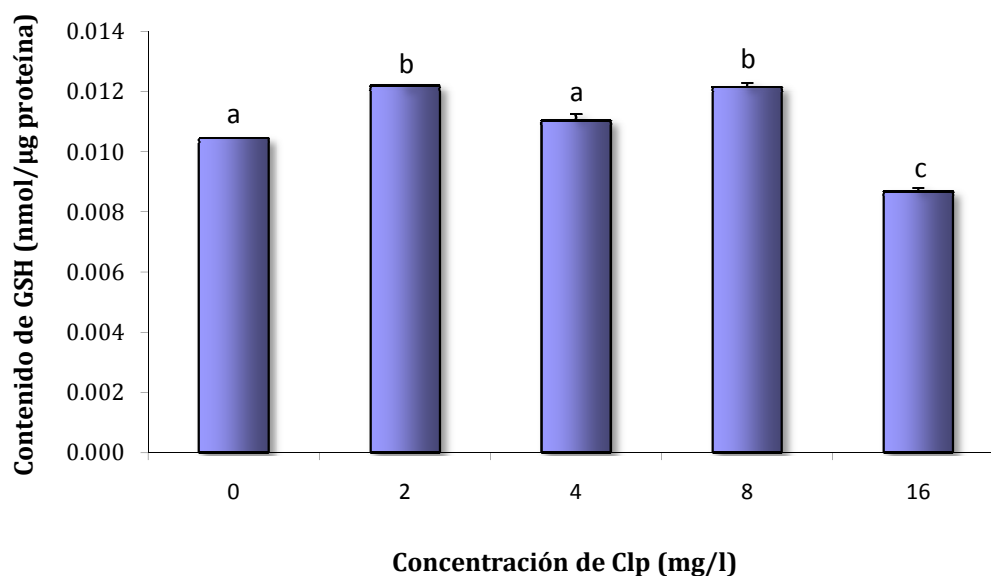


Figura 45. Contenido de GSH endógeno expresado como nmoles de GSH por μg de proteínas en el estadio de BC en embriones expuestos a concentraciones crecientes de Clp (48 Hrs de exposición). Letras distintas representan diferencias significativas entre los tratamientos, $p=0,01$. Datos promedio de dos experimentos independientes.

4.5 Estudios de la acción del Clp sobre la vía de las PAs

Se buscó determinar los efectos producidos sobre el metabolismo de las PAs, analizando los niveles de PAs endógenas y la actividad específica de ODC, enzima limitante en la síntesis.

4.5.1 Medición de los niveles de PAs endógenas

Se estudiaron los niveles de PAs endógenas en embriones en el estadio de BC, luego de la exposición a distintas concentraciones de Clp. En animales no expuestos, los niveles de Put fueron 4 veces superiores a los niveles de Spd (12,75 nmol/mg proteína versus 3,14 nmol/mg proteína respectivamente,) (Figura 46). Los niveles de Spm se encontraron por debajo del límite de cuantificación de la técnica de medición utilizada. Los embriones expuestos a 2 o 4 mg/l de Clp no

mostraron efectos sobre los niveles de Put, mientras que a 8 mg/l o 16 mg/l produjeron una disminución similar en ambos casos respecto del control (aproximadamente 33%). Los niveles de Spd fueron afectados de modo similar por la concentración del plaguicida, observándose una disminución del 42% frente a la exposición a 16 mg/l comparado con los organismos sin exponer. Si bien las tendencias en los niveles de las PAs analizadas fueron claras, los resultados de las repeticiones tuvieron una desviación estándar considerable y por tal motivo no se observaron diferencias significativas al momento de realizar el análisis estadístico por ANOVA de un factor ($p= 0.05$).

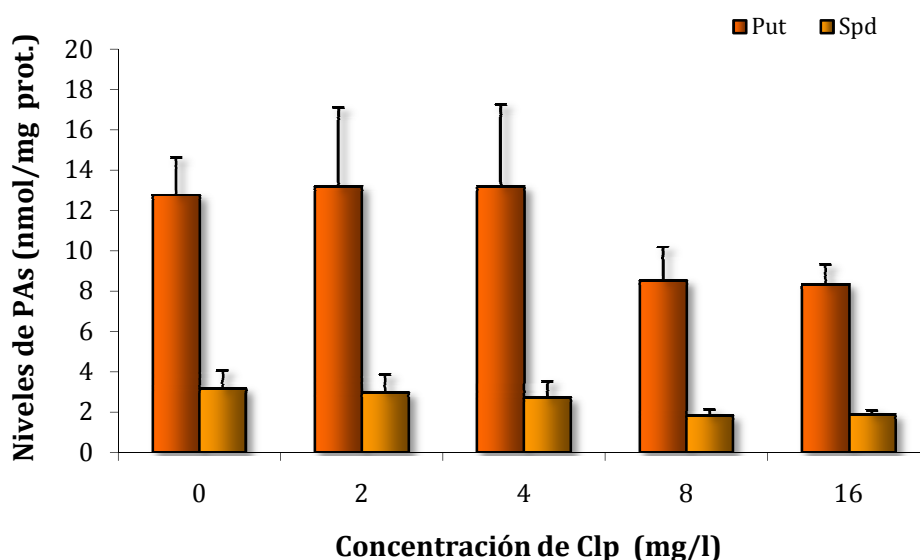


Figura 46. Niveles de PAs endógenas, expresadas como nmoles por mg de proteína, en función de concentraciones crecientes de Clp, en embriones en el estadio de BC. Los niveles de Spm se encontraron por debajo de los límites de cuantificación. Diferencias no significativas en el análisis estadístico realizado por ANOVA de un factor ($p=0.05$).

4.5.2 Determinación de la actividad específica de ODC

Posteriormente se analizó el efecto del Clp sobre la actividad de la enzima limitante en la vía biosintética de las PAs, ODC. Dicha actividad decreció proporcionalmente (de modo significativo) al incrementar la concentración de

plaguicida a la que fueron expuestos los embriones hasta alcanzar el estadio de BC (Figura 47), (test post-hoc de Fisher LSD, $p=0.05$). A partir de exponer los embriones a 4 mg/l de Clp obtuvimos una disminución estadísticamente significativa del 40% respecto del control. A 8 y 16 mg/l del OF dicho efecto se incrementó aún mas, obteniéndose un 80 y 87% de inhibición respectivamente, comparado con los embriones sin exponer. Fue determinada por regresión no lineal la concentración inhibitoria 50, CI_{50} , obteniendo un valor de $4,6 \pm 0.8$ mg/l Clp.

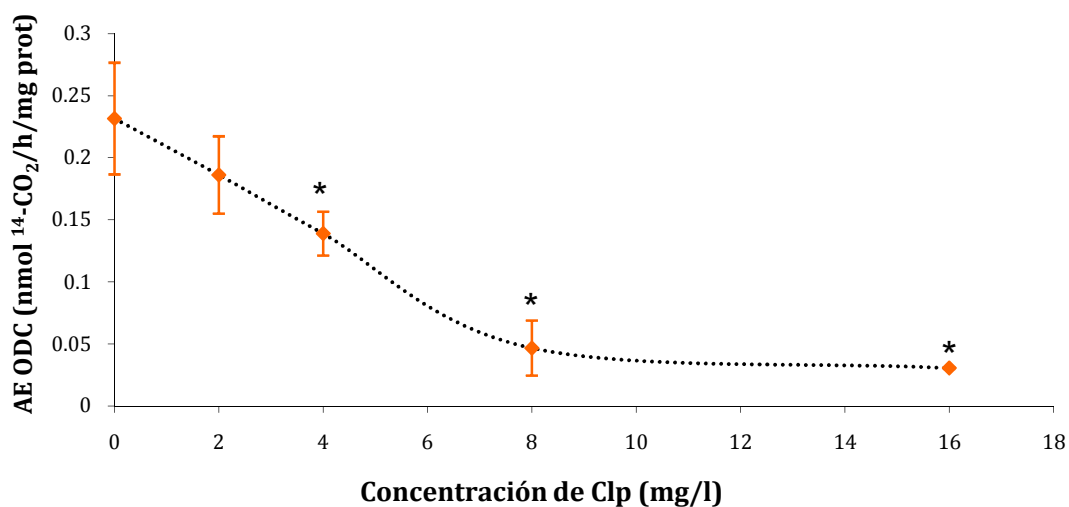


Figura 47. Actividad de ODC, expresada como nmol de ¹⁴-CO₂ liberado por hora por mg de proteína, en función de concentraciones crecientes de Clp, en embriones en el estadio de BC (* denota diferencias significativas, $p = 0.05$). La línea muestra un ajuste a un modelo sigmoideal por regresión no lineal, con un control de la actividad de ODC de $0,230 \pm 0,021$ nmol ¹⁴-CO₂ liberado/h/mg proteína y una CI_{50} de $4,6 \pm 0.8$ mg/l de Clp.

4.5.3 Correlación entre las acciones del Clp sobre el desarrollo embrionario y el metabolismo de las PAs

Analizamos la correlación de la actividad específica de ODC con el porcentaje de arresto en los embriones de *R. arenarum* (Figura 48). La misma muestra una correlación directa y negativa, obteniéndose con la regresión lineal un

$R^2 = 0.740$. A medida que la actividad de ODC disminuyó, el número de embriones arrestados en el estadio de BC aumentó, alcanzado un 18%.

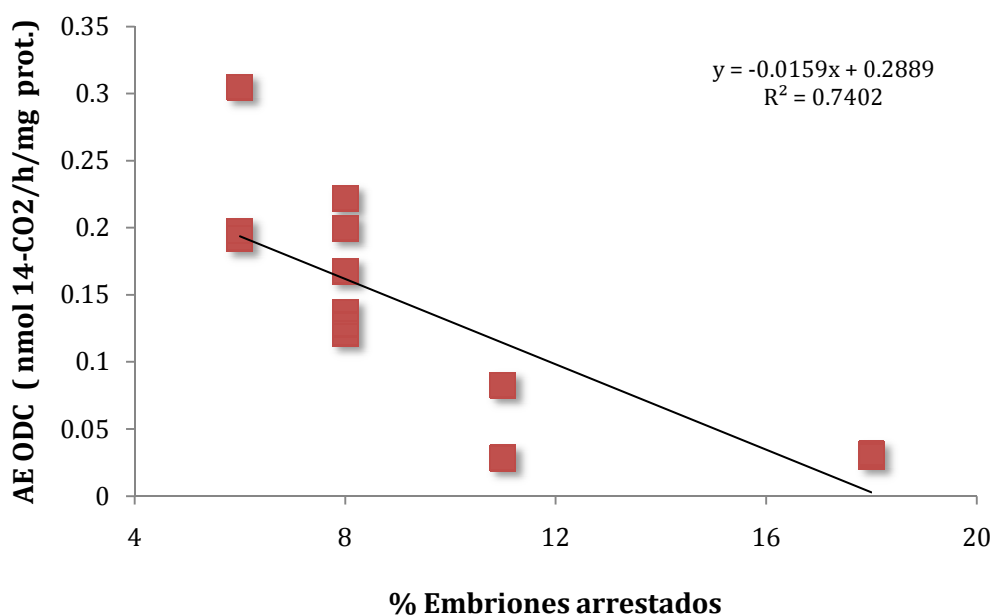


Figura 48. Actividad específica de ODC, expresada como nmol de $^{14}\text{-CO}_2$ liberado por hora por mg de proteína, en función del porcentaje de embriones arrestados en el estadio de BC.

Debido a las tendencias decrecientes en los niveles de las PAs y en la actividad específica de ODC frente a las concentraciones de Clp, se realizó un análisis de correlación entre los niveles de la enzima limitante en la biosíntesis de las PAs y los niveles de las mismas que pudieron ser analizadas, Put y Spd. En la figura siguiente observamos el gráfico de correlación entre las medias observadas para las PAs mencionadas, en mmol/mg de proteína, y las medias de las actividades específicas de ODC expresadas como nmol $^{14}\text{-CO}_2$ /h/mg proteína. Se observó un buen ajuste en la línea de regresión lineal, menor en Put que en Spd ($R^2=0,8123$ vs $R^2=0.9743$). La diferencia en las pendientes que se puede observar implica que en Put se ve más afectada por los cambios en la actividad específica de ODC respecto de lo que lo hace Spd (menor pendiente).

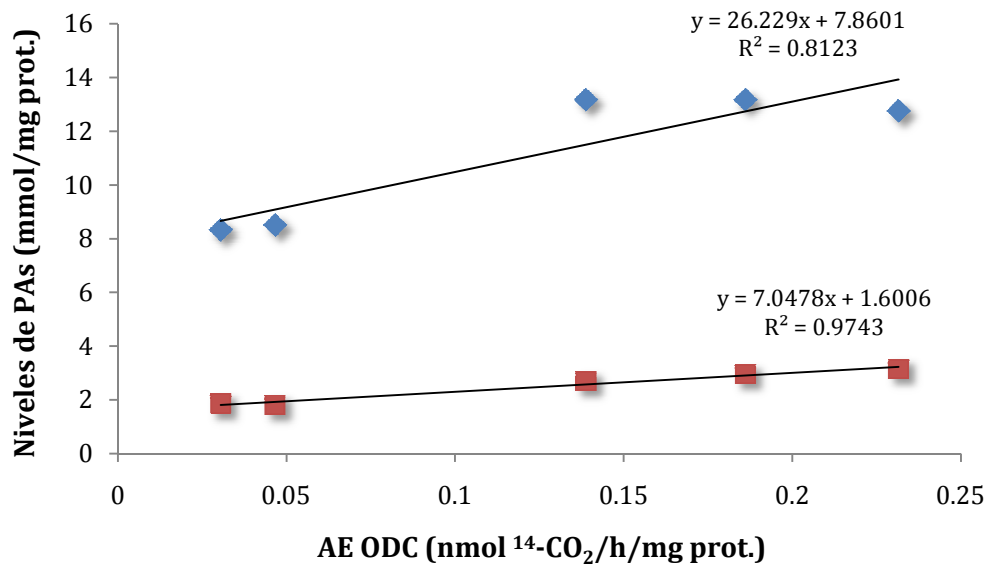


Figura 49. Correlación entre la actividad específica de ODC de y los niveles de PAs, ambos en embriones expuestos a 0, 2, 4 8 y 16 mg/l de Clp en el estadio de BC. En azul se observan los resultados de las medias obtenidas en la concentración de Put endógena frente a la actividad específica de ODC mientras que la línea inferior en rojo corresponde a Spd.

