UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Relación entre dosis administrada, dosis interna y efectos adversos luego de una co-exposición aguda a insecticidas piretroides en rata

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

Química. Mónica Elizabeth Mosquera Ortega

Director de tesis: Dr. Marcelo Javier Wolansky

Co-directora: Dra. Edda Villaamil Lepori

Consejera de Estudios: Dra. Adriana Cochón

Lugar de trabajo: Laboratorio de Toxicología de Mezclas Químicas. Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. IQUIBICEN, CONICET.

Buenos Aires, Mayo de 2020

RESUMEN

Relación entre dosis administrada, dosis interna y efectos adversos luego de una co-exposición aguda a insecticidas piretroides en rata

La exposición aguda o crónica de mamíferos (incluyendo humanos) a los plaguicidas modernos puede causar neurotoxicidad. Los piretroides (PIRs) son insecticidas sintéticos cuyo uso en el control de plagas a nivel agrícola y peri-domiciliario se ha incrementado en los últimos años. Se propone que la mayoría de los PIRs comparten el mismo modo primario de acción (MdA) en las plagas (insectos) y en los mamíferos. Para cada PIR administrado de manera individual los estudios previos realizados en ratas adultas reportan que la toxicidad difiere de un compuesto a otro hasta 10^3 veces, ya sea evaluando efectos adversos subletales o letalidad. Si bien existen estudios medioambientales que confirman la exposición simultánea a dosis bajas de múltiples PIRs, se dispone de poca información toxicológica que permita fundamentar empíricamente los rangos de dosis que pueden considerarse inocuos en humanos luego de exposición a combinaciones de PIRs, que es lo que puede ocurrir en la realidad.

En este trabajo se expusieron ratas Wistar adultas machos a dosis orales agudas bajas (0,1-12 mg/kg) de PIRs Tipo I (Bifentrina y Teflutrina) y Tipo II (α-Cipermetrina y Deltametrina) a fin de evaluar las curvas dosis-efecto de cada PIR. La variación de temperatura subcutánea (Tsc) se usó como medida de efecto neurotóxico. La Tsc se registró cada 30 minutos durante 5 h, y ~1 h después de finalizar el monitoreo de Tsc se sacrificaron los animales, se extrajeron muestras de sangre, hígado y cerebelo, y se determinó la concentración de cada PIR en los tejidos mediante cromatografía gaseosa con detector de captura de electrones (GC-ECD).

Como hipótesis se consideró que la acción combinada de dosis bajas de estos PIRs debía seguir los postulados del "modelo de dosis aditiva" (dose addition) teniendo en cuenta que estos insecticidas tienen un mismo MdA en ratas.

Los resultados mostraron que al administrar cada PIR en forma individual o combinada hubo relación directa entre la dosis administrada, la concentración en tejidos, y la magnitud del efecto sobre la Tsc. Además, la relación dosis-efecto obtenida, las concentraciones absolutas de los 4 PIRs y sus proporciones (respecto a la carga total de PIRs) en los tejidos examinados luego de la administración de la mezcla sugieren la ausencia de interacción sinérgica y la confirmación de la hipótesis (modelo de dosis aditiva).

Este trabajo permite ejemplificar una aproximación metodológica exploratoria para evaluar hipótesis relevantes en los procesos de evaluación de riesgo, especialmente en el caso de escenarios realistas de exposición humana (ambiental, ocupacional o alimentaria) a mezclas de estos plaguicidas.

Palabras clave: Piretroides, mezcla, neurotoxicidad, temperatura corporal, rata, concentración en tejido, dosis aditiva.

ABSTRACT

Relationship between administered dose, internal dose and adverse effect after acute co-exposure to pyrethroid pesticides in rat

Acute or chronic exposure to modern pesticides may cause neurotoxicity in mammals (including humans). Pyrethroid insecticides (PYRs) are synthetic compounds increasingly used for agricultural and household pest control. *In vivo* and *in vitro* evidence strongly suggest that PYRs share a similar primary Mode of Action (MoA) in pests (insects) and mammals. In general, single-compound dose-effect studies using sublethal effects and lethality as endpoints have shown that toxicity may differ up to 10^3-fold across PYRs in adult rats. There are several environmental studies reporting simultaneous exposure to low doses of multiple PYRs, but little toxicological information is available to empirically establish maximum safe levels of PYRs in humans after low-dose combined exposure to multiple PYRs.

In this PhD Thesis, male adult Wistar rats were exposed to low acute oral doses (0.1-12 mg/kg) of Type I (Bifenthrin and Tefluthrin) and Type II (α-Cypermethrin and Deltamethrin) PYRs in order to obtain single-compound dose-effect curves and identify low-dose levels for every PYR. Subcutaneous temperature (Tsc) monitoring was conducted for a measure of neurotoxicity. Tsc was recorded every 30 minutes through 5 h, and ~ 1 h after animals were sacrificed, blood, liver and cerebellum samples were dissected out, and the concentration of the test PYRs was measured using gas chromatography with an Electron Capture Detector (GC-ECD system).

As a hypothesis, it was considered that the combined action of low doses of these PYRs should follow the postulates of the "dose addition model" considering that these insecticides share a similar MOA in adult rats.

The results showed a direct relationship between the administered dose, the concentration of test chemicals in the tissues, and the magnitude of the Tsc effect in single compound and combined assays. Furthermore, the exposure-dose-effect relationship obtained, the absolute concentrations of the 4 PYRs and their proportions ([PYRi] / Σ[PYRs]) in the tissues examined after the administration of the mixture did not provide any evidence of synergy, and strongly suggest a the confirmation of the hypothesis (dose addition model).

This work allows exemplifying an exploratory methodological approach to evaluate relevant hypotheses in the processes of risk assessment, especially in the case of simulations of environmentally relevant scenarios of exposure (dietary, environmental and/or occupational) to PYR mixtures in humans.

Keywords: Pyrethroids, mixture, neurotoxicity, body temperature, cumulative, rat, tissue concentration, additivity.

AGRADECIMIENTOS

La culminación de este trabajo de tesis fue posible gracias a todos aquellos que a lo largo de estos años me brindaron su confianza, apoyo, enseñanzas, cariño y amistad:

A CONICET y a la ANPCyT por la beca doctoral.

A mis directores, Dr. Marcelo Wolansky y Dra. Edda Villaamil por su apoyo, confianza, orientación y compromiso durante todos estos años, así como también a mi consejera de estudios, Dra. Adriana Cochón.

A mis compañeros de LATOMEQ: Gaby, Paula, Vicky y Lis por los lindos momentos compartidos, tanto en ámbitos académicos como personales. De manera muy especial agradezco a Ale, Carla y Delfi, por su ayuda en los experimentos *in vivo* y su amistad durante el tiempo que compartimos.

A todos los que hacen parte de la Cátedra de Toxicología y Química Legal de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA, por su colaboración en los ensayos analíticos, especialmente a Hildita, Gloria, María E, Adriana y Vale.

A todos mis profesores y miembros del Departamento de Química Biológica, que de una u otra forma contribuyeron en mi formación y en el cierre de esta etapa.

A la Dra.Verónica Rodriguez y a todo su grupo de investigación de plasticidad cerebral de la UNAM de México por permitirme realizar la estancia doctoral en su laboratorio.

A Ale A., por sacarme de aprietos con sus tips tecnológicos, a Julia F., Otto y Carlitos R., por invitarme a hacer parte de su grupo de trabajo.

A Claudia Valdéz, por llegar a mi vida en el momento en que el universo quiso hacerme un regalo mostrándome mi lado fuerte y real.

A Anita (mi enana), Kelly D., Kelly P., Diego, Luza, Rubys, Marie C., Mary G. y Pao por ser mi familia de corazón en Argentina, acompañándome incondicionalmente durante todos estos años y quienes a pesar del tiempo, los cambios y la vida siguen ahí. A Eduardo C., por su apoyo y compañía, mostrándome que todo puede ser más sencillo.

Finalmente y los más importantes, agradezco a mi familia, especialmente a mi Madre, a mis hermanos Paula, Erika y Ger, a mi Tío José y Ana M, por su cariño y compañía permanente, por estar, por quererme a pesar de la distancia y del tiempo. A mi cuñis William y a mis niños: Dianis, Rafa, Vicky, Ali, Luisi, Jacobo y mi Nico.