Se analizó la correlación entre el contenido endógeno de GSH y el porcentaje de arresto de los embriones pero se obtuvo un mal ajuste a la línea de regresión lineal con un $R^2 = 0.4078$ (datos no mostrados).

4.6 Determinación de efectos a nivel molecular frente a la exposición al plaguicida Clp

4.6.1 Regulación de la unión del factor de transcripción AP-1 a su elemento de unión al ADN

Utilizando la técnica de movilidad electroforética (Electro Mobility Shift Assay) en embriones de *R. arenarum*, se buscó probar la hipótesis inicial acerca del efecto de los plaguicidas sobre la transcripción génica, particularmente debido a la regulación del FT AP-1 en embriones en BC expuestos a 2 mg/l de Clp. Utilizando

una purificación previa de la sonda en columna de Sephadex G-25 se pudieron individualizar 3 grupos definidos de bandas; siendo las bandas I y II las correspondientes al ADN + proteína, y la tercer banda, al ADN libre (Figura 50). Las bandas múltiples (I y II) indicarían dos grupos de proteínas de unión a la sonda. Por otro lado, utilizando un anticuerpo comercial anti c-Jun, se realizaron ensayos de supershift sin obtenerse resultados con una adecuada sensibilidad para la especie *R. arenarum* (datos no mostrados). Los resultados del EMSA se corroboraron en un segundo ensayo en el cual se obtuvo una única banda de unión de AP-1 al oligonucleótido TRE (Figura 51). En ambos experimentos, los embriones tratados con Clp mostraron una disminución en la unión de AP-1 con el oligonucleótido con la secuencia TRE.

Para la cuantificación de los ensayos de movilidad, se consideró como posibilidad que en el primer ensayo donde se visualizan 3 bandas definidas, la banda identificada como banda II pudiese corresponder a oligomerización de la sonda teniendo en cuenta que en la calle donde se corrió únicamente a la sonda TRE, esta aparece a la altura de la banda previamente mencionada. Se procedió a analizar por densitometría esta posibilidad sin verse alterado el resultado al momento del análisis estadístico por el test de Fisher con un $p= 0.05$ y manteniéndose la tendencia que más adelante se detalla (Figura 52). Una vez considerada esta situación, se analizaron densitométricamente ambos geles considerando en el primer ensayo la banda I y II como proteínas unidas al oligonucleótido y promediando con la banda única del segundo ensayo. Se calcularon las densidades relativas y fueron corregidas, utilizando como control interno de cada uno a las bandas correspondientes a la sonda libre (Figura 52). Los valores obtenidos fueron finalmente sometidos a un análisis estadístico como previamente se mencionó.

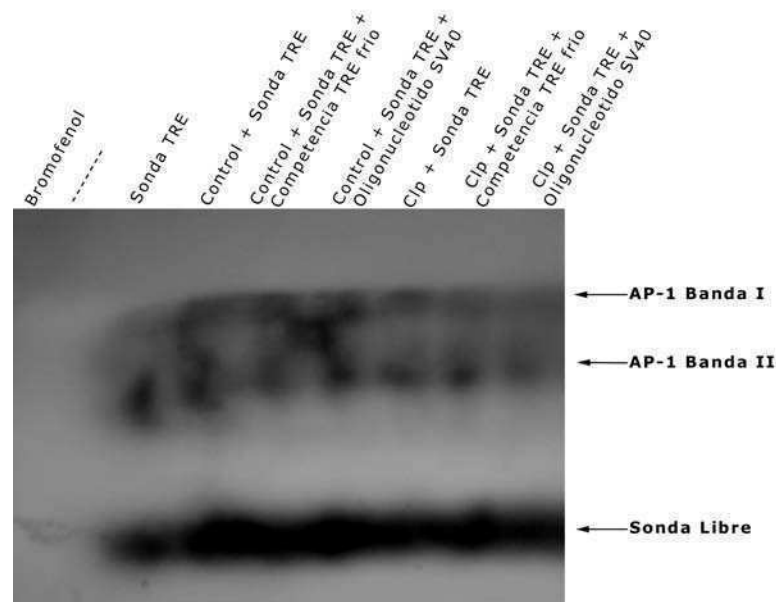


Figura 50. Ensayo de movilidad electroforética. Extractos proteicos de embriones en BC controles y expuestos a 2 mg/l de Clp fueron incubados con oligonucleótidos de ADN correspondientes a la zona de unión del FT AP-1. Las bandas I y II corresponden a dos complejos de unión proteína-ADN y la banda III corresponde al ADN libre marcado.

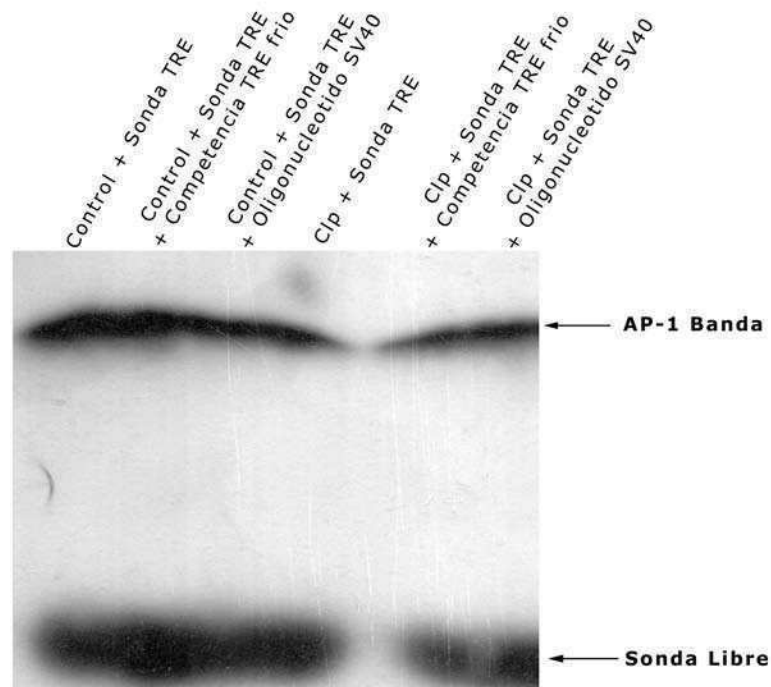


Figura 51. Segundo ensayo de movilidad electroforética. Extractos proteicos de embriones en BC controles y expuestos a 2 mg/l de Clp fueron incubados con oligonucleótidos de ADN correspondientes a la zona de unión del FT AP-1.

El extracto de los embriones tratados con 2 mg/l de Clp mostró un 30% de disminución de la unión de AP-1 respecto del extracto control, obtenido a partir de embriones sin exponer al plaguicida ($p=0.05$). Por otro lado, el control de especificidad con el oligonucleótido TRE sin marca radioactiva dio una leve disminución en la unión de TRE marcado radioactivamente (aproximadamente 15% respecto del control). Esto sugiere que la cantidad de proteína nuclear utilizada fue alta respecto al oligonucleótido y/o la necesidad de utilizar niveles más elevados de sonda TRE fría. Sin embargo, la competencia inespecífica (con oligonucleótido sin marcar radioactivamente de SV40) no mostró efecto, indicándonos que la unión es específica. Los resultados de los controles específicos e inespecíficos en embriones tratados no mostraron diferencias significativas respecto del resultado obtenido para el extracto de proteínas nucleares, proveniente de embriones expuestos a Clp, e incubado con la sonda TRE marcada radioactivamente.

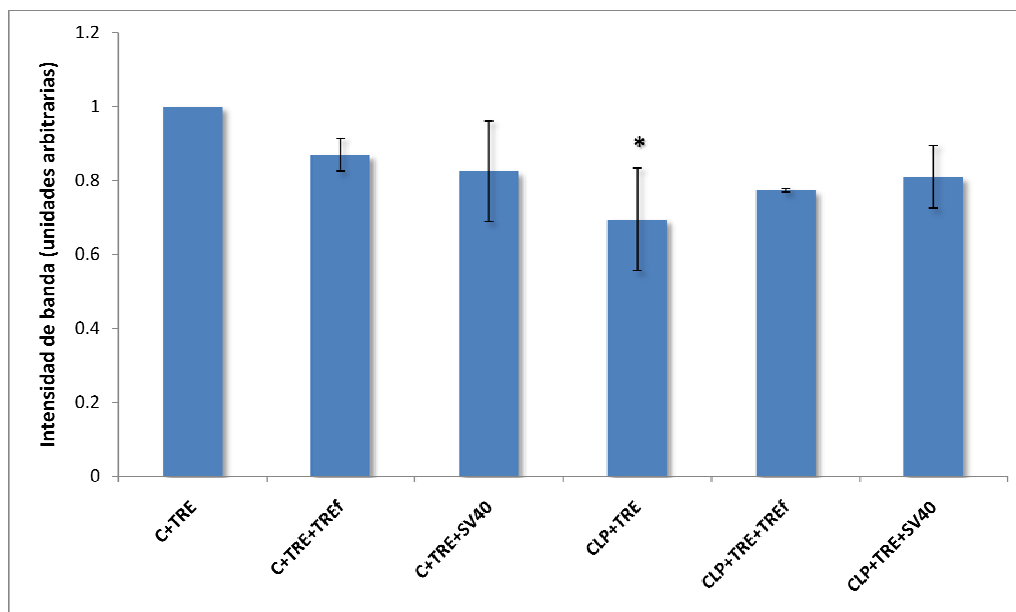


Figura 52. Cuantificación del EMSA (Figuras 50 y 51). Los niveles relativos de densidad de bandas correspondientes a la sonda unida a AP-1 de los extractos de proteínas nucleares se refirieron al total de la señal para cada calle (frente). El asterisco (*) indica diferencia significativa respecto del control (FISHER LSD, $p=0.05$).

4.6.2 Estudios de fosforilación *in vitro* de proteínas nucleares

Se estudió el efecto de la exposición a 2 mg/l de Clp sobre la fosforilación *in vitro* de las proteínas nucleares como sustratos endógenos, en embriones en el estadio de BC.

Se pudo observar (Figura 53, derecha) que en los embriones tratados (calles 1-3) existió una expresión más marcada (mayor intensidad en las bandas) de proteínas, incluso algunas no pudieron ser observables en los controles (calles 8-10). También se visualizaron bandas presentes en los controles (aproximadamente 29 KDa) que desaparecieron en los embriones expuestos al Clp, así como una banda que corrió por encima de 66 KDa y disminuyó considerablemente en embriones expuestos.

En el revelado por autorradiografía de las proteínas fosforiladas se observan fosforilaciones diferenciales en al menos 6 bandas en aproximadamente 66, 60 50, 36, 29 y 20 Kda (Figura 53, izquierda, indicadas con flechas). Al analizar las calles 1-3, se pudo ver que las bandas de aproximadamente 60, 50, 29 y 20 KDa aparecieron fosforiladas en los controles y no se vieron afectadas por los inhibidores de tirosinas quinasas (genisteína) y fosfatasas (ortovanadato). Al comparar el control con el extracto de los embriones tratados con 2 mg/l de Clp (calles 10 y 3 respectivamente), las bandas de 60 y 20 KDa se vieron disminuidas en los tratados con el OF, la de 50 Kda no se vio afectada y la banda de 29 KDa, muy alta en controles, desapareció por completo en los embriones expuestos al OF. Cuando analizamos el efecto de los inhibidores en los embriones expuestos (calles 1 a 3), se observó que las bandas de 66, 60, 50 y 20 KD aparecieron más intensas tras el tratamiento con ortovanadato, por lo que podría deducirse que existirían proteínas que se estarían fosforilando en tirosinas cuando se trata los embriones con Clp.

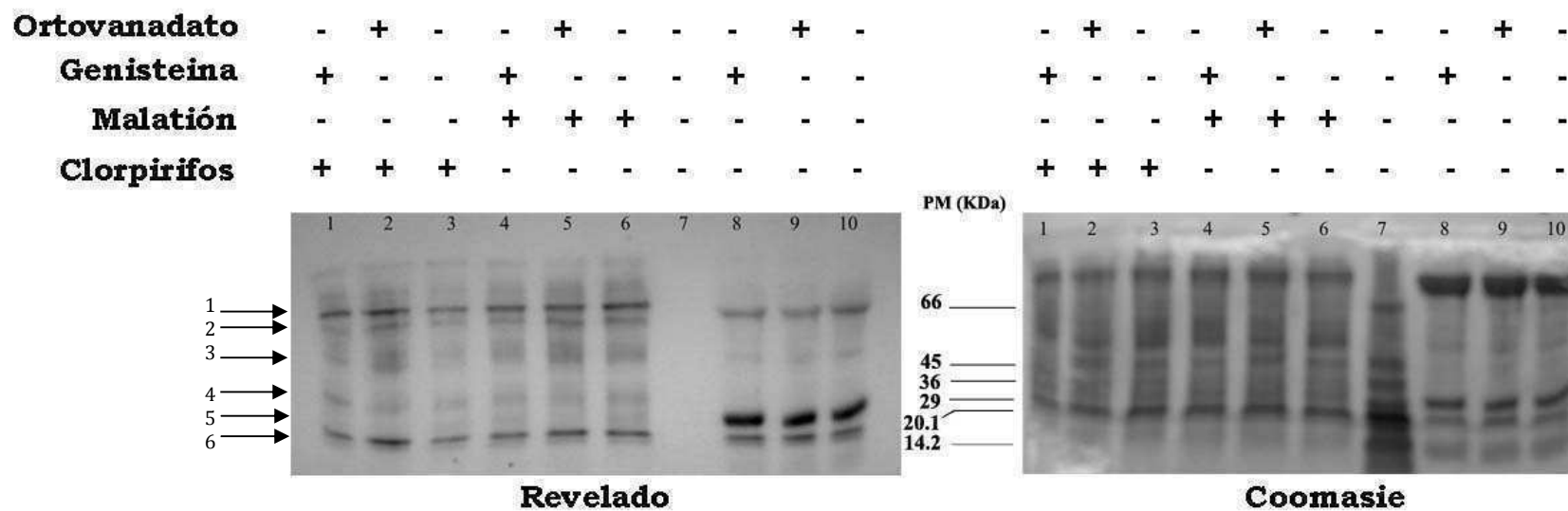


Figura 53. Geles de fosforilación. Derecha: Revelado con Coomassie blue de los geles. Izquierda: Revelado en autorradiografía. Las flechas corresponden a los siguientes PM aproximados: (1) 66 KDa, (2) 60 KDa, (3) 50 KDa, (4) 36 KDa, (5) 29 KDa y (6) 20 KDa.

4.6.3 Análisis de la expresión de factores de transcripción y su estado de fosforilación

4.6.3.1 Estudio de los componentes del FT AP-1, c-Fos y c-Jun

Se realizaron ensayos de *Western blot* para tratar de identificar si c-Fos y c-Jun, podrían ser verse afectadas con la exposición al OF, y analizar los niveles de las proteínas involucradas en la formación del FT AP-1. Se demostró previamente que disminuye la unión de AP-1 a TRE al tratar los embriones con 2mg/l de Clp durante 48 hrs).

En primer lugar se analizaron los niveles de c-Fos en los embriones tratados con distintas concentraciones del xenobiótico durante 24 hrs, hasta alcanzar el estadio de GT (Figura 54 A). Se observaron dos bandas de 64 y 68,5 KDa y se observó que en la correspondiente a 68 KDa, c-Fos aumenta respecto, del control, con 2 mg/l de Clp (16%) y con 8 mg/l (28%). Con 14 mg/l del OF los niveles de c-Fos son semejantes a los obtenidos en los controles. Asimismo, la tendencia observada con la banda superior se repite en la banda de 64 KDa, pero de manera más marcada, donde en embriones expuestos a 2 mg/l del xenobiótico hay un incremento de 18 veces y en individuos expuestos a 8 mg/l el incremento es de 30 veces respecto de los controles. Con 14 mg/l del OF la banda inferior desaparece por completo.

Al analizar los niveles de c-Fos en embriones tratados con 2 mg /l de Clp y controles durante 48 hrs (en el estadio de BC) se obtuvieron en estos últimos dos bandas, al igual que con los extractos de proteínas nucleares de GT, de las cuales la inferior presentó el doble de intensidad que la superior. En los extractos de los embriones expuestos se observó que desaparecen por completo ambas bandas presentes en los controles (Figura 54 B), congruente con los resultados previamente obtenidos en los EMSA.

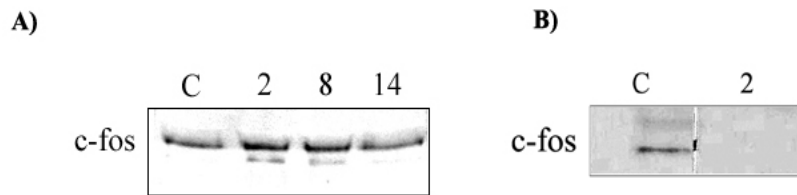


Figura 54. A) c-Fos: en embriones expuestos durante 24 hrs (estadio de GT) a 0, 2, 8 y 14 mg/l de Clp; B) c-Fos en extractos de embriones expuestos durante 48 hrs (estadio de BC) a una concentración única del plaguicida (2 mg/l de Clp). Las bandas se encontraron en 64 y 68,5 KDa de PM.

Paralelamente se analizaron los patrones de expresión del otro miembro del FT AP-1, c-Jun, y también de su forma fosforilada, p-c-Jun (Figura 55 abajo y arriba respectivamente). Con el anticuerpo anti-c-Jun se resolvieron 2 bandas de 35 y 30 KDa (b y c) pero con anti-p-c-Jun sólo se identificó claramente una sola banda en 39 KDa (a). La banda de 39 KDa en p-c-Jun disminuyó un 88% en embriones expuestos a 2 mg/l de Clp respecto del control, mientras que con el anticuerpo anti-c-Jun, la banda de 35 KDa disminuyó un 16% en embriones expuestos respecto del control y la de 30 KDa lo hizo en un 32%.

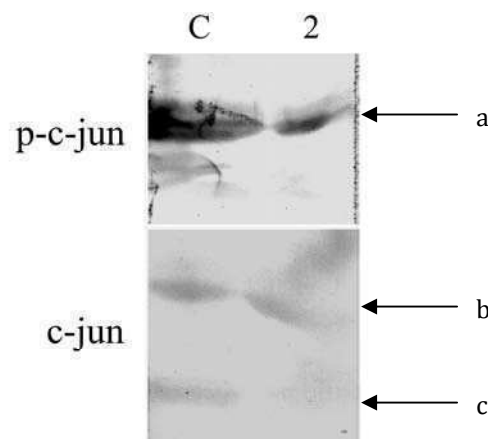


Figura 55. Arriba) p-c-Jun; Abajo) c-Jun: en embriones expuestos durante 48 hrs (estadio de BC) a una concentración única del plaguicida (2 mg/l de Clp). Las bandas se encontraron en: (a) 39 KDa, (b) 35 KDa y (c) 30 KDa de PM.

4.6.3.2 Análisis por Western blot de la vía de las MAPKs y PKC

Finalmente, se analizaron los niveles de expresión de JNK2 y ERK 1/2 en embriones que alcanzaron el estadio de BC, con la finalidad de intentar dilucidar la vía involucrada en la traducción de señales que conlleva a la disminución de AP-1 (aparentemente, al menos por disminución de sus componentes c-Fos y c-Jun) en los embriones tratados.

Con los extractos nucleares obtenidos a partir de embriones en el estadio de BC, se pudo observar una banda de 42 KDa correspondiente a ERK 1/2. La misma se vio disminuida un 71% en los organismos expuestos a 2 mg/l de Clp (Figura 56A abajo) pero se incrementaron sus niveles en un 100% en embriones tratados con 8 mg/l, siendo nuevamente inhibidos con 14 mg/l de Clp (57% respecto del control).

Los resultados obtenidos con JNK2 mostraron diferencias en los embriones expuestos en el estadio de BC donde con 2 mg/l de exposición se observó un incremento respecto de control del 32% mientras que con 8 mg/l de Clp el nivel de JNK2 fue similar a los embriones no expuestos (Figura 56A arriba). Con 14 mg/l del OF, el nivel de la proteína disminuyó en un 50 % comparado con el control. El PM estimado de la banda correspondiente a JNK2 fue de 54 KDa.

Por otra parte, PKC (80 KDa) mostró un aumento en sus niveles tras la exposición a 2 mg/l del plaguicida respecto de los controles (Figura 56 B) donde no se detectó expresión. En embriones en BC tratados con 8 mg/l del OF, la banda desapareció obteniéndose un resultado similar al de los embriones control, no expuestos al OF en estudio.

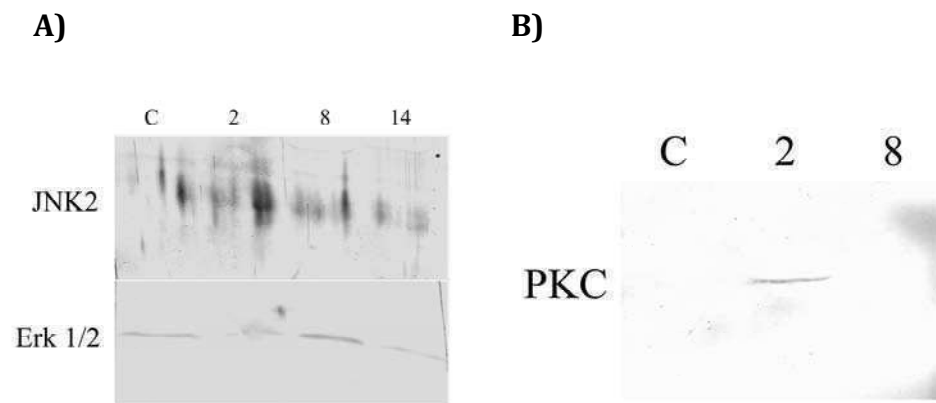


Figura 56. Embriones expuestos durante 48 hrs (estadio de BC): A) JNK2 (arriba, 54 KDa) y ERK1/2 (abajo, 42 KDa): exposiciones seriadas de 0,2, 8 y 14 mg/l de Clp; B) PKC (80 KDa) en embriones expuestos a 0, 2 y 8 mg/l del OF.

DISCUSION

Han sido publicados por varios autores los efectos toxicológicos y teratogénicos de los plaguicidas en el desarrollo embrionario de diversas especies [1, 3, 32, 64, 172-176]. En nuestro laboratorio hemos enfocado el análisis sobre el efecto en embriones en desarrollo de *R. arenarum*, utilizando como agentes xenobióticos a plaguicidas OF y carbamatos. Esto se ha basado en el hecho de que los plaguicidas OCl han dejado de ser utilizados en el mundo debido a su persistencia en el ambiente, y los OF y carbamatos han venido a sustituir su uso. Por otro lado, la elección del modelo de estudio radica en que los anfibios pasan la primer parte de su ciclo de vida en ambientes acuáticos, lo que los hace particularmente sensibles a la contaminación ambiental durante su desarrollo embrionario y larval. Se ha venido reportando un declive en la población de anfibios en el mundo [122, 124, 126, 177, 178], incluso se ha especulado con la posibilidad que estas bajas en el número de individuos pudiesen ser debido en parte a la utilización de plaguicidas. Estos se encuentra sugerido en primer lugar debido a que muchas especies de anfibios tienen sus crías en la primavera, cuando grandes cantidades de plaguicidas son aplicados y se depositan en los suelos y cursos de agua poco profundos, siendo estos últimos los ambientes naturales de los embriones. En segundo lugar, se ha demostrado que la fertilización y desarrollo de los embriones de anfibios son eventos particularmente sensibles a diversos plaguicidas; en particular nuestro laboratorio lo ha reportado para la especie *R. arenarum* [2, 116-118, 152, 171]. En el presente trabajo de tesis se abordó el estudio del plaguicida OF Clp, elegido por ser unos de los plaguicidas de mayor uso en el mundo y por el crecimiento del uso doméstico que ha venido teniendo en los últimos años, haciéndolo de particular importancia para su estudio por el/los posibles efectos que pudiesen tener a distintos niveles en los individuos. Para dilucidar estos posibles efectos, se utilizaron concentraciones crecientes del OF a fin de determinar la CL₅₀ en estadios tempranos, intermedios y tardíos (BC, LC y OC respectivamente) del desarrollo embrionario de *R. arenarum* y, utilizando dicha información toxicológica elegir concentraciones subletales, muy por debajo de la CL₅₀, para estudiar en estadios tempranos del desarrollo si existían efectos a nivel bioquímico y molecular, aún cuando no existiesen a nivel macroscópico ni se viese

inhibida la AE de la AChE. La expresión génica en BC es activa respecto de GT, la cual acaba de atravesar la etapa MBT, aunque aún no es completa sino hasta la metamorfosis [179], en este hecho radica parcialmente que se haya optado por profundizar los estudios en el estadio de BC. Por otro lado, para comparar las CL_{50} obtenidas en los estadios de estudio se debieron utilizar distintos parámetros de mortalidad, siendo para BC el arresto de los embriones mientras que para LC y OC fue la ausencia de latido cardíaco y circulación en la aleta caudal.

El Clp fue capaz de causar arresto y muerte de los embriones expuestos de manera dosis – dependiente. A medida que los embriones alcanzaron los estadios más avanzados en el desarrollo, la concentración del OF necesaria para causar efecto fue disminuyendo, lo que se observa claramente a partir del análisis de probit, donde en embriones en el estadio de OC es necesaria la exposición a 13,54 mg/l del OF para causar la muerte del 50% de la población, mientras que en el estadio de BC la exposición debe ser de 23,33 mg/l para causar arresto de la mitad de los individuos en el desarrollo (CL_{50}). Por otra parte, las pendientes obtenidas en los distintos estadios nos permiten deducir que la población, a medida que alcanza los estadios más avanzados en el desarrollo, responde menos homogéneamente al tratamiento ya que la misma disminuye en OC en relación a BC. Estos resultados pueden ser parcialmente explicados por el hecho de que los embriones en el estadio de BC aún se encuentran rodeados por la ganga gelatinosa que podría estar proveyendo de cierta protección al mismo frente a la exposición a diferentes contaminantes ambientales, como ya ha sido considerado por otros autores [180, 181]. En este sentido, los embriones se encontrarían protegidos hasta el estadio de BC cuando los mismos eclosionan. Luego, a medida que los embriones se desarrollan aún más, comienzan a intercambiar activamente material disuelto a través de las branquias, volviéndolos incluso más susceptibles. Por otro lado, en los estadios más tempranos del desarrollo, los embriones de *R. arenarum* poseen grandes cantidades de plaquetas vitelinas que contienen lípidos, los cuales proveen al embrión de energía y son activamente transferidos a las nuevas membranas sintetizadas durante el desarrollo embrionario. El almacenamiento de los lípidos en las plaquetas vitelinas podría estar rescatando el OF ya que estos, al ser compuestos lipofílicos, se verían fácilmente disueltos en las mismas. Así ocurriría una disminución de los efectos indeseables de los

xenobióticos sobre la fisiología del embrión [3]. Cabe destacar que existe una depleción en el almacenamiento de los lípidos a medida que progresa el desarrollo, dejando al embrión más expuesto a los plaguicidas, y por lo tanto, justificando el hecho de que a medida que encontramos al embrión más avanzado en su desarrollo, menos OF es necesario para causar los efectos testeados. Es importante recalcar que el diseño experimental utilizado en la tesis implica un esquema de exposición continua al OF, por lo que a medida que los embriones avanzan en su desarrollo, el tiempo de exposición al xenobiótico también se incrementa, provocando malformaciones que pudiesen transformarse, finalmente, en letales en estadios más avanzados. En consecuencia, la exposición hasta OC se lleva a cabo durante al menos 144 horas, a diferencia de las 48 horas necesarias para alcanzar el estadio de BC. Este último hecho debe analizarse con particular cuidado si observamos que entre los estadios de LC y OC prácticamente no existe variación en los valores obtenidos de CL_{50} . Está claramente reportado que embriones de *R. arenarum* en el estadio de OC (estadio 25, [132]) son considerablemente más sensibles que los embriones en los primeros estadios de desarrollo de la misma especie, por ejemplo ante la exposición al Mtn y otros OF.