A las mujeres de mi vida…

Carmen, Paula y Erika

…y en la fiesta maravillosa en la que estés, seguro vas a sentirte muy orgulloso de tus hijos, para ti Papá.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

PUBLICACIONES

1. **Mosquera-Ortega, M.,** Romero, D.M., Pato, A.M., Sosa-Holt, C.S., Alvarez, G., Ridolfi, A., Villaamil Lepori, E., Wolansky, M.J., 2019. Relationship between the dose administered, target tissue dose and toxicity level after acute oral exposure to Bifenthrin and Tefluthrin in young adult rats. Toxicol. Sci. 172, 225–234. doi: 10.1093/toxsci/kfz204.

2. **Mosquera-Ortega, M.E.,** Romero, D.M., Pato, A.M., Sosa-Holt, C.S., Ridolfi, A., Villaamil Lepori, E., Wolansky, M.J., 2018. Relationship between exposure, body burden and target tissue concentration after oral administration of a low-dose mixture of pyrethroid insecticides in young adult rats. Toxicology 409, 53-62. doi: 10.1016/j.tox.2018.07.006.

3. **Mosquera Ortega, M.;** Pato, A.; Sosa-Holt, C.; Ridolfi, A.; Wolansky, M.; Villaamil Lepori, E. 2013. Relationship between administered dose, target tissue levels and thermoregulatory response alterations after acute oral exposure to the potent tremor-inducing pyrethroid bifenthrin in rats. The Toxicologist 132 (1): 1412. ISSN 1096-6080.

PARTICIPACIÓN Y PUBLICACIONES EN EVENTOS CIENTÍFICOS

1. Verrengia Guerrero, Noemí, Wolansky, Marcelo, Rovedatti, Gabriela, Fuchs, Julio, Cáceres Wenzel, Marcela, Kandel Gambarte, Paula, Ghiglione, Ornela, Martínez, María Laura, Gigena, Julián, Rueda, Lis, Longoni, Victoria, **Mosquera-Ortega, Mónica,** Varela, Agustina. Jornadas medioambientales. Impacto adverso de mezclas de plaguicidas. Detección temprana de trastornos permanentes y desarrollo de estrategias nanotecnológicas para prevenirlas. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad de Buenos Aires. Noviembre 21-22 de 2018. Argentina.

2. **Mosquera Ortega Mónica,** Romero Delfina, Ridolfi Adriana, Villaamil Lepori Edda, Wolansky Marcelo. Relación entre nivel de exposición, efecto en la temperatura corporal y concentración en tejidos blanco luego de una exposición oral aguda a dosis bajas de una mezcla de insecticidas piretroides en ratas adultas jóvenes. XX Congreso Argentino de Toxicología. Septiembre 20 a 22 de 2017. Acta Toxicológica Argentina (ATA). ISSN 0327-9286.

3. **Mosquera Ortega, M.;** Pato, A. Romero, D. Sosa Holt, C. Alvarez, G. Ridolfi, A. Villaamil Lepori, E. Wolansky, M. (2012). "Relationships between administered dose, body burden and thermoregulatory response after acute oral exposure to multiple pyrethroid insecticides in rats". 32nd Annual Meeting SRA (Society of Risk Analysis), Marzo 2012, San Francisco, California, USA.

4. **Mosquera Ortega Mónica E,** Romero Delfina M, Pato Alejandro M, Sosa Holt Carla S, Bujak Nicolás L, Villaamil Lepori E, Kotler, Mónica L, Wolansky Marcelo J. Estudio interdisciplinario del riesgo acumulativo de neurotoxicidad por exposición a mezclas de plaguicidas en humanos. XII Congreso Argentino de Toxicología. Septiembre 29 al 1 de octubre de 2011. Acta Toxicológica Argentina (ATA). 19(1): p41. ISSN 0327-9286.

5. **Mosquera Ortega Mónica**, Wolansky Marcelo, Álvarez Gloria, Villaamil Lepori Edda. Desarrollo de un protocolo rápido y sensible para la determinación de insecticidas neurotóxicos en tejidos blancos por GC-ECD. XII Congreso Argentino de Toxicología. Septiembre 29 al 1° de Octubre de 2011. Acta Toxicológica Argentina (ATA). 19(1): p42. ISSN 0327-9286.

6. Alejandro M. Pato, **Mónica E. Mosquera Ortega**, Carla S. Sosa-Holt, Marcelo J. Wolansky (2012). Los efectos termoregulatorios de los insecticidas piretroides son dependientes de tiempo, dosis y estructura química. II Congreso regional SRA-LA (Society for Risk Analysis – Latin America). Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia. Abril 9 al 12 de 2012. Memorias del II Congreso Regional SRA Latinoamérica. ISBN: 978_958_764_055_7.

7. Romero, D.M.; **Mosquera Ortega, M**.; Pato, A.M.; Wolansky, M.J. (2010). "Bases para el diseño de estudios de neurotoxicidad acumulativa por exposición a mezclas de insecticidas de relevancia ambiental". 1º Congreso regional SRA-LA (Society for Risk Analysis – Latin America). Facultad de Ingeniería, Universidad Diego Portales, Santiago de Chile. Agosto 17 al 20 de 2010.

PASANTÍAS

1. **Laboratorio de Plasticidad Cerebral - Instituto de Neurobiología - Universidad Nacional Autónoma de México**

Estancia doctoral de investigación. Proyecto: Procesamiento de muestras cerebrales en la determinación de neurotrasnmisores por cromatografía liquida de alta resolución (HPLC). Entrenamiento en técnicas de inmunotransferencia de proteínas e inmunohistoquímica cerebral. Juriquilla – México. 23 de Septiembre a 23 de Diciembre de 2013.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

α-CPM	Alfa-Cipermetrina
AChE	Acetilcolinesterasa
AChR	Acetilcolina receptor
Acetil CoA	Acetil coenzima A
ANOVA	Análisis de varianza
ARfD	Dosis de referencia aguda
ATP	Adenosintrifosfato
BMD	*Benchmark Dose* = Estimador de un valor de dosis que se considera un estándar (ver glosario).
BMD_{30}	Dosis BMD que causa una alteración del 30% en la magnitud de respuesta al comparar un grupo tratado con el grupo control.
BMR	*Benchmark Response* = Magnitud de la respuesta asociada a un determinado estándar de BMD de interés (ver glosario).
BIF	Bifentrina
CClDV	Canales de cloro dependientes de voltaje
CE	Cerebelo
CPM	Cipermetrina
CSDV	Canales de sodio dependiente de voltaje
DE_{30}	Dosis efectiva 30
DL50	Dosis letal 50
DTM	Deltametrina
ECD	Detector de Captura de Electrones
EI	Estándar interno
EQ_{IQ}	Equivalentes de la dosis del Índice Químico
EQ_{TEF}	Equivalentes de la dosis de teflutrina
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FPR	Factor de Potencia Relativa
FID	Detector de Ionización de Llama
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GABA-R	Receptor de ácido γ-aminobutírico
GC	Cromatografía gaseosa

h	Horas
HG	Hígado
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IQ	Índice químico
K_{oc}	Coeficiente de carbono orgánico
K_{ow}	Coeficiente de partición octanol-agua
LMR	Límite Máximo de Residuos
MpdA	Modo primario de acción
MPdT	Mecanismo primario de toxicidad
MPR	Método de Potencias Relativas
MS	Espectrómetro de masas
mseg	Milisegundos
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
OCls	Plaguicidas Organoclorados
OFs	Plaguicidas Organofosforados
PEM	Periodo de máximo efecto
PIR	Piretroide
PIRs	Plaguicidas Piretroides
PoD	*Point of Departure* (“Punto de Partida”)
RA	Respuesta atípica
r_s	Correlación de Spearman
S	Selectividad
SG	Sangre
$t_{½}$	Tiempo de vida media
t_r	Tiempo de retención
t_r rel	Tiempo de retención relativo
T_{amb}	Temperatura ambiente
Tc	Temperatura corporal
TEF	Teflutrina
t_o	Tiempo inicial
t_{max}	Tiempo máximo
Trec	Temperatura rectal
Tsc	Temperatura subcutánea

UV-Vis	Ultravioleta-Visible
ΔV	Diferencia de potencial

GLOSARIO

GLOSARIO

Benchmark Dose (BMD) = estimador de un valor de dosis (y su intervalo de confianza $IC_{95\%}$). Un valor de BMD cercano a lo que se denomina la "dosis umbral" (o sea, dosis por sobre la cual se asume que la sustancia causa una perturbación al punto final examinado) se estima modelando los datos dosis-respuesta (o tiempo-dosis-respuesta) obtenidos en los estudios en animales de laboratorio. Existe consenso avanzado proponiendo que se puede estimar un **BMD** que sirva como **estándar conservador apropiado para la estimación del PoD**. El fin último del sistema de modelado BMD en el contexto de los procesos de evaluación de riesgo (Toxicología Regulatoria) es informar cuál es la dosis máxima segura de residuos tóxicos en alimentos y agua de consumo humano (Haber y col., 2018).