El estudio de las principales malformaciones en el estadio de GT permitió observar fundamentalmente anomalías alrededor del botón vitelino, producto probablemente de la anormal epibolia del ectodermo y la incorrecta involución de las células del mesodermo, proceso que da lugar al botón (anexo I). En el estadio de BC no se observó un gran número de malformaciones y alteraciones morfológicas pero en general a partir de este estadio se empezaron a documentar algunos como curvatura dorsal de la aleta caudal, cierre incompleto y anormal del tubo neural, descamación celular, acumulación de células en el interior de la membrana de fertilización y una alteración en la consistencia de la ganga que los rodea, siendo ésta mucho más lábil. Los embriones también comenzaron a mostrar retraso para alcanzar los estadios así como desincronización en el desarrollo entre los individuos a medida que se incrementaba la concentración de Clp. En el estadio de RM se observaron contracciones espasmódicas y sostenidas de los embriones, malformaciones de la cabeza e irregularidad en el contorno del cuerpo. En OC, las malformaciones alcanzaron el 70% con 14 mg/l de Clp y estas fueron en general las previamente citadas para los otros estadios a los que se les sumaron

arqueamientos completos del eje corporal, reducción drástica del tamaño y largo de la aleta caudal, atrofia, edemas, hidropesía y falta de movimiento. Ya ha sido reportado por otros autores que larvas de *X. laevis* expuestas a Clp y Mtn muestran una curvatura anormal de la aleta caudal, lo que trae aparejado una discapacidad en la movilidad [182, 183]. Esta anomalía en la curvatura observada en los embriones de *R. arenarum* expuestos a Clp puede ser el resultado de la inhibición de la AChE debido al impedimento de la hidrólisis del neurotransmisor ACh y al estímulo sostenido previo a la desensibilización del receptor. En este sentido, la inhibición de la AChE es significativa en embriones con movimiento en el estadio de LC.

En general, en los estadios de BC, LC y OC, cuando los mismos fueron expuestos a concentraciones de hasta 8 mg/l del OF las malformaciones se mantuvieron por debajo del 20%. En BC no se incrementaron con exposiciones de hasta 14 mg/l pero en LC y OC a dicha concentración (que se encuentra alrededor de la CL_{50}) las malformaciones alcanzaron el 30 y 70 % respectivamente, observándose por otro lado que los embriones en OC responden de manera más sensible a pequeñas variaciones de concentración (análisis de pendientes) por encima de 12 mg/l respecto de los individuos en LC. Los estudios histológicos en embriones en BC mostraron ensanchamiento del tubo neural, del canal central y del endodermo vitelino, entre otros, que pueden ser relacionados con las observaciones morfológicas detalladas anteriormente. Esto significa que las 3 capas embrionarias (ecto, endo y mesodermo) fueron afectadas por la exposición al OF. Por todo lo anteriormente descrito es que el Clp debe ser considerado como un agente teratogénico de relevancia, aún cuando algunos autores han considerado a este plaguicida como levemente teratogénico [47, 184, 185].

Posteriormente se buscó caracterizar la respuesta a nivel bioquímico de los embriones en los primeros estadios de desarrollo a la exposición al OF Clp, aplicado en concentraciones subletales. Con esta finalidad, se estudió el efecto sobre la actividad específica de la AChE (biomarcador primario de los OF) y algunas enzimas involucradas en el sistema de defensa antioxidante (catalasa y GST). La actividad de la AChE se vio incrementada en los controles a lo largo del desarrollo, donde en LC se obtuvieron valores 9 veces por sobre el valor medido

para BC, incluso este último mostró una AE de la enzima de un 50 % superior al obtenido en GT . Este hecho responde a lo reportado con anterioridad por nuestro laboratorio [2, 116, 117, 152, 171]. Al analizar el efecto sobre la AChE ante la exposición a Clp en el desarrollo (GT, BC y LC) observamos una inhibición dosis-dependiente en embriones en LC, lo cual es consistente teniendo en cuenta que es el blanco primario de los OF. Sin embargo, la AChE presentó una tendencia similar en GT y BC, con inducción de la actividad ante la exposición a 2 mg/l de Clp y una leve inhibición a 8 mg/l. Para analizar esta respuesta realizamos un estudio de la actividad específica de la AChE en el estadio de BC con concentraciones crecientes del OF. A 2 y 4 mg/l de Clp la actividad específica de la enzima se indujo respecto de los controles, a 8 mg/l la AE medida fue similar al control mientras que recién a 16 mg/l se registró una inhibición de la misma. La tendencia al incremento de actividad de la AChE en estos embriones probablemente se encuentre asociada a la síntesis de la isoforma R de AChE que se sintetizaría en situaciones de stress agudo por splicing alternativo del gen de AChE [186, 187]. Esta respuesta bifásica observada responde a un fenómeno conocido en toxicología como *hormesis*, que ya ha sido reportado por nuestro laboratorio para exposiciones de embriones de *R. arenarum* al OF metil azinfos [188]. Justamente, esta definición de hormesis contempla respuestas donde, ante la exposición a bajas dosis de un agente químico o ambiental, éste causa estimulación y la exposición a dosis elevadas de dicho agente, causa inhibición [189]. La respuesta bifásica sería una respuesta adaptativa tras la ruptura de la homeostasis frente a un estrés moderado. Al comparar la actividad específica en los controles de la AChE de la figura 41 y 42, se observan diferencias en los valores registrados. Esto puede deberse a que las experiencias fueron realizadas en cohortes diferentes de embriones provenientes de ovulaciones distintas así como del hecho de que los resultados de la primer figura son provenientes de extractos proteicos procesados en el momento mientras que en la segunda figura se utilizaron los datos medidos en extractos obtenidos de embriones congelados a -20°C, aunque uno esperaría que este último hecho disminuyese la AE en lugar de incrementarla. Es importante considerar que en las experiencias realizadas en embriones es fundamental obtener la mayor cantidad de resultados de una misma ovulación ya que este es un punto crítico de variación de los valores obtenidos en las mediciones de distintos parámetros.

La actividad específica de catalasa no fue afectada ante la exposición a 2 mg/l de Clp en embriones en GT, pero se vio inhibida en embriones en BC respecto de los controles. La inhibición puede deberse a que el grupo hemo presente en el sitio activo de la enzima catalasa es muy susceptible al ataque de las EROs que pudiesen estar presentes como producto del estrés oxidativo causado por el OF. Los embriones sin exponer demostraron que la actividad de dicha enzima disminuye significativamente en BC respecto de GT. Por otra parte, tanto en GT como en BC la actividad específica de GST fue inhibida ante la exposición a 2 mg/l de Clp. Los valores en los controles de los distintos estadios se mantuvieron en los mismos niveles de actividad, probablemente debido que existe proteína y ARNm heredados del ovocito y que apenas estaría comenzando la síntesis *de novo* de estas proteínas. El contenido de GSH endógeno, el cual neutraliza los radicales libres actuando así como agente antioxidante, en el estadio de BC se mantuvo en niveles por encima del observado en los controles en todas las concentraciones analizadas, disminuyendo recién frente a la exposición a 16 mg/l del OF. La enzima GST facilita el ataque nucleofílico de GSH hacia el plaguicida en un mecanismo detoxificante; al encontrarse inhibida la actividad enzimática, el GSH no estaría uniéndose al xenobiótico y por esto, sus niveles no estarían disminuyendo. Otra explicación alternativa sería que el estrés oxidativo moderado estaría induciendo la síntesis de GSH a través de un incremento de la expresión de la enzima γ -glutamilcisteína sintetasa que se halla regulada por el elemento de respuesta antioxidante Nrf2-ARE [190]. A su vez, un análisis preliminar de la actividad enzimática de la GSH reductasa (GR) demostró que la misma se encuentra aumentada en embriones en BC expuestos a 2 mg/l de Clp (datos no mostrados) [191], llevando al incremento de los niveles de GSH. El aumento en los niveles de GSH también podría explicarse debido a que GSH mantiene diversas funciones celulares como: proliferación celular, status tiol-disulfuro, actividad de las telomerasas, apoptosis, mantenimiento del ambiente reductor para la acción de diversos FT, entre los cuales se encuentran NF- κ B, Ap-1 y la actividad de p53 [192]. Otros autores han reportado que algunos transportadores involucrados en el transporte de drogas de la familia ABC (MRP – *Multidrug Resistance-Associated proteins*), en particular el miembro MRP-1, tiene como sustratos de transporte al exterior celular a las drogas conjugadas con GSH [193]. En su conjunto, los

resultados obtenidos al medir las AE de catalasa y GST, así como los niveles incrementados de GSH, nos estarían indicando que embriones en el estadio de BC expuestos a 2 mg/l de Clp estarían gatillando una respuesta del sistema antioxidante, debiéndose investigar si dicha respuesta es debido a estrés oxidativo o si la misma es suficiente para contrarrestar el efecto producido por el xenobiótico, previniendo justamente dicho estrés.

Las PAs son esenciales para el desarrollo y la proliferación celular y son el blanco de terapias para el cáncer a fin de reducir el crecimiento en el número de células cancerígenas. Por otro lado, un desbalance en el metabolismo de las PAs, como por ejemplo una fuerte activación de ODC con el paradójico decrecimiento en el contenido de las PAs intracelulares podría ser consecuencia de procesos apoptóticos [194]. La pérdida de las PAs resultan en la inhibición de la proliferación y diferenciación celular, incluso también en la muerte celular (necrosis y/o apoptosis). Los niveles de PAs intracelulares se correlacionan con alteraciones en la acetilación y desacetilación de las histonas en células normales y cancerígenas. Vale recordar que durante los procesos de embriogénesis, diferenciación y oncogénesis, los genes aparentemente se “apagan” y “encienden” por la acetilación y desacetilación de las histonas [82]. En nuestro laboratorio se ha venido proponiendo a las PAs endógenas como posibles biomarcadores de efecto en el desarrollo anormal, producto de la exposición a plaguicidas OF [135, 195]. Por este motivo, se analizaron los niveles de PAs endógenas y la actividad específica de la enzima limitante de la vía de síntesis de las PAs, ODC. Los niveles de Put y de Spd no se encontraron disminuidos en embriones expuestos a 2 y 4 mg/l de Clp durante 48 hrs y hasta alcanzar el estadio de BC. En cuanto a Spm, sus niveles no fueron posibles de determinar ya que se encontraban por debajo de los niveles de detección de la técnica. Concentraciones superiores a 8 mg/l, sin embargo, causaron una disminución en los niveles de Put y Spd manteniéndose dichos valores frente a la exposición a 16 mg/l de Clp. Debido que la enzima ODC está involucrada en la síntesis de Put, utilizando Ornitina como sustrato, podría ser posible que los niveles disminuidos de las PAs en los embriones expuestos a concentraciones por encima de 8 mg/l del plaguicida pudiesen deberse a un efecto sobre la enzima involucrada en su síntesis. La AE de ODC se vio disminuida con la

concentración más baja de Clp utilizada (2 mg/l) disminuyendo aún más a medida que incrementamos la concentración del OF. Sin embargo, a 16 mg/l sus niveles no variaron significativamente respecto del obtenido para la exposición a 8 mg/l lo que pudiese deberse a que, si en *R. arenarum* existen dos isoformas, una inducible y una constitutiva, como se encuentra reportado para otros modelos, pudiese ser una inhibición de la transcripción de la isoforma inducible de la misma la que se viese afectada por la exposición al plaguicida. La degradación de ODC está controlada por una proteína conocida como antizima, que responde a las concentraciones de las PAs [101]. Recientemente, una nueva vía de traducción de señales ha sido descrita para la degradación de ODC como consecuencia del estrés oxidativo, la cual es regulada por NAD(P)H quinona oxidoreductasa (NQO1) [196]. Estos no son los únicos puntos de regulación, sino que su síntesis se encuentra regulada a nivel de su transcripción y traducción [101], ha sido reportado que ODC en embriones de anfibio posee dos isoformas, una inducible y una constitutiva [197]. Como mencionamos anteriormente, la AE de ODC medida en embriones en BC expuestos al xenobiótico disminuye a medida que se incrementa la concentración del plaguicida lo que podría deberse a un bloqueo de la síntesis de la forma inducible causada por el Clp, más que a una degradación incrementada por parte de la antizima, ya que los niveles de PAs disminuyen, no ejerciendo ningún tipo de autorregulación negativa sobre su degradación. También se ha obtenido una buena correlación de los niveles de las PAs Put y Spd con la actividad específica de ODC, siendo mejor la obtenida para Put que para Spd lo que es esperable considerando que Put se sintetiza gracias a la AE de ODC mientras que los niveles de Spm se encuentran regulados también por la actividad de otras enzimas, como SAMDC. Por su parte, la vía de degradación regulada por NQO1 podría estar involucrada en la disminución de ODC ya que el aumento de GSH podría indicar una activación del sistema antioxidante en la concentración testada de 2 mg/l. De hecho, tanto la actividad específica de la enzima GST como la de catalasa se vieron disminuidas frente a la exposición a la concentración subletal testada sugiriendo que existe una respuesta del sistema antioxidante. Se ha demostrado en este trabajo que la actividad específica de ODC está correlacionada con el porcentaje de embriones arrestados en el estadio de BC, apoyando así la hipótesis planteada donde los niveles de PAs, producto de la

disminución en la actividad de ODC, son afectados por la exposición del Clp, llevando luego a alteraciones del desarrollo y probablemente a un aumento en los procesos apoptóticos [198]. Al comparar la CI_{50} de ODC (4,6 mg/l) y la CL_{50} en el estadio de BC (23,33 mg/l) se puede concluir que la actividad específica de ODC podría proponerse como un buen biomarcador ya que su actividad se encuentra disminuida en embriones expuestos a Clp incluso antes que el desarrollo embrionario se vea afectado. Más aún, cuando comparamos la CI_{50} antes mencionada con el valor de NOEC estimado en el estadio de BC (8 mg/l) se vuelve evidente que la actividad específica de la ODC es mucho más valiosa para determinar los efectos a corto plazo en los estadios tempranos del desarrollo de los embriones de *R. arenarum*.