Benchmark Response (BMR) = estándar de **magnitud de respuesta** que se selecciona de acuerdo al objetivo particular del estudio en el contexto de estimar un valor dado de BMD. Como en general BMD sirve para identificar un PoD confiable a partir del cual se extrapola la dosis máxima segura en humanos, en general el BMR seleccionado representa un valor pequeño de respuesta (1-15% de cambio respecto a la respuesta del grupo control correspondiente; BMR = 0,01-0,15).

Dosis equitóxica: Dosis de una sustancia química que causa la misma magnitud de cambio en una medida de efecto respecto a la respuesta observada en el grupo control.

Índice químico (IQ): Sustancia química seleccionada para representar la relación dosis-respuesta de referencia para el efecto tóxico de interés que causan los agentes tóxicos de una misma clase química-toxicológica.

La selección de un IQ es útil cuando se busca estimar el efecto conjunto de una mezcla de sustancias que tienen el mismo tejido blanco primario y un mecanismo de toxicidad similar, y que se asume que **sólo difieren en su potencia relativa**. De esta manera, el efecto de una dosis determinada de cualquiera de los compuestos que pertenecen a una misma clase química y toxicológica puede expresarse en función de la relación dosis-respuesta del compuesto seleccionado como IQ. Entonces el efecto conjunto de una combinación de esos compuestos se puede asumir que se corresponderá con la suma de "las dosis equivalentes del IQ (EQ_{IQ})" combinadas en la mezcla

(Kienzler et al., 2016; WHO, 2017). El EQ_{IQ} de cada compuesto se calcula multiplicando la dosis de referencia (mg/kg) por el Factor de Potencia Relativa (FPR). El FPR es mayor o menor a 1 según cuanto más o menos potente que el IQ sea el compuesto.

Point of Departure (PoD). En general, en el contexto de la Toxicología Regulatoria y los estudios dosis-efecto, PoD es el estimador de la dosis máxima segura (o un valor cercano a esta) obtenida a partir de los ensayos con animales. A partir de PoD se extrapola la dosis máxima segura en humanos (Haber y col., 2018).

Potencia relativa: Se emplea para clasificar sustancias químicas de una misma clase respecto a un punto final de respuesta dado. Permite transformar la dosis de una sustancia química en una dosis equivalente de otra sustancia (Dinse y Umbach., 2013).

Nota: En general, en el contexto de los modelos de acción combinada de sustancias tóxicas, estos parámetros se usan para ponderar la toxicidad relativa de compuestos cuyas relaciones dosis-efecto presentan pendientes y efectos máximos similares (o sea, cuando la principal diferencia entre los compuestos es la dosis mínima efectiva para ese punto final).

ÍNDICE

ÍNDICE

		Pág.
RESUMEN		1
ABSTRACT		3
AGRADECIMIENTOS		5
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA		8
PUBLICACIONES		9
PARTICIPACIÓN Y PUBLICACIONES EN EVENTOS CIENTÍFICOS		9
PASANTÍAS.		11
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS		12
GLOSARIO		16
ÍNDICE		19
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS		25
INTRODUCCIÓN		30
1.	Antecedentes	31
1.1.	Historia y clasificación de insecticidas	31
1.2.	Características de los PIRs	36
1.2.1.	Propiedades físico-químicas	37
1.2.2.	Relación estructura *vs a*ctividad	38
1.2.3.	Mecanismo de acción	40
1.2.4.	Absorción, distribución y eliminación de PIRs	42
1.3.	Evidencia de efectos tóxicos por exposición a PIRs a bajas dosis en animales de laboratorio	43
1.3.1.	Estudios neuroconductuales	43
1.3.2.	Efecto sobre la temperatura corporal por exposición a PIRs	44
1.4.	Métodos analíticos empleados en la determinación y cuantificación de PIRs en matrices biológicas.	45
1.5.	Evaluación del riesgo por exposición a mezclas de PIRs	46
1.6.	Relevancia de las relaciones entre dosis administrada, concentración en tejido y efecto	49
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS		51
2.	Hipótesis	52
3.	Objetivos	53

3.1	Objetivo general	53
3.2	Objetivos específicos	53
MATERIALES Y MÉTODOS		54
4.	Materiales	55
4.1	Reactivos	55
4.2	Modelo experimental seleccionado para los estudios *"in vivo"*	56
4.3	Preparación de muestras- extracción de PIRs de los tejidos	57
4.4	Análisis cromatográfico	57
5.	Métodos	59
5.1	Selección de PIRs para los ensayos experimentales	59
5.2	Estudios dosis-respuesta utilizando temperatura subcutánea (Tsc) como medida de efecto	59
5.2.1	Implante de microchip (transponder BMDS IPTT-300) y registro de Tsc por telemetría	60
5.2.2	Diseño de los estudios dosis-respuesta para los estudios de administración simple	62
5.2.3	Selección de dosis individuales para el estudio de la mezcla cuaternaria	66
5.2.4	Medición de Tsc- Observaciones clínicas - Registro de signos de intoxicación	69
5.3	Sacrificio de los animales, disección y almacenamiento de tejidos	70
5.4	Determinación de concentraciones de PIRs en los tejidos	70
5.4.1	Extracción de PIRs	71
5.4.2	Limpieza de extracto (Clean-up) por extracción en fase sólida (SPE)	72
5.5	Condiciones cromatográficas	72
5.6	Validación del método analítico	73
5.6.1	Selectividad	73
5.6.2	Linealidad e intervalo de trabajo	73
5.6.3	Recuperación	74
5.6.4	Límites de detección (LDD) y límites de cuantificación (LDC)	74
5.6.5	Precisión	75
5.6.5.1	Repetibilidad – precisión intra-ensayo	75
5.6.5.2	Precisión intermedia – precisión inter-ensayo	76
5.6.6	Estabilidad	76

5.7	Determinación de la concentración de PIRs en tejidos	76
5.8	Análisis estadístico	77
5.9	Comparación entre los resultados de los estudios de administración simple vs mezcla. Prueba de la hipótesis de aditividad de dosis	77
5.9.1	Cálculo de las potencias relativas y equivalentes de TEF en función de la BMD_{30}	78
RESULTADOS		80
6.	Validación del método analítico - Identificación y cuantificación de insecticidas PIRs en tejidos	81
6.1.	Parámetros de la validación	81
6.1.1	Selectividad/especificidad	81
6.1.2	Linealidad	85
6.1.3	Recuperación	86
6.1.4	Límite de detección (LDD) y límite de cuantificación (LDC)	86
6.1.5	Precisión	87
6.1.6	Estabilidad	88
7.	Relación entre dosis administrada, dosis interna, dosis en tejidos y efecto para cada PIR evaluado separadamente	89
7.1.	Piretroides sin grupo ciano (perfil toxicológico similar a Tipo I)	89
7.1.1.	Relación entre dosis la oral y las perturbaciones en la Tsc	89
7.1.1.1.	Bifentrina	89
7.1.1.2.	Teflutrina	91
7.1.1.3.	Observaciones clínicas por administración de Bifentrina y Teflutrina	94
7.1.2.	Concentración en tejidos	95
7.1.2.1.	Bifentrina	95
7.1.2.2.	Teflutrina	101
7.1.3.	Relación entre dosis administrada, concentración en tejido y efecto sobre la Tsc	107
7.1.3.1.	Bifentrina	107
7.1.3.2.	Teflutrina	108
7.2.	Piretroides con grupo ciano (perfil toxicológico similar a Tipo II)	109
7.2.1.	Relación entre la dosis oral y las perturbaciones en la Tsc	109
7.2.1.1.	α-Cipermetrina	110
7.2.1.2.	Deltametrina	112

7.2.1.3.	Observaciones clínicas por administración de α-Cipermetrina y Deltametrina	114
7.2.2.	Concentración en tejidos	115
7.2.2.1.	α-Cipermetrina	115
7.2.2.2.	Deltametrina	120
7.2.3.	Relación entre dosis administrada, concentración en los tres tejidos y efecto sobre la Tsc	125
7.2.3.1.	α-Cipermetrina	125
7.2.3.2.	Deltametrina	126
8.	Relación entre dosis administrada, dosis interna, dosis en tejido y efecto sobre la Tsc de la mezcla cuaternaria de los PIRs	128
8.1.	Estimación de la dosis BMD_{30} de cada PIR - Composición de la mezcla cuaternaria	128
8.2.	Estudios dosis-efecto de la mezcla cuaternaria de PIRs	129
8.2.1.	Relación entre dosis oral y perturbación de la Tsc	129
8.2.2.	Observaciones clínicas	131
8.3.	Concentración en tejidos	132
8.4.	Comparación entre los resultados de los estudios de administración simple *vs* mezcla	137
8.4.1.	Ajuste del efecto sobre la Tsc a partir del cálculo de las potencias relativas y equivalentes de TEF en función de la BMD_{30}	137
8.4.2.	Concentración y porporción de los PIRs en los tejidos. Comparación entre los resultados de los estudios de administración simple *vs* mezcla	139
DISCUSIÓN		144
9.	Discusión	145
9.1.	Importancia de los estudios de mezclas de PIRs	145
9.2.	Piretroides seleccionados	147
9.3.	Medida de efecto	149
9.3.1.	Medición de la Tsc	150
9.4.	Estudios de administración simple de PIRs	151
9.5.	Utilización de los resultados de los estudios de la administración simple para construir la mezcla de PIRs evaluada	154
9.6.	Efecto sobre la Tsc – Administración simple de *PIRs* vs mezcla	154
9.7.	Evaluación de la hipótesis según el modelo de dosis aditivas	155

9.8.	Relación entre dosis administrada y concentración en tejidos	157
9.9.	Extracción de PIRs en tejidos biológicos y selección del método analítico	159
9.10.	Concentración de PIRs en los tejidos - Estudios de administración simple	162
9.10.1.	Piretroides sin grupo ciano	162
9.10.2.	Ciano-PIRs	165
9.11.	Concentración de PIRs en los tejidos - Estudio de la mezcla cuaternaria	168
9.12.	Evaluación de la hipótesis – Comparación entre la proporción de los PIRs en los tejidos y la proporción de cada uno en la mezcla administrada	171
9.13.	Análisis de los resultados en el contexto de la hipótesis: ¿se observaron diferencias en la proporción de los PIRs en los tejidos al comparar la administración simple y la combinada?	172
9.14.	Relación entre dosis administrada, concentración en tejido y efecto sobre Tsc. Comparación entre los estudios de administración simple y coadministración simultánea de PIRs	173
CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS		178
10.	Conclusiones y Perspectivas	179
10.1.	Conclusiones finales	179
10.2.	Perspectivas futuras	181
BIBLIOGRAFÍA		183

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Estructura química de Piretrinas I y II.	32
Figura 2.	Cronología del descubrimiento e introducción comercial de insecticidas en el mercado.	34
Figura 3.	Estructuras de Piretrina I y Cipermetrina.	36
Figura 4.	Relación de estructura y actividad insecticida de los PIRs sintéticos determinada por la estereoquímica.	39
Figura 5.	Clasificación de los insecticidas PIRs utilizados en este trabajo de tesis.	40
Figura 6.	Mecanismo de acción de los insecticidas PIRs.	42
Figura 7.	Respuesta termorregulatoria ante la presencia de una sustancia tóxica.	45
Figura 8.	Aplicación del modelo de dosis aditiva en el estudio de exposición oral aguda a la mezcla de 11 PIRs en rata adulta.	48
Figura 9.	Implante de chips en animales para estudiar Tsc por radiotelemetría.	61
Figura 10.	Etapas del diseño experimental en los estudios de exposición simple y evaluación de la mezcla.	64
Figura 11.	Técnica de intubación gavage.	66
Figura 12.	Modelado de datos para calcular la dosis BMD de interés.	67
Figura 13.	Composición de la mezcla cuaternaria.	69
Figura 14.	Cromatogramas de los PIRs presentes en las matrices biológicas estudiadas.	82
Figura 15.	Curva de calibración para los PIRs examinados.	85
Figura 16.	Relación dosis-respuesta de Bifentrina.	90
Figura 17.	Relación dosis-respuesta de la ΔTsc durante el tiempo de máximo efecto luego de la administración de Bifentrina.	91
Figura 18.	Relación dosis-respuesta de Teflutrina.	92
Figura 19.	Relación dosis-respuesta de la ΔTsc durante el tiempo de máximo efecto luego de la administración de Teflutrina.	93
Figura 20.	Cromatogramas obtenidos para la cuantificación de BIF en sangre e hígado luego de su administración por vía oral	96
Figura 21.	Relación entre la concentración en tejidos y la dosis administrada de Bifentrina.	98
Figura 22.	Concentración de Bifentrina en los tres tejidos *vs* la dosis administrada.	99

Figura 23. Relación entre la concentración de Bifentrina en hígado y cerebelo con los niveles en sangre. 100

Figura 24. Concentración relativa de Bifentrina en cerebelo respecto a la concentración en sangre en función de la dosis administrada. 101

Figura 25. Cromatogramas obtenidos para la cuantificación de TEF en cerebelo luego de la administración por vía oral. 102

Figura 26. Relación entre la concentración en tejidos y la dosis administrada de Teflutrina. 104

Figura 27. Concentración de Teflutrina en los tres tejidos *vs* la dosis administrada. 105

Figura 28. Relación entre la concentración de Teflutrina en hígado y cerebelo con los niveles en sangre. 106

Figura 29. Concentración relativa de Teflutrina en CE respecto a la concentración en SG en función de la dosis administrada. 107

Figura 30. Relación entre la dosis administrada de Bifentrina, la concentración en los tres tejidos y el efecto sobre la Tsc. 108

Figura 31. Relación entre la dosis administrada de Teflutrina, la concentración en los tres tejidos y el efecto sobre la Tsc. 109

Figura 32. Relación dosis-respuesta de α-Cipermetrina. Monitoreo de Tsc luego de la administración de α-CPM. 111

Figura 33. Relación dosis-respuesta de la ΔTsc durante el tiempo de máximo efecto luego de la administración de α-Cipermetrina. 112

Figura 34. Relación dosis-respuesta de Deltametrina. 113

Figura 35. Relación dosis-respuesta de la ΔTsc durante el tiempo de máximo efecto luego de la administración de Deltametrina. 114

Figura 36. Cromatogramas de los extractos de los tres tejidos de los animales tratados con α-Cipermetrina. 116

Figura 37. Relación entre la concentración en tejidos y la dosis administrada de α- Cipermetrina. 117

Figura 38. Concentración de α-Cipermetrina en los tres tejidos. 118

Figura 39. Relación entre la concentración de α-Cipermetrina en hígado y cerebelo con los niveles en sangre. 119

Figura 40. Concentración relativa de α-Cipermetrina en cerebelo respecto a la concentración sangre en función de la dosis administrada. 120

Figura 41. Cromatogramas de los tres tejidos SG, HG y CE luego de la administración de Deltametrina. 121

Figura 42. Relación entre la concentración en tejidos y la dosis administrada de Deltametrina. 122

Figura 43. Concentración de Deltametrina en los tres tejidos. 123

Figura 44. Relación entre la concentración de Deltametrina en hígado y 124

cerebelo con los niveles en sangre.