El análisis de los efectos de la exposición a nivel molecular nos permite sacar varias conclusiones. En primer lugar, y en concordancia con la previa publicación por parte de otros autores [47], el FT AP-1 vio alterada su unión al ADN en los organismos expuestos a 2 mg/l de Clp. La resolución de las bandas del EMSA fue dificultosa, y su análisis complejo. Esta multiplicidad de bandas sería la unión de varios grupos de proteínas al ADN donde las bandas múltiples (I y II) que se observan en la figura 50, indican dos grupos de proteínas de unión para cada sonda. Esto ya se encuentra reportado en AP-1 por otros autores [47]. A diferencia de lo que les ocurrió a los autores previamente mencionados, nosotros pudimos lograr una purificación tal que no se observan otras bandas diferentes de las mencionadas, salvo la que se observa entre las calles 5 y 6, y de la cual no ha sido posible determinar el origen. Esta última puede corresponder presumiblemente a un artefacto de la técnica. En la calle donde se sembró únicamente la sonda (sin realizar previamente una unión con las proteínas extraídas a partir de los embriones), se observa una banda en el grupo II, la cual puede deberse a sonda libre oligodimerizada, por lo cual los análisis densitométricos se realizaron considerando también esta posibilidad lo que arrojó resultados similares a los que se exponen en la figura 52, donde se consideran ambas bandas como proteína + ADN. El análisis de *supershift* con el anticuerpo anti c-Jun, para discriminar por especificidad, no fue exitoso hasta el momento. La unión de AP-1 al sitio TRE estaría disminuido en embriones expuestos respecto del extracto obtenido a partir de embriones sin exponer al plaguicida y existiría especificidad ya que el

oligonucleótido frío compite y el inespecífico no lo hace. En el análisis de expresión de proteínas, se observó una expresión y una fosforilación diferencial en embriones tratados respecto de los controles, incluso existirían proteínas que se estarían fosforilando en tirosinas cuando se trata los embriones con Clp. Un incremento en las EROs pueden provocar un aumento en las tirosina quinasas y una inhibición de las tirosina fosfatasas que potencian aún más la activación de las tirosina quinasas. Para complementar los estudios anteriores se realizaron ensayos de *western blot* donde se encontró a c-Fos disminuido en embriones expuestos al OF durante 48 hrs al igual que c-Jun y su forma fosforilada. Al analizar la vía de activación de c-Jun (JNK) se vio que los niveles se encuentran alterados (aumentados) con 2 mg/l de Clp, con lo cual c-Jun podría encontrarse regulada por la vía de ERK ya que ERK 1/2 disminuye por la exposición de los embriones a 2 mg/l de Clp hasta el estadio de BC, lo que conllevaría a una disminución en la expresión de c-Fos y a la disminución en c-Jun previamente mencionada. A esto debemos sumarle que PKC se vio incrementada en su expresión y que un estudio inicial que se lleva a cabo actualmente en el laboratorio nos indica que la actividad de PKC también se ve aumentada por la exposición a OF (datos no mostrados). En conclusión, todo lo anteriormente dicho podría indicarnos que el plaguicida podría estar actuando como disruptor endócrino uniendo receptores de membrana tirosina quinasas o bien, al ser lipofílicos, atravesar la membrana plasmática y unir receptores intraceulares gatillando un *crossstalk* que conllevaría a la alteración de varias vías de traducción de señales. Por ejemplo, una activación de un receptor de membrana podría activar la PLC (fosfolipasa C) llevando a un incremento de DAG e IP₃ y activando a PKC. Nuestro laboratorio ya ha reportado que los OF alteran la actividad de la PLC [152]. El incremento de PKC por su lado podría activar las vías de Raf y Ras (que a su vez se regulan entre sí) llevando a alteraciones en JNK y ERK. Sería este último el que estaría regulando en los niveles de c-Jun y c-Fos ya que el mismo se encuentra disminuido y es capaz de regular la síntesis de dichos protooncogenes a través de los sitios TRE que tienen en las regiones reguladoras de sus genes. Entonces, a través de la vía de las MAPKs, probablemente a través de MEK y específicamente disminuyendo los niveles de ERK 1/2 se estaría inhibiendo AP-1, actuando al menos como un heterodímero c-Fos-c-Jun. Por disminución en los niveles de dicho FT habría menor síntesis de ODC, ya que su transcripción se

encuentra regulada por AP-1 e incluso por el mismo c-Fos. Los niveles de PAs estarían siendo regulados por la AE de ODC pero, con la exposición a concentraciones tan bajas de Clp, podrían estar compensando otras enzimas involucradas en las vías biosintéticas de las mismas lo que no permitiría medir niveles alterados de las mismas con dichas concentraciones de trabajo. Todo esto estaría gatillado por la inhibición de las fosforilaciones/defosforilaciones que convergen en la activación de la transcripción de los genes de expresión temprana, como es el caso de c-Fos. Por otro lado, la disminución de c-Jun y la activación de JNK podrían estar estabilizando a la proteína P53, la cuál es reconocida como una proteína clave en el destino celular respecto de su supervivencia o muerte.

PKC podría también estar alterando al FT Nrf-2, el cuál junto con c-Jun, regulan la síntesis de muchas proteínas, enzimas de Fase II, a nivel de su transcripción. Esto podría estar relacionado con los niveles de AE obtenidos para catalasa y GST así como con los niveles de GSH endógeno.

Por último, es importante recalcar que a concentraciones subletales, de 2 mg/l, no estamos observando inhibición del blanco primario AChE, lo que le da relevancia a los resultados obtenidos en el análisis del sistema de defensa antioxidante y a nivel molecular. Habría que investigar si se encuentra alterada la enzima P450 involucrada en la bioactivación del Clp convirtiéndolo en Clp-oxón (que al estar ausente no inhibiría la enzima blanco) y si es justamente el Clp *per se* el responsable de gatillar todos eventos previamente mencionados.

CONCLUSIONES DEL TRABAJO DE TESIS

- ◆ El clorpirifos es capaz de causar muerte/arresto en embriones de *R.arenarum* de manera concentración-dependiente.
- ◆ El clorpirifos es teratogénico en embriones de *R. arenarum*.
- ◆ El clorpirifos provoca una respuesta del sistema antioxidante según lo que se ha observado al analizar los niveles de GSH endógeno y las actividades específicas de las enzimas del sistema antioxidante, catalasa y GST.
- ◆ El clorpirifos causa una disminución en los niveles endógenos de las poliaminas putrescina y espermidina , a través de la disminución de la actividad específica de la enzima ODC, lo cual podría estar también relacionado con el estrés oxidativo.
- ◆ Las alteraciones morfológicas y el arresto embrionario estarían relacionadas a estrés oxidativo y a la disminución de los niveles de PAs.
- ◆ Estas respuestas se manifiestan a concentraciones subletales de clorpirifos y cuando el blanco primario, AChE, no se ve disminuido, o incluso aumenta frente a la exposición, por lo que dichos parámetros podrían ser utilizados como

biomarcadores tempranos a la exposición.

- ◆ **El clorpirifos en niveles subletales y en estadios tempranos de *R. arenarum* afecta la vía de PKC y de las MAPKs, en particular ERK 1/2 y JNK2, alterando la expresión y el estado de fosforilación de factores de transcripción como c-Fos y c-Jun y, en consecuencia, la unión de AP-1 a sitios TRE regulatorios del ADN.**
- ◆ **Estas alteraciones a nivel molecular podrían afectar la expresión de genes como el propio c-Fos y ODC, entre otros.**
- ◆ **C-Jun podría estar involucrado en la interacción heterodimérica con otros factores de transcripción como Nrf-2 en su unión a ARE, para la expresión de proteínas de estrés oxidativo como γ GS (síntesis de GSH) y NQO1.**

PERSPECTIVAS FUTURAS

Como parte de nuestros futuros estudios sería interesante analizar de qué manera PKC estaría afectando el mecanismo propuesto, o si la alteración en su actividad y nivel de expresión son efecto de la exposición al plaguicida.

Por otro lado, sería de vital importancia determinar el efecto primero del OF en la célula. Al ser un compuesto lipofílico uno podría suponer que el efecto se daría a través de la unión del OF con algún receptor intracelular llevando a una

serie de alteraciones por esta vía. Los resultados expuestos, sin embargo, darían lugar a especular que la unión se daría con un receptor de membrana plasmática. Es, entonces, determinante identificar el receptor al cuál se estaría uniendo el xenobiótico.

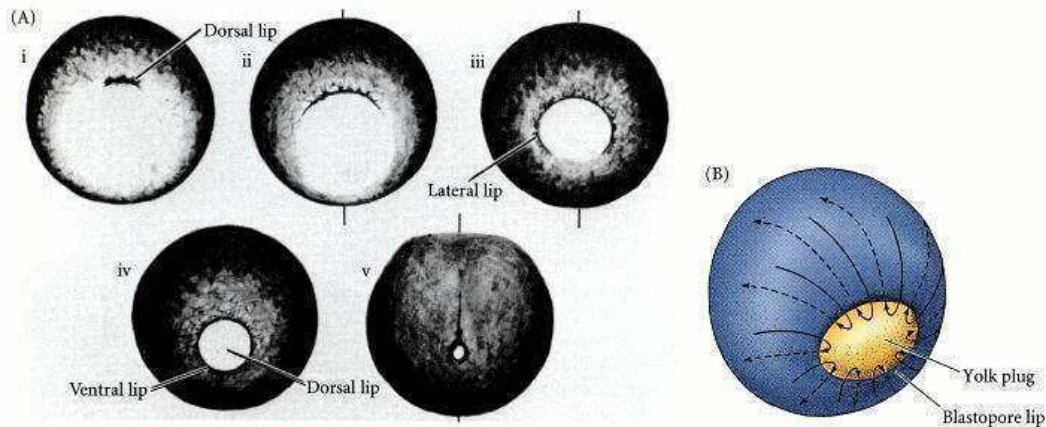
Los estudios de *supershift* nos permitirían corroborar los resultados acerca de la alteración en el FT AP-1 y su posible composición como heterodímero, tal como se deduce de los resultados obtenidos. Por otro lado, un análisis de la expresión de ODC a través de *Western blot* nos permitirá corroborar que el efecto está dado a través de la disminución en su expresión llevando a una alteración en su actividad tal como se propone en el presente trabajo. Estudiar la expresión diferencial analizando los niveles de ARNm y bloqueando la vía de traducción de señales que regula la expresión de ODC nos permitiría poder corroborar lo anteriormente propuesto. Finalmente, los resultados son fundamentalmente obtenidos a partir de embriones expuestos hasta el estadio de BC y a concentraciones subletales, sin embargo, sería interesante determinar si la vía que se propone como eje de la alteración ante la exposición, es compartida también en estadios larvales expuestos a Clp.

Otro punto a estudiar es si los efectos sobre el FT AP-1 y el metabolismo de las PAs afectan a la proteína p53, aumentan la apoptosis y alteran el patrón espacial de expresión de las proteínas que forman parte del FT, así como las involucradas en la vía de traducción de señales de las MAPKs.

Finalmente, otra línea de estudio podría radicar en analizar la vía de Nrf-2 y la interacción con c-Jun, como afecta esto a la expresión de proteínas y a la respuesta al estrés oxidativo.

Anexo I.

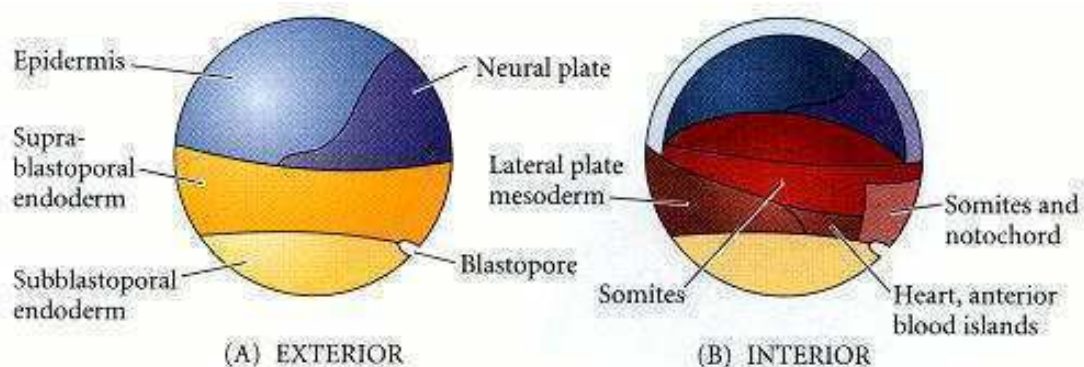
Epibolia del ectodermo [134].



(A) Cambios en la región alrededor del blastoporo a medida que los labios dorsales, laterales y ventrales se forman sucesivamente. Cuando el labio ventral completa el círculo, el endodermo comienza a ser progresivamente internalizado. (B) Resumen de la epibolia del ectodermo y la involución de las células del mesodermo que migran hacia el interior del blastoporo y luego hacia abajo de la superficie. El endodermo por debajo de los labios del blastoporo no es móvil y se encuentra limitado por estos movimientos.

Anexo II.

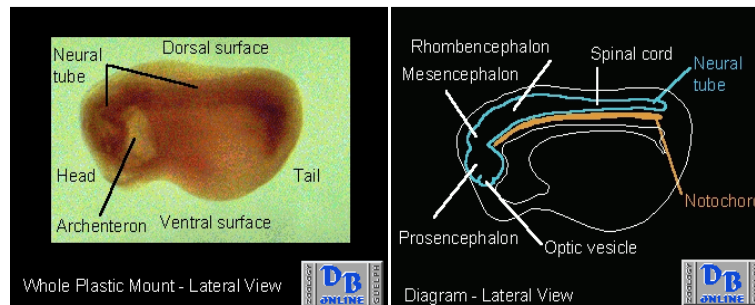
Mapa de destino de la blástula en *X. laevis* [134].



A) Exterior; (B) Interior. La mayoría de los derivados del mesodermo son formados a partir de las células del interior.

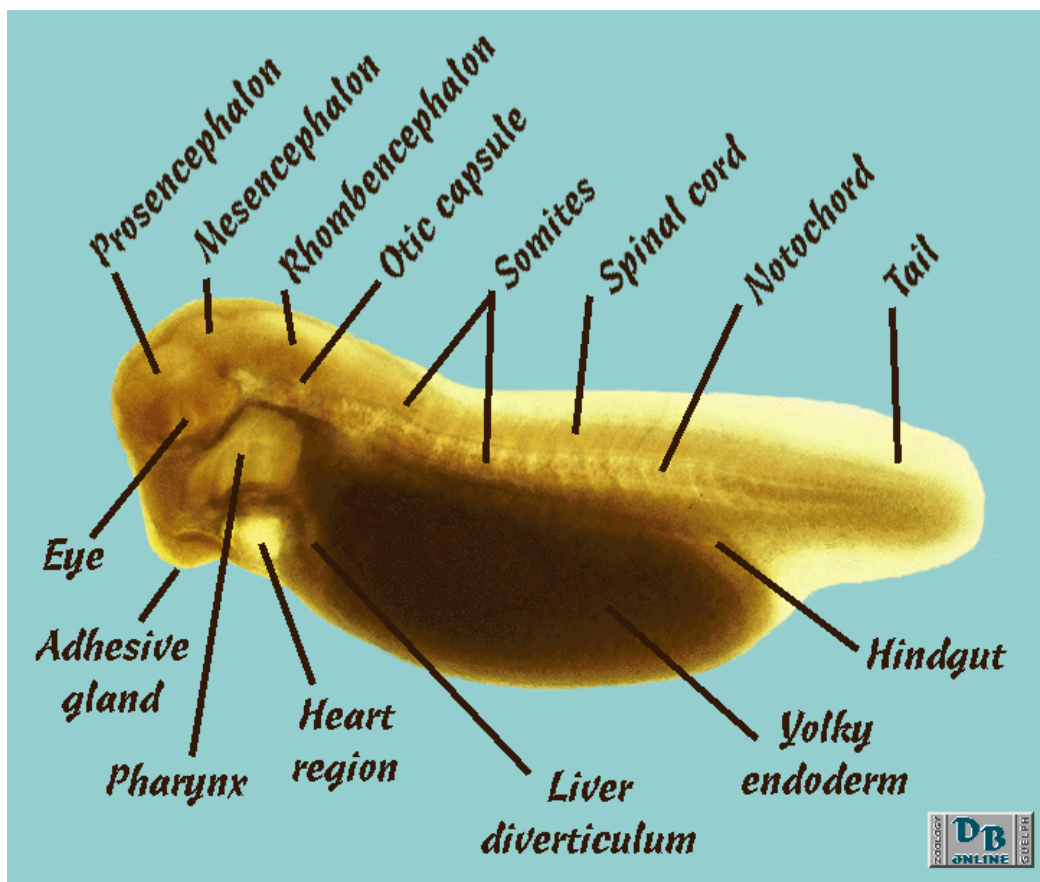
Anexo III

Detalle de un embrión en el estadio de Tubo Neural (TN) [199]



Anexo IV

Detalle de un embrión en el estadio de Brote Caudal (BC) [199]



1. Anguiano OL, Caballero de Castro A, Pechen de D'Angelo AM: **The role of glutathion conjugation in the regulation of early toad embryos' tolerance to pesticides.** *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2001, **128**(1):35-43.
2. Caballero de Castro AC, Rosenbaum EA, Pechen de D'Angelo AM: **Effect of malathion on Bufo arenarum Hensel development--I. Esterase inhibition and recovery.** *Biochem Pharmacol* 1991, **41**(4):491-495.
3. Ferrari A, Anguiano L, Lascano C, Sotomayor V, Rosenbaum E, Venturino A: **Changes in the antioxidant metabolism in the embryonic development of the common South American toad Bufo arenarum: differential responses to pesticide in early embryos and autonomous-feeding larvae.** *J Biochem Mol Toxicol* 2008, **22**(4):259-267.
4. EPA USEPA. In.; 2009.
5. Ware GW: **The Pesticide Book**, 6th ed.: Meister Pub Co; 2004.
6. U.S. Environmental Protection Agency E: **DDT Regulatory History: A Brief Survey (to 1975)**; 1975.
7. Carson R: **Silent Spring**, vol. 1, 40th Anniversary Edition ed.: Houghton Mifflin Harcourt; 2002.
8. Anguiano OL, Pechén de D'Angelo AM: **La problemática de los agroquímicos y sus envases, su incidencia en la salud de los trabajadores, la población expuesta por el ambiente**; 2007.
9. Reigart JR, Roberts JR: **Reconocimiento y manejo de los envenenamientos por pesticidas.**, 5th Edition ed; 1999.
10. Krieger RI: **Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology**, vol. Set 1&2, 3er Edition ed. London: Elsevier Inc.; 2010.
11. Peña CE, Carter DE, Ayala-Fierro F: **Toxicología ambiental: Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental.** Edited by website SHWP; 2001.
12. Morell Evangelista I, Jiménez Salas JR, Bandenay Egoávil L, Renau Llorens A, Renau Pruñonosa A: **Lección 22: Plaguicidas.** *Hidrogeoquímica*. Castellón de la Plana: 1-9.
13. Darnell JL, H; Berk, A; Zipursky, L; Matsudaira, P; Baltimore, D.: **Molecular Cell Biology 4th edition**, 4th Revised edition edition ed: W.H.Freeman & Co Ltd; 1999.

14. Berg JT, JL; Stryer, L.: **Biochemistry**, 5th Edition ed: W. H. Freeman; 2002.
15. Tortora GD, B: **Principios de anatomia y fisiologia**: Editorial Medica Panamericana; 2006.
16. Sánchez-Chávez G, Salceda R: **Enzimas polifuncionales: el caso de la acetilcolinesterasa**. *Revista de Educación Bioquímica* 2008, **27**(2):44-51.
17. Siegel G: **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**, 6th edition ed: Lippincott Williams & Wilkins; 1998.
18. Bernhard SA, Orgel LE: **Mechanism of enzyme inhibition by phosphate esters**. *Science* 1959, **130**:625-626.
19. Millard CB, Kryger G, Ordentlich A, Greenblatt HM, Harel M, Raves ML, Segall Y, Barak D, Shafferman A, Silman I *et al*: **Crystal structures of aged phosphonylated acetylcholinesterase: nerve agent reaction products at the atomic level**. *Biochemistry* 1999, **38**(22):7032-7039.
20. Taylor P: **Anticholinesterase agents**., 9th ed. New York: Mc Graw Hill; 1996.
21. Silman I, Millard CB, Ordentlich A, Greenblatt HM, Harel M, Barak D, Shafferman A, Sussman JL: **A preliminary comparison of structural models for catalytic intermediates of acetylcholinesterase**. *Chem Biol Interact* 1999, **119-120**:43-52.
22. Krieger R: **Handbook of Pesticide Toxicology**, 2nd ed; 2001.
23. Gupta RC: **Toxicology of organophosphate and carbamate compounds**: Elsevier Academic Press; 2006.
24. WHO WHO: **CHLORPYRIFOS (O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate)**. In: *WHO SPECIFICATIONS AND EVALUATIONS FOR PUBLIC HEALTH PESTICIDES*; 2009.
25. EPA USEPA: **Interim Reregistration Eligibility Decision for Chlorpyrifos**; 2006.
26. Huff RA, Abou-Donia MB: **In vitro effect of chlorpyrifos oxon on muscarinic receptors and adenylate cyclase**. *Neurotoxicology* 1995, **16**(2):281-290.
27. Katz EJ, Cortes VI, Eldefrawi ME, Eldefrawi AT: **Chlorpyrifos, parathion, and their oxons bind to and desensitize a nicotinic acetylcholine**

- receptor: relevance to their toxicities.** *Toxicol Appl Pharmacol* 1997, **146**(2):227-236.
28. Richardson RJ: **Assessment of the neurotoxic potential of chlorpyrifos relative to other organophosphorus compounds: a critical review of the literature.** *J Toxicol Environ Health* 1995, **44**(2):135-165.
29. Bomser J, Casida JE: **Activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK 44/42) by chlorpyrifos oxon in Chinese hamster ovary cells.** *J Biochem Mol Toxicol* 2000, **14**(6):346-353.
30. Ashida H, Matsumura F: **Effect of in vivo administered 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on DNA-binding activities of nuclear transcription factors in liver of guinea pigs.** *J Biochem Mol Toxicol* 1998, **12**(4):191-204.
31. Bjorkling F, Dahl A, Patkar S, Zundel M: **Inhibition of lipases by phosphonates.** *Bioorg Med Chem* 1994, **2**(7):697-705.
32. Campbell CG, Seidler FJ, Slotkin TA: **Chlorpyrifos interferes with cell development in rat brain regions.** *Brain Res Bull* 1997, **43**(2):179-189.
33. Roy TS, Andrews JE, Seidler FJ, Slotkin TA: **Chlorpyrifos elicits mitotic abnormalities and apoptosis in neuroepithelium of cultured rat embryos.** *Teratology* 1998, **58**(2):62-68.
34. Schuh RA, Lein PJ, Beckles RA, Jett DA: **Noncholinesterase mechanisms of chlorpyrifos neurotoxicity: altered phosphorylation of Ca²⁺/cAMP response element binding protein in cultured neurons.** *Toxicology App. Pharm.*, 2002, **182**:176-185.
35. Garcia SJ, Seidler FJ, Crumpton TL, Slotkin TA: **Does the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos involve glial targets? Macromolecule synthesis, adenylyl cyclase signaling, nuclear transcription factors, and formation of reactive oxygen in C6 glioma cells.** *Brain Res* 2001, **891**(1-2):54-68.
36. Abdallah EA, Jett DA, Eldefrawi ME, Eldefrawi AT: **Differential effects of paraoxon on the M3 muscarinic receptor and its effector system in rat submaxillary gland cells.** *J Biochem Toxicol* 1992, **7**(2):125-132.

37. Deli E, Kiss Z: **The effect of organophosphorous insecticide Wofatox 50 EC on the adenylate cyclase activity of chicken embryo muscle.** *Biochem Pharmacol* 1986, **35**(9):1603-1605.
38. Kojima H, Iida M, Katsura E, Kanetoshi A, Hori Y, Kobayashi K: **Effects of a diphenyl ether-type herbicide, chlornitrofen, and its amino derivative on androgen and estrogen receptor activities.** *Environ Health Perspect* 2003, **111**(4):497-502.
39. Gore AC: **Organochlorine pesticides directly regulate gonadotropin-releasing hormone gene expression and biosynthesis in the GT1-7 hypothalamic cell line.** *Mol Cell Endocrinol* 2002, **192**(1-2):157-170.
40. Dalton TP, Puga A, Shertzer HG: **Induction of cellular oxidative stress by aryl hydrocarbon receptor activation.** *Chem Biol Interact* 2002, **141**(1-2):77-95.
41. Robertson LW, Hansen LG: **PCBs: recent advances in environmental toxicology and health effects:** University Press of Kentucky; 2001.
42. Grunfeld HT, Bonefeld-Jorgensen EC: **Effect of in vitro estrogenic pesticides on human oestrogen receptor alpha and beta mRNA levels.** *Toxicol Lett* 2004, **151**(3):467-480.
43. Aldridge JE, Seidler FJ, Meyer A, Thillai I, Slotkin TA: **Serotonergic systems targeted by developmental exposure to chlorpyrifos: effects during different critical periods.** *Environ Health Perspect* 2003, **111**(14):1736-1743.
44. Matsumura F: **On the significance of the role of cellular stress response reactions in the toxic actions of dioxin.** *Biochem Pharmacol* 2003, **66**(4):527-540.
45. Adler V, Yin Z, Fuchs SY, Benezra M, Rosario L, Tew KD, Pincus MR, Sardana M, Henderson CJ, Wolf CR *et al*: **Regulation of JNK signaling by GSTp.** *Embo J* 1999, **18**(5):1321-1334.
46. Dam K, Seidler FJ, Slotkin TA: **Transcriptional biomarkers distinguish between vulnerable periods for developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: Implications for toxicogenomics.** *Brain Research Bulletin* 2003, **59**(4):261-265.

47. Crumpton TL, Seidler FJ, Slotkin TA: **Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos in vivo and in vitro: effects on nuclear transcription factors involved in cell replication and differentiation.** *Brain Res* 2000, **857**(1-2):87-98.
48. Ashida H, Nagy S, Matsumura F: **2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced changes in activities of nuclear protein kinases and phosphatases affecting DNA binding activity of c-Myc and AP-1 in the livers of guinea pigs.** *Biochem Pharmacol* 2000, **59**(7):741-751.
49. Eferl R, Wagner EF: **AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis.** *Nat Rev Cancer* 2003, **3**(11):859-868.
50. Hamdi M: **MAPKinase signaling and AP-1-regulated gene expression in cellular responses to DNA damage.** Leiden, Holanda.: Universidad de Leiden; 2008.
51. Reddy SPM, Mossman BT: **Role and regulation of activator protein-1 in toxicant-induced responses of the lung.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002, **283**:L1161-L1178.
52. Kallunki T, Deng T, Hibi M, Karin M: **c-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions.** *Cell* 1996, **87**(5):929-939.
53. Leclerc C, Duprat AM, Moreau M: **Noggin upregulates Fos expression by a calcium-mediated pathway in amphibian embryos.** *Dev Growth Differ* 1999, **41**(2):227-238.
54. Kruijer W, Cooper JA, Hunter T, Verma IM: **Platelet-derived growth factor induces rapid but transient expression of the c-fos gene and protein.** *Nature* 1984, **312**(5996):711-716.
55. Dong Z, Xu RH, Kim J, Zhan SN, Ma WY, Colburn NH, Kung H: **AP-1/jun is required for early Xenopus development and mediates mesoderm induction by fibroblast growth factor but not by activin.** *J Biol Chem* 1996, **271**(17):9942-9946.
56. Primiano T, Sutter TR, Kensler TW: **Redox regulation of genes that protect against carcinogens.** *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1997, **118**(3):487-497.