Figura 45. Concentración relativa de Deltametrina en cerebelo respecto a la concentración en sangre en función de la dosis administrada. 125

Figura 46. Relación entre la dosis administrada de α-Cipermetrina, la concentración en los tres tejidos y el efecto sobre la Tsc. 126

Figura 47. Relación entre la dosis administrada de Deltametrina, la concentración en los tres tejidos y el efecto sobre la Tsc. 127

Figura 48. Estimación de la BMD_{30} para el efecto de TEF sobre la Tsc. 129

Figura 49. Relación tiempo-dosis-respuesta para la mezcla cuaternaria de PIRs. 131

Figura 50. Figura 50. Comatogramas de los extractos de cerebelo luego del tratamiento con diferentes dosis de **la mezcla** de PIRs. Los paneles A, B y C muestran los cromatogramas correspondientes a los extractos de cerebelo de animales administrados las dosis D1, D2 y D3, respectivamente. 133

Figura 51 Relación entre las concentraciones de los PIRs en los tres tejidos y las dosis administradas de la mezcla. 134

Figura 52. Distribución de PIRs en los tejidos (sangre, hígado y cerebelo) en función de la dosis administrada de la mezcla cuaternaria. 136

Figura 53. Comparación de los valores de ΔTsc experimentales obtenidos en el estudio de la mezcla y cada ΔTsc teórico-predictivo correspondiente a los equivalentes de EQ_{TEF} en t = 2 h. 139

Figura 54. Comparación entre las proporciones de los PIRs en la solución administrada y su distribución en los tejidos luego de administrar la mezcla. 140

Figura 55. Análisis comparativo entre las concentraciones de los PIRs en cerebelo luego de la administración simple (uno a la vez) y la administración simultánea (mezcla). 142

Figura 56. Concentración porcentual de los PIRs en los tejidos en los estudios de administración simple vs combinada. 143

Figura 57. Diversidad estructural y toxicológica entre PIRs. 149

Figura 58. Comparación de los cambios en temperatura rectal y subcutánea en experimentos de administración oral aguda a cipermetrina y α-CPM. 153

Figura 59. Comparación de los resultados de concentración de DTM en sangre con estudios previos. 166

Figura 60. Antecedentes de estudios de administración de mezclas de PIRs. 169

Figura 61. Correspondencia entre sistema nervioso central y la solución de mezcla administrada al comparar las proporciones de cada PIR. 175

ÍNDICE DE TABLAS

		Pag.
Tabla 1.	Historia del descubrimiento e introducción de plaguicidas naturales y sintéticos	35
Tabla 2.	Propiedades físicas de los insecticidas PIRs examinados en esta tesis	38
Tabla 3.	Valores calculados de DE_{30} y potencias relativas de 11 PIRs evaluando actividad motora como medida de efecto neurotóxico	49
Tabla 4.	Clasificación estructural y toxicológica de los insecticidas utilizados	56
Tabla 5.	Organización de los ensayos de administración de dosis oral aguda de PIRs individuales a ratas Wistar adultos macho	65
Tabla 6.	Composición de la solución stock de la mezcla cuaternaria	68
Tabla 7.	Condiciones cromatográficas empleadas en el estudio de PIRs	72
Tabla 8.	Orden de elución y tiempos de retención absoluto y relativo de los PIRs y EI	85
Tabla 9.	Recuperación	86
Tabla 10.	LDD y LDC	87
Tabla 11.	Precisión intra-ensayo e inter-ensayo	87
Tabla 12.	Concentraciones de las dosis en el experimento de mezcla (D1, D2 y D3) y sus correspondientes equivalentes de TEF (EQ_{TEF}) calculados a partir de la BMD_{30}	138
Tabla 13.	Estudios de extracción y determinación de PIRs a partir de tejidos animales disponibles en la literatura abierta	160
Tabla 14.	Distribución de los PIRs entre los tejidos examinados según lo observado en los estudios de administración simple	168

INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES

1.1. Historia y clasificación de insecticidas

Un plaguicida, según la definición de la FAO, es cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas las especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales, o que pueda administrarse a los animales para combatir ectoparásitos. En el ámbito de la Salud Pública y la protección ambiental, la importancia de controlar y/o eliminar las plagas radica en que un número considerable de éstas pueden actuar como vectores o huéspedes intermediarios de varias enfermedades, causando situaciones indeseadas y de riesgo para el hombre y para el ecosistema en general (USEPA, 2008).

Existen plaguicidas de origen biológico, físico y químico. La clasificación de plaguicidas más utilizada los agrupa de acuerdo a la clase de plaga que combaten: insecticidas, empleados para el control de insectos; herbicidas, para el control de crecimiento de plantas o malezas; fungicidas, para hongos y mohos; rodenticidas, para roedores (ratas, ratones, topos y otros roedores silvestres); alguicidas para el control de algas en lagos artificiales y piscinas; y acaricidas y larvicidas, entre otros (Krieger y col., 2010). Las diversas familias químicas a las que pertenecen los plaguicidas les atribuyen propiedades fisicoquímicas específicas y modos primarios de acción (MPdA) sobre especies blanco.

Históricamente el control de plagas está asociado con actividades de producción agrícola y de salubridad. El uso de plaguicidas se remonta a muchos siglos atrás, cuando se utilizaban productos naturales tales como los derivados de azufre, los que fueron aplicados en cultivos en China ya en el año 1000 a.c; debido a la efectividad estos plaguicidas azufrados se usaron como fungicidas en Europa hasta ~1800. Dentro del grupo de los plaguicidas naturales, se encuentran también las sales de arsénico y cobre, alcaloides naturales como Nicotina, Estricnina y compuestos como las piretrinas. A este último grupo se le conoce como *insecticidas de primera generación* (Ecobichon, 2001).

Las piretrinas se encuentran en relativamente alta concentración en las flores de la familia del *Chrysanthemum cinerariaefolium* (McLaughlin, 1973). El extracto que se obtiene de la flor incluye una mezcla de 6 compuestos naturales: las Piretrinas I y II,

Cinerinas I y II, y Jasmolinas I y II (Fig. 1). Estos compuestos son ésteres derivados del ácido crisantémico y pirétrico, unidos con el alcohol de la piretrolona, jasmolina o cinerolona. Sus moléculas se diferenciadan estructuralmente en la cadena terminal de los sustituyentes del acido ciclopropanocarboxílico y ciclopentenolona.

Chrysanthemum cinerariaefolium

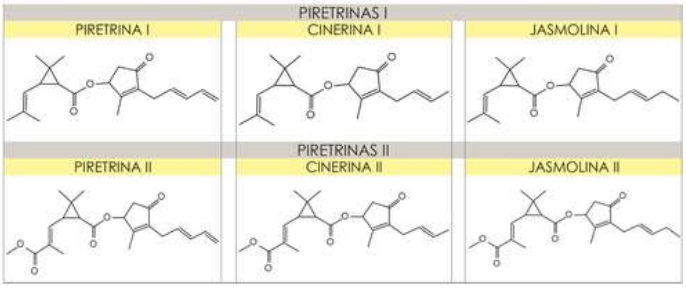


Figura 1. Estructura química de Piretrinas I y II.

Las piretrinas se encuentran en los conductos excretores de los aquenios. Las flores secas de las especies de crisantemos más utilizadas para obtener los extractos (el "piretro") contienen hasta el 2% del insecticida natural. Su extracción con hexano y purificación con metanol genera un líquido viscoso concentrado que contiene cerca del 30% de piretrinas. Si bien no se sabe con certeza el lugar donde fueron descubiertas las propiedades insecticidas de estos compuestos, se sabe que fueron usadas por tribus caucásicas y persas ya en el siglo XVIII para el control de piojos. En 1828 se inició su comercialización en Armenia, y en 1840 su producción en Dalmatia (McLaughlin, 1973). Su uso se fue extendiendo debido a que permitía controlar aceptablemente un grupo importante de plagas, incluyendo mosquitos, larvas, escarabajos, pulgones, orugas y saltamontes (Todd y col., 2003). En la actualidad las piretrinas continúan comercializándose para uso doméstico (por ejemplo, son el ingrediente activo principal en muchas formulaciones comercializadas como espirales hogareños para repeler moscas y mosquitos).

Estudios toxicológicos clasifican a las piretrinas naturales como insecticidas específicos para varias especies de plagas, con aceptable "seguridad" para los mamíferos, y de baja persistencia en el ambiente. Mediante reacciones fotoquímicas y/o metabólicas se generan productos de la hidrólisis de la unión éster (Casida, 1980; Elliott y col., 1973). En general, su eficacia como plaguicidas se sostiene entre unas pocas

semanas y pocos meses luego de la aplicación en espacios abiertos; en espacios cerrados (sin luz natural y radiaciones UV) puede prolongar hasta máximo 6-8 meses.

La *segunda generación de insecticidas* se denomina a las nuevas formulaciones sintéticas desarrolladas a partir de 1930. Estos productos permitieron ampliar el espectro de plagas combatidas y disminuir los costos de producción agrícola. Como ejemplos representativos de esta segunda generación, están el DDT y el 2,4-D que pertenecen a los compuestos de la familia de los Organoclorados (OCls), el Clorpirifos del grupo de los Organofosforados (OFs), el Carbofuran de los Carbamatos, y la Deltametrina de los insecticidas Piretroides (PIRs).

El DDT fue uno de los primeros compuestos sintéticos de amplio espectro, y uno de los plaguicidas más comercializados y aplicados a partir de la segunda guerra mundial (Kirby, 1980). En los años 50's y gran parte de los 60's, además de su éxito mundial para controlar plagas agrícolas y urbanas (en oficinas, instituciones educativas, parques, hogares, comercios de alimentos, etc.), el DDT se empleó masivamente para combatir insectos transmisores de enfermedades que afectaron la salud pública, tales como el tifus, la malaria, la leishmaniasis y el dengue. Su aplicación se prolongó hasta los años 70's, pero las evidencias de su persistencia en el ambiente, su impacto ecotoxicológico, las manifestaciones tóxicas crónicas que se observaban en los mamíferos (incluido el hombre), y la aparición de especies de plagas más resistentes hizo que fueran primero restringidos y luego prohibidos en Estados Unidos (USEPA, 1975) y en otros países incluido Argentina. La prohibición del DDT y otros plaguicidas OCls impulsó el estudio y la síntesis de nuevos compuestos de otras clases de plaguicidas que habían tenido un crecimiento limitado en el mercado mundial hasta principios de los años 70's: los OFs, CBs y los PIRs.

Los primeros PIRs (años 50's - 60's) fueron desarrollados como derivados sintéticos estructurales de las piretrinas, cuyas propiedades insecticidas generaron interés por parte de los químicos orgánicos. Luego se continuó la investigación con el objetivo de sintetizar nuevos derivados que proporcionen mayor efectividad, selectividad y estabilidad ambiental.

La Fig. 2 muestra la síntesis e introducción cronológica de insecticidas en el mercado a lo largo del siglo pasado (Casida y Quistad, 1998).

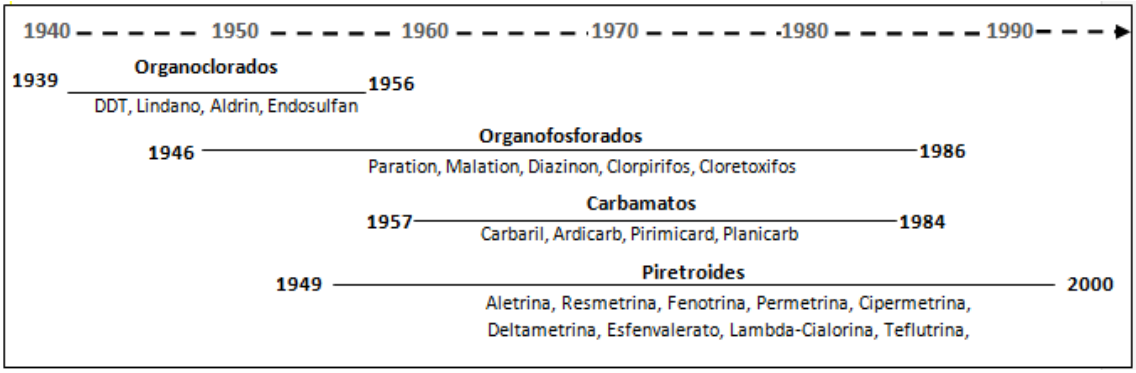


Figura 2. Cronología del descubrimiento e introducción comercial de insecticidas en el mercado

Aun bajo las condiciones controladas (autorizadas) de uso, un número considerable de insecticidas y herbicidas de segunda generación fueron restringidos o prohibidos en las últimas ~4 décadas debido a las dificultades que se observaron para usarlos en forma segura a nivel domiciliario, peri-domiciliario y agrícola. Si bien los plaguicidas deben presentar efectos específicos y su acción debe ser selectiva para las especies "blanco" que se pretende controlar, el uso indiscriminado y poco fiscalizado de estas sustancias puede generar daños colaterales en otros organismos presentes en el ecosistema. Los problemas debido al impacto colateral de los plaguicidas de primera y segunda generación en la Salud Humana y Ambiental impulsó el nacimiento de la *tercera generación de plaguicidas*: hormonas, antihormonas, y agentes inhibidores del crecimiento de insectos tales como los disruptores de la síntesis de quitina (lo cual perturba la integridad estructural del exoesqueleto/cutícula). Comparados a las generaciones anteriores, los esfuerzos de investigación y desarrollo de esta variedad más moderna de plaguicidas buscaron priorizar la selectividad (S) de la acción tóxica sobre las plagas (Casida, 1980). Por selectividad se entiende la relación entre la cantidad de plaguicida por gramo de peso corporal que causa la mortalidad del 50% de un grupo de ratas tratadas por vía oral (DL_{50rata}) y el valor DL_{50} estimado en insectos tratados tópicamente [$S= DL_{50rata}/DL_{50plaga}$] (Casida, 1980; Radcliffe y col. 2008). Cuanto mayor es S, se asume que habrá más distancia entre la dosis que puede causar intoxicación en mamíferos y la dosis requerida para una acción eficaz en el control de la plaga, por lo cual se anticipa que el impacto colateral adverso en población humana es mucho menos probable. Entre los insecticidas sintéticos modernos más selectivos se encuentran los PIRs y los neonicotinoides. Estos últimos son una clase plaguicida con crecimiento

comercial y aceptabilidad en las últimas décadas, que aprovecha las propiedades biocidas naturales de la nicotina y sus derivados (nicotinoides), pero los neonicotinoides tienen un factor de selectividad por especie blanco (S) mucho más alto. La Tabla 1 contiene una breve reseña de la evolución de los plaguicidas y sus aplicaciones comunes a través del tiempo (Casida y Quistad, 1998).

Tabla 1. Historia del descubrimiento e introducción de plaguicidas naturales y sintéticos.

TIPO	AÑO	PLAGUICIDA	CARACTERÍSTICAS
		Plaguicidas Naturales	
Primera generación	1000 a.c.	Derivados de azufre Ácido Bórico	Insecticida y fungicida
	1600	Sales de arsénico Sales de cobre	Control de langostas Hongos en cebada
Naturales	1600-1700	Nicotina Estricnina	Control de poblaciones de vertebrados pequeños (pájaros y roedores)
	1800-1900	Piretrinas	Insecticidas
		Plaguicidas sintéticos	
Segunda generación	1930	Organoclorados (DDT)	
	1945	Organofosforados Carbamatos Ureas	Insecticidas Fungicidas Herbicidas
	1950-1960	Piretroides Sulfonilureas	Fertilizantes
Tercera generación	1980	Neonicotinoides Hormonas y antihormonas Inhibidores de crecimiento	Insecticidas y otros usos

Las primeras dos generaciones de plaguicidas actúan sobre funciones y mecanismos fisiológicos importantes, comprometiendo así la subsistencia tanto de las especies-plagas como de otras especies que fueran susceptibles a estos compuestos. Por ello, el estudio de los sitios blancos de acción de las diferentes clases de plaguicidas fue y continúa siendo un tema de importancia toxicológica, que busca generar conocimiento para optimizar la seguridad durante el manipuleo y las aplicaciones, y evitar los efectos adversos potenciales en la salud del ser humano y otros seres vivos expuestos.

A nivel molecular, los sitios "blancos" primarios de acción de los plaguicidas de segunda y tercera generación son diversos. Los más caracterizados son la enzima acetilcolinesterasa (AChE), los canales de sodio dependiente de voltaje (CSDV), y varios sistemas de receptores de la membrana plasmática sináptica neuronal (GABA-R, AChR y ácido γ-aminobutírico entre otros). Todos estos sitios están localizados en el sistema nervioso, y la perturbación de la función de los mismos con estos plaguicidas causa neurotoxicidad. Otros sitios de acción son los siguientes: pasos fundamentales de la biosíntesis de quitina, el receptor del neurotransmisor glutamato, varias enzimas (por ejemplo, acetil-CoA carboxilasa, ATP sintetasa, NADH y succinato deshidrogenasas) (Klaassen, 2008).

La clase de insecticidas estudiados en este trabajo de Tesis Doctoral pertenecen al grupo de los PIRs. A continuación, se describen las propiedades físicoquímicas, el comportamiento ambiental y el MPdA de los PIRs.

1.2. Características de los PIRs

La obtención de PIRs se basó en la modificación estructural de los residuos ácido y alcohólico de las piretrinas. Las modificaciones más caracterizadas y exitosas incluyeron alteraciones en la longitud de la cadena pentadienil del residuo alcohólico usando sustituyentes alquilo o arilo, y también el reemplazo del anillo ciclopentenolona por residuos heterocíclicos (Fig. 3).