-
57. Morgan JI, Curran T: **Proto-oncogene transcription factors and epilepsy.** *Trends Pharmacol Sci* 1991, **12**(9):343-349.
58. Moser VC, Padilla S: **Age- and gender-related differences in the time course of behavioral and biochemical effects produced by oral chlorpyrifos in rats.** *Toxicol Appl Pharmacol* 1998, **149**(1):107-119.
59. Whitney KD, Seidler FJ, Slotkin TA: **Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: cellular mechanisms.** *Toxicol Appl Pharmacol* 1995, **134**(1):53-62.
60. Mortensen SR, Brimijoin S, Hooper MJ, Padilla S: **Comparison of the in vitro sensitivity of rat acetylcholinesterase to chlorpyrifos-oxon: what do tissue IC50 values represent?** *Toxicol Appl Pharmacol* 1998, **148**(1):46-49.
61. Mortensen SR, Chanda SM, Hooper MJ, Padilla S: **Maturation differences in chlorpyrifos-oxonase activity may contribute to age-related sensitivity to chlorpyrifos.** *J Biochem Toxicol* 1996, **11**(6):279-287.
62. Brimijoin S, Koenigsberger C: **Cholinesterases in Neural Development: New Findings and Toxicologic Implications.** *Environ Health Perspect*; 1999, **107**(1):59-64.
63. Sies H: **Strategies of antioxidant defense.** *Eur J Biochem* 1993, **215**(2):213-219.
64. Venturino A, Anguiano OL, Gauna L, Cocca C, Bergoc RM, Pechen de D'Angelo AM: **Thiols and polyamines in the potentiation of malathion toxicity in larval stages of the toad Bufo arenarum.** *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2001, **130**(2):191-198.
65. Rao JV: **Biochemical alterations in euryhaline fish, Oreochromis mossambicus exposed to sub-lethal concentrations of an organophosphorus insecticide, monocrotophos.** *Chemosphere* 2006, **65**(10):1814-1820.
66. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J: **Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress.** *Free Radic Biol Med* 1994, **17**(3):235-248.

67. Klaunig JE, Xu Y, Isenberg JS, Bachowski S, Kolaja KL, Jiang J, Stevenson DE, Walborg EF: **The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis.** *Environ Health Perspect* 1998, **106 Suppl 1**:289-295.
68. Bickers DR, Athar M: **Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease.** *J Invest Dermatol* 2006, **126**(12):2565-2575.
69. Sen CK, Packer L: **Antioxidant and redox regulation of gene transcription.** *Faseb J* 1996, **10**(7):709-720.
70. Alam J, Wicks C, Stewart D, Gong P, Touchard C, Otterbein S, Choi AM, Burow ME, Tou J: **Mechanism of heme oxygenase-1 gene activation by cadmium in MCF-7 mammary epithelial cells. Role of p38 kinase and Nrf2 transcription factor.** *J Biol Chem* 2000, **275**(36):27694-27702.
71. Jaiswal AK: **Regulation of genes encoding NAD(P)H:quinone oxidoreductases.** *Free Radic Biol Med* 2000, **29**(3-4):254-262.
72. Moinova HR, Mulcahy RT: **Up-regulation of the human gamma-glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene involves binding of Nrf-2 to an electrophile responsive element.** *Biochem Biophys Res Commun* 1999, **261**(3):661-668.
73. Nguyen T, Huang HC, Pickett CB: **Transcriptional regulation of the antioxidant response element. Activation by Nrf2 and repression by MafK.** *J Biol Chem* 2000, **275**(20):15466-15473.
74. Rushmore TH, Pickett CB: **Transcriptional regulation of the rat glutathione S-transferase Ya subunit gene. Characterization of a xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by phenolic antioxidants.** *J Biol Chem* 1990, **265**(24):14648-14653.
75. Sharma Y, Bashir S, Irshad M, Nag TC, Dogra TD: **Dimethoate-induced effects on antioxidant status of liver and brain of rats following subchronic exposure.** *Toxicology* 2005, **215**(3):173-181.
76. Osborne HB, Cormier P, Lorillon O, Maniey D, Belle R: **An appraisal of the developmental importance of polyamine changes in early *Xenopus* embryos.** *Int J Dev Biol* 1993, **37**(4):615-618.
77. Tabor CW, Tabor H: **Polyamines.** *Annu Rev Biochem* 1984, **53**:749.
78. Tabor CW, Tabor H: **Polyamines in microorganisms.** *Microbiol Mol Biol Rev* 1985, **49**(1):81-99.

79. Pegg AE: **Polyamine Metabolism and Its Importance in Neoplastic Growth and as a Target for Chemotherapy.** *Cancer Res* 1988, **48**(4):759-774.
80. Pegg AE: **Mammalian polyamine metabolism and function.** *IUBMB Life* 2009, **61**(9):880-894.
81. Russell DH: **Ornithine decarboxylase: a key regulatory enzyme in normal and neoplastic growth.** *Drug Metab Rev* 1985, **16**(1-2):1-88.
82. Criss WE: **A Review of Polyamines and Cancer.** *Turk J Med Sci* 2003, **33**:195-205.
83. Bachrach U, Wang YC, Tabib A: **Polyamines: new cues in cellular signal transduction.** *News Physiol Sci* 2001, **16**:106-109.
84. Wang JY, McCormack SA, Viar MJ, Wang H, Tzen CY, Scott RE, Johnson LR: **Decreased expression of protooncogenes c-fos, c-myc, and c-jun following polyamine depletion in IEC-6 cells.** *Am J Physiol* 1993, **265**(2 Pt 1):G331-338.
85. Coffino P, Poznanski A: **Killer polyamines?** *J Cell Biochem* 1991, **45**(1):54-58.
86. Siu LL, Rowinsky EK, Hammond LA, Weiss GR, Hidalgo M, Clark GM, Moczygemba J, Choi L, Linnartz R, Barbet NC *et al*: **A phase I and pharmacokinetic study of SAM486A, a novel polyamine biosynthesis inhibitor, administered on a daily-times-five every-three-week schedule in patients with Advanced solid malignancies.** *Clin Cancer Res* 2002, **8**(7):2157-2166.
87. Cohen SS: **Guide to polyamines:** Oxford University Press; 1998.
88. Coffino P: **Antizyme, a mediator of ubiquitin-independent proteasomal degradation.** *Biochimie* 2001, **83**(3-4):319-323.
89. Hayashi S, Murakami Y: **Rapid and regulated degradation of ornithine decarboxylase.** *Biochem J* 1995, **306** (Pt 1):1-10.
90. Chopra S, Wallace HM: **Induction of spermidine/spermine N1-acetyltransferase in human cancer cells in response to increased production of reactive oxygen species.** *Biochem Pharmacol* 1998, **55**(7):1119-1123.

91. Gerner EW, Meyskens FL: **Polyamines and cancer: old molecules, new understanding.** *Nat Rev Cancer* 2004, **4**(10):781-792.
92. Pegg AE, Madhubala R, Kameji T, Bergeron RJ: **Control of ornithine decarboxylase activity in alpha- difluoromethylornithine-resistant L1210 cells by polyamines and synthetic analogues.** *J Biol Chem* 1988, **263**(22):11008-11014.
93. Tabor CW, Tabor H: **1,4-Diaminobutane (putrescine), spermidine, and spermine.** *Annu Rev Biochem* 1976, **45**:285-306.
94. Coleman CS, Hu G, Pegg AE: **Putrescine biosynthesis in mammalian tissues.** *Biochem J* 2004, **379**(Pt 3):849-855.
95. Coleman CS, Stanley BA, Viswanath R, Pegg AE: **Rapid exchange of subunits of mammalian ornithine decarboxylase.** *J Biol Chem* 1994, **269**(5):3155-3158.
96. Qin C, Samudio I, Ngwenya S, Safe S: **Estrogen-dependent regulation of ornithine decarboxylase in breast cancer cells through activation of nongenomic cAMP-dependent pathways.** *Mol Carcinog* 2004, **40**(3):160-170.
97. Zhao B, Butler AP: **Core promoter involvement in the induction of rat ornithine decarboxylase by phorbol esters.** *Mol Carcinog* 2001, **32**(2):92-99.
98. Nilsson JA, Maclean KH, Keller UB, Pendeville H, Baudino TA, Cleveland JL: **Mnt loss triggers Myc transcription targets, proliferation, apoptosis, and transformation.** *Mol Cell Biol* 2004, **24**(4):1560-1569.
99. Packham G, Cleveland JL: **Ornithine decarboxylase is a mediator of c-Myc-induced apoptosis.** *Mol Cell Biol* 1994, **14**(9):5741-5747.
100. Shantz LM: **Transcriptional and translational control of ornithine decarboxylase during Ras transformation.** *Biochem J* 2004, **377**(Pt 1):257-264.
101. Pegg AE: **Regulation of Ornithine Decarboxylase.** *J Biol Chem* 2006, **281**(21):14529-14532.
102. Tseng CP, Verma AK: **Lack of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate responsiveness of ornithine decarboxylase introns which have AP-1 consensus sequences.** *Mol Cell Biochem* 1995, **146**(1):7-12.

103. Wrighton C, Busslinger M: **Direct transcriptional stimulation of the ornithine decarboxylase gene by Fos in PC12 cells but not in fibroblasts.** *Mol Cell Biol* 1993, **13**(8):4657-4669.
104. Bello-Fernandez C, Packham G, Cleveland JL: **The Ornithine Decarboxylase Gene is a Transcriptional Target of c-Myc.** *PNAS*; 1993, **90**(16):7804-7808.
105. Flamigni F, Facchini A, Capanni C, Stefanelli C, Tantini B, Caldarera CM: **p44/42 mitogen-activated protein kinase is involved in the expression of ornithine decarboxylase in leukaemia L1210 cells.** *Biochem J* 1999, **341 (Pt 2)**:363-369.
106. Auvinen M, Paasinen-Sohns A, Hirai H, Andersson LC, Holtta E: **Ornithine decarboxylase- and ras-induced cell transformations: reversal by protein tyrosine kinase inhibitors and role of pp130CAS.** *Mol Cell Biol* 1995, **15**(12):6513-6525.
107. Tabib A, Bachrach U: **Role of polyamines in mediating malignant transformation and oncogene expression.** *Int J Biochem Cell Biol* 1999, **31**(11):1289-1295.
108. Tetia D, Visallia M, McNairb H: **Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions.** *J. Chromatography B* 2002, **781**:107-149.
109. Wallace HM, Fraser AV, Hughes A: **A perspective of polyamine metabolism.** *Biochem J* 2003, **376**(Pt 1):1-14.
110. Peakall DBK, S.: **Introduction to the Special Issue on Biomarkers.** *Ecotoxicology* 1999, **8**(5):327.
111. Van Gestel CAM, Van Brummelen, T.C.: **Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms.** *Ecotoxicology* 1996, **5**(4):217-225.
112. Grandjean P, S.S. B, P. R, D.S. Y: **Biomarkers of chemical exposure: State of the art.** *Clin Chem* 1994, **40**:1360-1362.
113. Gil Hernandez F: **El papel de los biomarcadores en Toxicología Humana.** In.: Departamento de Medicina Legal y Toxicología. Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.
114. Repetto M: **Diagnóstico de la intoxicación.** Madrid: Díaz de Santos; 1997

115. Lionetto MGC, R.; Giordano, M.E.; Schettino, T. : **Acetylcholinesterase as biomarker in environmental biomonitoring**. In: *Recent trends in the acetylcholinesterase system*. Edited by Kumars MPaS; 2005: 91-102.
116. Ferrari A, Venturino A, Pechén de D'Angelo A: **Muscular and brain cholinesterase sensitivities to azinphos methyl and carbaryl in the juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss***. *Comp Biochem Physiol C* 2007, **146**:308–313.
117. Ferrari A, Anguiano L, Soleno J, Venturino A, Pechen de D'Angelo AM: **Different susceptibility of two aquatic vertebrates (*Oncorhynchus mykiss* and *Bufo arenarum*) to azinphos methyl and carbaryl**. *Comp Biochem Physiol C* 2004, **139**:239–243.
118. Anguiano L, Caballero de Castro A, Rosenbaum E, Venturino A, Pechén de D'Angelo AM: **Afectan los plaguicidas la supervivencia de las poblaciones de anfibios?** *Extras del Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia"* 1998(149):1-10.
119. Cavieres MF, Jaeger J, Porter W: **Developmental toxicity of a commercial herbicide mixture in mice: I. Effects on embryo implantation and litter size**. *Environ Health Perspect* 2002, **110**(11):1081-1085.
120. Choi K-C JE-B: **The biomarker and endocrine disruptors in mammals**. *J Reprod Dev* 2002, **49**:337-345.
121. Hayes TB: **Steroids as modulators of thyroid hormone activity in amphibian development**. *Am Zool* 1997b, **185-195**.
122. Hayes TB: **Steroid-mimicking environmental contaminants: heir potential role in amphibian declines**. *Herpetologia Bonnensis* 1997a:145-150.
123. Wang X-M ZK-J, Wang Z-H, Ding Y-Z, Wu W, Huang S.: **The decline of the Chinese giant salamander *Andrias davidianus* and implications for its conservation**. *Oryx* 2004, **36**:197-202.
124. Bishop C MN, Struger J, Ng P, Petit K.: **Anuran development, density, and diversity in relation to agricultural activity in the Holland River watershed, Ontario, Canada (1990–1992)**. *Environ Monit Assess* 1999, **57**:21-43.

125. Blaustein AR WD: **Amphibian declines: judging stability, persistence and susceptibility of populations to local and global extinction.** *Trends Ecol Evol* 1990, **5**:203-204.
126. Adams M: **Correlated factors in amphibian decline: exotic species and habitat change in western Washington.** *J Wildl Manag* 1999, **63**:1162-1171.
127. **Reptile and Amphibian Toxicological Literature Database Ottawa, Ontario, CN: Environment Canada.**
[<http://www.cwsscf.ec.gc.ca/publications/AbstractTemplate.cfm?lang=e&iid=321>]
128. Howard R: **Sexual dimorphism in bullfrogs.** *Ecology* 1981, **63**:303-310.
129. Shine R: **Ecological causes for the evolution of sexual dimorphism: a review of the evidence.** *Q Rev Biol* 1989, **64**:419-461.
130. Shine R: **Sexual selection and sexual dimorphism in the amphibia.** *Copeia* 1979:297-306.
131. Herkovits J, Perez-Coll CS, Herkovits FD: **Ecotoxicity in the Reconquista River, province of Buenos Aires, Argentina: a preliminary study.** *Environ Health Perspect* 1996, **104**(2):186-189.
132. Del Conte E, Sirlin JL: **Pattern series of the first embrionary stages in Bufo arenarum.** *Anat Rec* 1952, **112**(1):125-135.
[<http://www.euskomedia.org/PDFAnlt/munibe/1958325344.pdf>]
134. Gilbert SF: **Developmental Biology**, 8th Ed.: Sinauer Associates Inc; 2006.
135. Venturino A, Rosenbaum E, Caballero de Castro A, Anguiano OL, Gauna L, Fonovich de Schroeder T, Pechen de D'Angelo AM: **Biomarkers of effect in toads and frogs.** *Biomarkers* 2003, **8**(3-4):167-186.
136. Veenstra GJ: **Early embryonic gene transcription in Xenopus.** *Advances in Dev. Biol. and Biochem.*; 2002, **12**:85-105.
137. Knochel S, Schuler-Metz A, Knochel W: **c-Jun (AP-1) activates BMP-4 transcription in Xenopus embryos.** *Mech Dev* 2000, **98**(1-2):29-36.
138. Bagowski CP, Xiong W, Ferrell JE, Jr.: **c-Jun N-terminal kinase activation in Xenopus laevis eggs and embryos. A possible non-genomic role for the JNK signaling pathway.** *J Biol Chem* 2001, **276**(2):1459-1465.