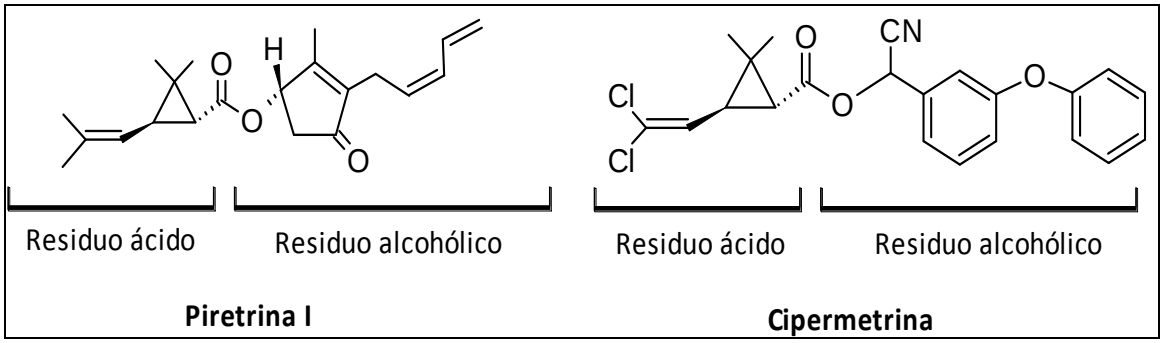


Figura 3. Estructuras de Piretrina I y Cipermetrina.

De este modo, muchos de los PIRs modernos son ésteres de ciclopropanocarboxilatos que se caracterizan por poseer mayor resistencia a la fotooxidación, mayor estabilidad en el medio ambiente y un perfil de biodegradabilidad

aceptable comparados con sus análogos naturales. Estas son propiedades deseables para asegurar una eficacia sostenida contra las plagas, evitando problemas de acumulación en agua o suelos. La presencia de sustituyentes halogenados y del grupo ciano en su estructura, aumenta la potencia insecticida y expande el espectro de plagas que se pueden controlar, como en el caso de λ-Cialotrina, Deltametrina (DTM), Cipermetrina y otros PIRs importantes sin grupo ciano como Teflutrina (TEF), Bifentrina (BIF) y Permetrina. Estas modificaciones en las moléculas hace que la actividad residual se prolongue por varias semanas (Casida y col., 1983). Sin embargo, esta mayor efectividad en las plagas a veces puede también asociarse a una mayor probabilidad de acciones colaterales adversas en las especies que no se desea perturbar (Gray, 1985; Soderlund y col., 2002).

Durante la década de los 70's se presentó el mayor desarrollo de compuestos PIRs con optimización de la estabilidad de la molécula y la potencia en las plagas, y se inició así una etapa de competitividad creciente frente a otras clases de insecticidas, expandiéndose rápidamente en el mercado y reemplazando a los OCls (que estaban siendo prohibidos) y a muchos OFs. En la actualidad, los PIRs, además de mantener una cuota considerable del mercado mundial de insecticidas agrícolas (~23 - 30%), son los ingredientes activos de más de 3500 formulaciones comerciales registradas en USA (USEPA, 2017). En Argentina ~30% de los insecticidas empleados para el control de plagas en cultivos como soja y algunos frutales corresponden a PIRs (INTA, 2016). En las últimas décadas los PIRs fueron generalmente seleccionados como primera opción a nivel hogareño y peri-domiciliario para el control de insectos vectores de enfermedades, tales como los insectos hematófagos (*Triatoma infestans, Panstrongylus megistus;* vectores del parásito *Trypanosoma cruzi*), causantes de la enfermedad de Chagas (Kirchhoff, 1998).

1.2.1. Propiedades físico-químicas

En general, los PIRs se obtienen como líquidos altamente viscosos o sólidos cristalinos. Tienen elevados puntos de ebullición: 138 a 200 °C. El peso molecular de la mayoría de los PIRs se encuentra entre 390 y 600 g/mol. Además, son compuestos químicos muy apolares (liposolubles) de baja volatilidad y con elevado coeficiente de partición octanol:agua (ATSDR, 2003; Tomlin, 2000). En general, los PIRs presentan elevada afinidad a sólidos y partículas de sedimento, presentando altos valores de

coeficiente de absorción de carbono orgánico (Laskowski, 2002). En la Tabla 2 se resumen las propiedades fisicoquímicas de los insecticidas PIRs inicialmente seleccionados para este trabajo.

Tabla 2. Propiedades físicas de los insecticidas PIRs examinados en esta tesis.

PIRs	PESO MOLECULAR	SOLUBILIDAD EN AGUA µg/L (20 °C)	PRESIÓN DE VAPOR mm de Hg	*Log* K_{ow}	*Log* K_{oc}	*K*h (atm x m^3/mol)
Bifentrina[a]	422,9	<1	$1,8 \times 10^{-7}$	6,0	5,4	$7,2 \times 10^{-3}$
Cipermetrina[a]	416,3	4	$3,1 \times 10^{-9}$	6,6	5,2	$3,4 \times 10^{-7}$
Deltametrina[a]	505,2	2	$9,3 \times 10^{-11}$	6,2	5,8	$3,1 \times 10^{-7}$
λ-Cialotrina[a]	449,9	5	$1,6 \times 10^{-9}$	6,8	5,5	$1,9 \times 10^{-7}$
Permetrina[a]	391,3	6	$1,9 \times 10^{-8}$	6,5	5,1	$4,9 \times 10^{-8}$
Teflutrina[b]	418,7	2	$6,0 \times 10^{-5}$	6,4	4,3	$1,6 \times 10^{-3}$

***K*$_{ow}$** = coeficiente de partición Octanol:Agua. ***K*oc** = Coeficiente de absorción de carbono orgánico. ***K*h** = Constante de Henry a. (Laskowski, 2002)[a], (Tomlin, 2000)[b].

1.2.2. Relación estructura *vs* actividad

La actividad insecticida de una sustancia está definida por sus propiedades físicas, estructura química y conformación espacial (Soderlund y col., 2002). A nivel estructural, los PIRs sintéticos contienen 1-3 carbonos quirales, que pueden presentarse tanto en el residuo ácido como en el residuo del alcohol. Por lo tanto se obtienen 2, 4 u 8 esteroisómeros posibles, los cuales corresponden a los diasterómeros *cis* y *trans* (ver la quiralidad ejemplificada para Deltametrina en la Fig. 4). Sin embargo, de todas las estructuras sintéticas posibles evaluadas en las últimas 5 décadas, tratando de optimizar las propiedades de los PIRs, en la actualidad solo se comercializan algunas decenas que poseen un perfil agronómico mas competitivo. Los estudios estructura-actividad muestran que en muchos casos sólo los isómeros de PIRs que presentan configuración *R* en el carbono C-1 del dominio ciclopropano de la porción ácida del éster presentan considerable acción insecticida (Elliott y col., 1974; Soderlund y col., 2002).

En general, las preparaciones de PIRs consisten en mezclas de isómeros 1R-*cis* y 1R-*trans*, siendo los isómeros *cis* más potentes insecticidas que las configuraciones *trans* (ver tabla 4) (Casida y col., 1983; Glickman y Casida, 1982). La estereoquímica es

por lo tanto un factor determinante en la actividad insecticida de los PIRs. La Fig. 4 muestra la estructura del PIR sintético DTM, con su respectiva nomenclatura, junto con la comparación de la actividad insecticida en función de la isomería.