139. Mohun TJ, Garrett N, Taylor MV: **Temporal and tissue-specific expression of the proto-oncogene c-fos during development in *Xenopus laevis*.** *Development* 1989, **107**(4):835-846.
140. Kindy MS, Verma IM: **Developmental expression of the *Xenopus laevis* fos protooncogene.** *Cell Growth Differ* 1990, **1**(1):27-37.
141. Cobellis G, Meccariello R, Fienga G, Pierantoni R, Fasano S: **Cytoplasmic and nuclear Fos protein forms regulate resumption of spermatogenesis in the frog, *Rana esculenta*.** *Endocrinology* 2002, **143**(1):163-170.
142. Amicarelli F, Ragnelli AM, Aimola P, Cattani F, Bonfigli A, Zarivi O, Miranda M, Di Ilio C: **Developmental expression and distribution of amphibian glutathione transferases.** *Biochim Biophys Acta* 2001, **1526**(1):77-85.
143. USGS CERC: **Aquatic Toxicology.** In: USGS.
144. Hayes TB, Case P, Chui S, Chung D, Haeffele C, Haston K, Lee M, Mai VP, Marjuoa Y, Parker J *et al*: **Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact?** *Environ Health Perspect* 2006, **114 Suppl 1**:40-50.
145. Matsumura F: **Effects of pesticides on wildlife.** In: *Toxicology of Insecticides*. 2nd Ed.: Plenum Press, New York y London.; 1985: 437-487.
146. Eddleston M, Karalliedde L, Buckley N, Fernando R, Hutchinson G, Isbister G, Konradsen F, Murray D, Piola JC, Senanayake N *et al*: **Pesticide poisoning in the developing world--a minimum pesticides list.** *Lancet* 2002, **360**(9340):1163-1167.
147. Souza MS, Magnarelli GG, Rovedatti MG, Cruz SS, De D'Angelo AM: **Prenatal exposure to pesticides: analysis of human placental acetylcholinesterase, glutathione S-transferase and catalase as biomarkers of effect.** *Biomarkers* 2005, **10**(5):376-389.
148. Sanchez S, Rovedatti MG, Santa Cruz S, Magnarelli G, Pechén de D'Angelo AM: **Exposición no ocupacional a organofosforados en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén: alteraciones hematológicas en embarazadas. .** *Acta Toxicológica Argentina* 2005, **13**:49.

149. Miyamoto JT, J.; Mihara, K.: **Pesticide and Xenobiotic Metabolism in Aquatic Organisms**. In: *Metabolism of organophosphorous insecticides in aquatic organisms, with special emphasis on fenitrothion*. 1979.
150. Vitt LJC, J. P.; Wilbur,H.M.; Smith, C. D. : **Amphibians as harbingers of decay**. *Bioscience* 1990, **40**:418.
151. Hayes T, Haston K, Tsui M, Hoang A, Haeffele C, Vonk A: **Herbicides: feminization of male frogs in the wild**. *Nature* 2002, **419**(6910):895-896.
152. Fonovich de Schroeder TM, Pechen de D'Angelo AM: **Dieldrin modifies the hydrolysis of PIP2 and decreases the fertilization rate in Bufo arenarum oocytes**. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1995, **112**(1):61-67.
153. Loewy RM, Carvajal LG, Novelli M, de D'Angelo AM: **Effect of pesticide use in fruit production orchards on shallow ground water**. *J Environ Sci Health B* 2003, **38**(3):317-325.
154. Adams SM, Giesy JP, Tremblay LA, C.T.Eason: **The use of biomarkers in ecological risk assessment: recommendations from the Christchurch conference on Biomarkers in Ecotoxicology**. . *Biomarkers* 2001, **6**:1-6.
155. Gruber SJ, Munn MD: **Organophosphate and carbamate insecticides in agricultural waters and cholinesterase (ChE) inhibition in common carp (Cyprinus carpio)**. . *Arch Environ Contam Toxicol* 1998, **35**:391-396.
156. Vale JA: **Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning**. . *Toxicol Lett* 1998, **102-103**:649-652.
157. Doyotte A, Cossu C, Jacquin CM, Babut M, Vasseur P: **Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve Unio tumidus**. . *Aquat Toxicol* 1997, **39**:93-110.
158. Enan E, Matsumura F: **Activation of c-Neu tyrosine Kinase by o,p'-DDT and HCH in cell-free and intact cell preparations from MCF-7 human breast cancer cells**. *J Biochem Toxicol* 1998, **12**:83-91.
159. Finney DJ: **Probit Analysis**, 3rd ed.: Cambridge University Press; 1971.
160. Raymond M: **Présentation d'un programme Basic d'analyse log-probit pour micro-ordinateur**. *Entomologie médicale et Parasitologie* 1985, **23**:117-121.

161. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: **Protein measurement with the folin phenol reagent.** *J Biol Chem* 1951, **193**(1):265-275.
162. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Feather-Stone RM: **A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.** *Biochem Pharmacol* 1961, **7**:88-95.
163. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB: **Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation.** *J Biol Chem* 1974, **249**(22):7130-7139.
164. Beers RF, Jr., Sizer IW: **A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase.** *J Biol Chem* 1952, **195**(1):133-140.
165. Regoli F, Nigro M, Benedetti M, Fattorini D, Gorbi S: **Antioxidant efficiency in early life stages of the Antarctic silverfish, *Pleuragramma antarcticum*: responsiveness to pro-oxidant conditions of platelet ice and chemical exposure.** *Aquat Toxicol* 2005, **75**(1):43-52.
166. Gaines DW, Friedman L, Braunberg RC: **Facilitated micromethod for measurement of metabolically generated $^{14}\text{CO}_2$, with application to measurement of ornithine decarboxylase.** *Anal Biochem* 1989, **178**(1):52-56.
167. Schenkel E, Berlaimont V, Dubois J, Helson-Cambier M, Hanocq M: **Improved high-performance liquid chromatographic method for the determination of polyamines as their benzoylated derivatives: application to P388 cancer cells.** *J Chromatogr B Biomed Appl* 1995, **668**(2):189-197.
168. Rubin RA, O'Keefe EJ, Earp HS: **Alteration of Epidermal Growth Factor-Dependent Phosphorylation during Rat Liver Regeneration.** *PNAS* *%R* 101073/pnas793776 1982, **79**(3):776-780.
169. Randi AS, Sancovich HA, Ferramola de Sanc AM, Loaiza A, Krawiec L, Kleiman de Pisare DL: **Hexachlorobenzene-induced alterations of rat hepatic microsomal membrane function.** *Toxicology* 1998, **125**(2-3):83-94.
170. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**(5259):680-685.

171. Rosenbaum EA, de Castro AC, Gauna L, Pechen de D'Angelo AM: **Early biochemical changes produced by malathion on toad embryos.** *Arch Environ Contam Toxicol* 1988, **17**(6):831-835.
172. Bevan CL, Porter DM, Prasad A, Howard MJ, Henderson LP: **Environmental estrogens alter early development in *Xenopus laevis*.** *Environ Health Perspect* 2003, **111**(4):488-496.
173. Colborn T: **A case for revisiting the safety of pesticides: a closer look at neurodevelopment.** *Environ Health Perspect* 2006, **114**(1):10-17.
174. Garcia SJ, Seidler FJ, Slotkin TA: **Developmental neurotoxicity elicited by prenatal or postnatal chlorpyrifos exposure: effects on neurospecific proteins indicate changing vulnerabilities.** *Environ Health Perspect* 2003, **111**(3):297-303.
175. Qiao D, Seidler FJ, Slotkin TA: **Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos modeled in vitro: comparative effects of metabolites and other cholinesterase inhibitors on DNA synthesis in PC12 and C6 cells.** *Environ Health Perspect* 2001, **109**(9):909-913.
176. Qiao D, Seidler FJ, Tate CA, Cousins MM, Slotkin TA: **Fetal chlorpyrifos exposure: adverse effects on brain cell development and cholinergic biomarkers emerge postnatally and continue into adolescence and adulthood.** *Environ Health Perspect* 2003, **111**(4):536-544.
177. Blaustein AR, Wake DB: **Amphibian declines: judging stability, persistence and susceptibility of populations to local and global extinction.** *Trens Ecol Evol* 1990, **5**:203-204.
178. Wang XM, Zhang KJ, Wang ZH, Ding YZ, Wu W, Huang S: **The decline of the Chinese giant salamander *Andrias davidianus* and implications for its conservation.** *Oryx* 2004, **36**:197-202.
179. Fierro AC, Thuret R, Coen L, Perron M, Demeneix BA, Wegnez M, Gyapay G, Weissenbach J, Wincker P, Mazabraud A *et al*: **Exploring nervous system transcriptomes during embryogenesis and metamorphosis in *Xenopus tropicalis* using EST analysis.** *BMC Genomics* 2007, **8**:118.
180. Berrill M, Coulson D, McGillivray L, Pauli B: **Toxicity of endosulfan to aquatic stages of anuran amphibians.** *Environmental Toxicology and Chemistry* 1998, **17**:1738 -1744.

181. Pauli BD, Coulson DR, Berrill M: **Sensitivity of amphibian embryos and tadpoles to mimic® 240 lv insecticide following single or double exposures.** . *Environmental Toxicology and Chemistry* 1999, **18**(11):2538-2544.
182. Bonfanti P, Colombo A, Orsi F, Nizzetto I, Andrioletti M, Bacchetta R, Mantecca P, Fascio U, Vailati G, Vismara C: **Comparative teratogenicity of chlorpyrifos and malathion on *Xenopus laevis* development.** *Aquat Toxicol* 2004, **70**(3):189-200.
183. Richards SM, Kendall RJ: **Biochemical effects of chlorpyrifos on two developmental stages of *Xenopus laevis*.** *Environ Toxicol Chem* 2002, **21**(9):1826-1835.
184. Breslin WJ, Liberacki AB, Dittenber DA, Quast JF: **Evaluation of the Developmental and Reproductive Toxicity of Chlorpyrifos in the Rat.** *Toxicol Sci* 1996, **29**(1):119-130.
185. Gibson JE, Peterson RK, Shurdut BA: **Human exposure and risk from indoor use of chlorpyrifos.** *Environ Health Perspect* 1998, **106**(6):303-306.
186. Kaufer D: **Beyond the cholinergic hypothesis: the effect of metrifonate and other cholinesterase inhibitors on neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease.** *Dement Geriatr Cogn Disord* 1998, **9 Suppl 2**:8-14.
187. Kaufer D, Friedman A, Seidman S, Soreq H: **Anticholinesterases induce multigenic transcriptional feedback response suppressing cholinergic neurotransmission.** *Chem Biol Interact* 1999, **119-120**:349-360.
188. Lascano C, Anguiano L, Ferrari A, Venturino A: **Metabolismo Antioxidante y respuesta de AChE frente a diferentes concentraciones de metilazinfos en embriones de *Bufo arenarum*.** In: *XV Congreso Argentino de Toxicología: 2007; Neuquén, Argentina: Asociación Toxicológica Argentina (ATA); 2007.*
189. Matsson MP: **Hormesis Defined.** *Ageing Res Rev* 2008 **7**(1):1-7.
190. Jaiswal AK: **Nrf2 signalling in coordinated activation of antioxidant gene expression.** . *Free Radic Biol Med* 2004, **36**:1199-1207.
191. Sotomayor V, Venturino A, Ferrari A, Pechén de D'Angelo AM: **Molecular and enzymatic responses to organophosphates in *Bufo arenarum***

- embryos.** In: *41st National Meeting of the Argentine Society for Biochemical and molecular biology investigations (SAIB)*. Edited by SAIB. Pinamar, Argentina; 2005.
192. Markovic J, Borrás C, Ortega A, Sastre J, Vina J, Pallardo FV: **Glutathione is recruited into the nucleus in early phases of cell proliferation.** *J Biol Chem* 2007, **282**(28):20416-20424.
193. Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J: **A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins.** *J Natl Cancer Inst* 2000, **92**(16):1295-1302.
194. Grassilli E, Desiderio MA, Bellesia E, Salomoni P, Benatti F, Franceschi C: **Is Polyamine Decrease a Common Feature of Apoptosis? Evidence from [gamma] Rays- and Heat Shock-Induced Cell Death.** 1995, **216**(2):708-714.
195. Venturino A, Gauna LE, Bergoc RM, Pechen de D'Angelo AM: **Effect of exogenously applied polyamines on malathion toxicity in the toad *Bufo arenarum* Hensel.** *Arch Environ Contam Toxicol* 1992, **22**(1):135-139.
196. Asher G, Bercovich Z, Tsvetkov P, Shaul Y, Kahana C: **20S proteasomal degradation of ornithine decarboxylase is regulated by NQO1.** *Mol Cell* 2005, **17**(5):645-655.
197. Cao Y, Zhao H, Hollemann T, Chen Y, Grunz H: **Tissue-specific expression of an Ornithine decarboxylase paralogue, XODC2, in *Xenopus laevis*.** *Mech Dev* 2001, **102**(1-2):243-246.
198. Bensaad K, Rouillard D, Soussi T: **Regulation of the cell cycle by p53 after DNA damage in an amphibian cell line.** *Oncogene* 2001, **20**(29):3766-3775.
199. Scadding S, Ackerley S: **Developmental Biology Web Site;** 1996.

Dra. A.M. Pechén
de D'Angelo

Dr. Andrés Venturino

Verónica Sotomayor