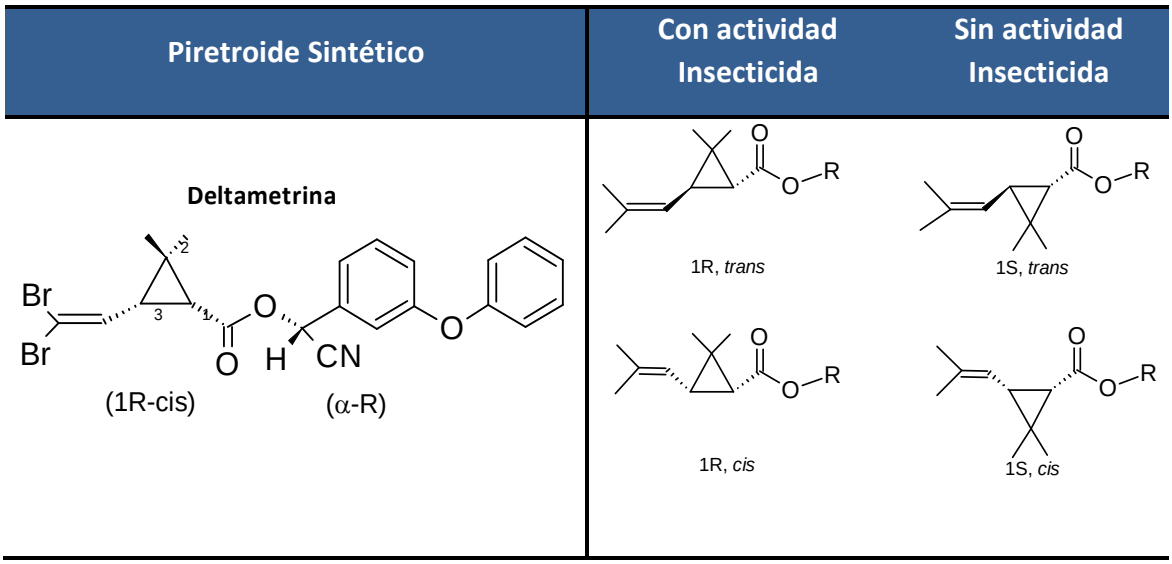


Figura 4. Relación de estructura y actividad insecticida de los PIRs sintéticos determinada por la estereoquímica.

La diversidad de relaciones estructura-actividad se expande aún más por la presencia o ausencia del grupo ciano (CN^-) en el C-α del residuo del alcohol, lo cual permite distinguir los *ciano* PIRs de los PIRs *sin grupo ciano*. A su vez, esta diferencia estructural está asociada con los efectos o síndromes neurotóxicos observados en roedores pequeños expuestos a altas dosis orales agudas de PIRs. Los PIRs sin grupo ciano (en general también denominados PIRs Tipo I) causan el síndrome conocido como "T" (que se manifiesta con temblores e hiperexcitabilidad), y los ciano PIRs (en general, PIRs Tipo II) causan el síndrome "CS" (los animales presentan coreoatetosis e hipersalivación) (Verschoyle y Aldridge, 1980). Hay muchos PIRs modernos que no fueron clasificados con los mismos criterios químicos y toxicológicos de los años 70's (no se comercializaban aun en esos tiempos), como es el caso de TEF y BIF evaluados en este trabajo. La información toxicológica disponible indica que estos PIRs sin grupo ciano tienen un perfil toxicológico que los permitiría incluir en el subgrupo de PIRs Tipo I (McDaniel y Moser, 1993; Soderlund y col., 2002) (Fig. 5).

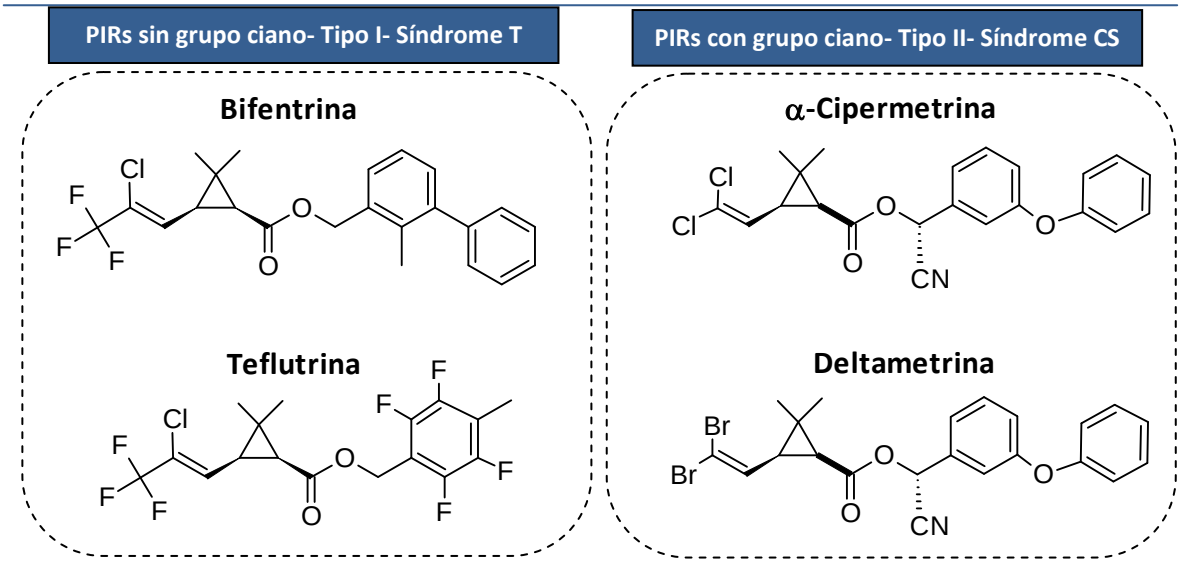


Figura 5. Clasificación de los insecticidas PIRs utilizados en este trabajo de tesis. Bifentrina y Teflutrina pertenecen a los PIRs sin grupo ciano o PIRs Tipo I. α-Cipermetrina y Deltametrina contienen el grupo ciano, y se los clasifica como PIRs Tipo II (Verschoyle y Aldridge, 1980).

1.2.3. Mecanismo de acción

Los PIRs actúan sobre el Sistema Nervioso (SN), específicamente sobre las terminaciones nerviosas y su Mecanismo Primario de Toxicidad (MPdT) se basa en la alteración funcional de los canales de sodio dependientes de voltaje (CSDV) (Narahashi, 1996), tanto en insectos como en mamíferos, incluyendo al hombre (Vijverberg y Van den Bercken, 1990).

A través de técnicas electrofisiológicas se pudo observar que el ingreso de PIRs al SN prolonga el tiempo de apertura de los CSDV, perturbando así los ciclos de despolarización/repolarización de la membrana plasmática neuronal (Fig. 6). Como resultado se tiene una descarga masiva y repetida de neurotransmisores en las terminaciones nerviosas, hiper-estimulación de los receptores sinápticos, y finalmente la interrupción de la neurotrasmisión debido a agotamiento neuronal. La prolongación e intensidad de la hiperexcitación neuronal que causan los PIRs en el SN tanto en los insectos como en mamíferos es dependiente de la dosis. Mientras haya concentraciones efectivas de PIRs en la circulación sanguínea, el SN permanecerá susceptible, los canales de sodio neuronales se mantendrán abiertos, la repolarización siempre será incompleta, y entonces se repiten los ciclos de despolarización en la sinapsis neuronal en forma ininterrumpida hasta que el nivel de PIRs en SN ya no tenga efecto sobre la

electrofisiología neuronal. El tiempo de prolongación de la perturbación en las corrientes entrantes de Na^+ está determinada por la estructura química y la conformación espacial del PIR, haciendo que el efecto sobre los canales CSDV sea estéreo-específico (Bloomquist, 1996; Soderlund, 2012; Soderlund y col., 2002). Se encontró en estudios realizados en rata que los PIRs tipo I prolongan la apertura de los CSDV desde decenas hasta cientos de milisegundos (mseg), mientras que los PIRs tipo II causan efectos más persistentes, y los tiempos de apertura pueden llegar a durar varios segundos. Se propone que las diferencias en los tiempos de apertura de los CSDV del sistema nervioso representa uno de los factores principales en la divergencia de los síndromes (tipo *T* o *CS)* que se generan después de la exposición oral aguda a PIRs tipo I y II, respectivamente (Ray y Fry, 2006; Soderlund y col., 2002).

En la parte superior de la Fig. 6 se observa el comportamiento fisiológico del sistema de los canales de Na^+ de tipo CSDV. Una vez que llega el estímulo (químico o eléctrico), los canales se abren permitiendo el ingreso abrupto y sostenido de iones Na^+ a la neurona, generándose una diferencia de potencial (ΔV) de membrana neuronal. Luego los CSDV se cierran bloqueando el ingreso de iones Na^+, y facilitando que los sistemas de salida de iones Na^+ en contra de gradiente (principalmente la enzima Na^+/K^+ ATPasa) contribuyan a recuperar el ΔV de "reposo" característico de cada tipo neuronal. En condiciones fisiológicas, cada ciclo de polarización-despolarización-repolarización transcurre en el orden de unos pocos mseg.

En la parte inferior de la Fig. 6 se observa el efecto de los insecticidas PIRs sobre los CSDV. La presencia de PIRs prolonga el tiempo del estado abierto del canal por decenas o centenas de mseg, permitiendo un ingreso excesivo de iones Na^+ al citoplasma del terminal sináptico neuronal. Como resultado, la membrana plasmática neuronal sólo llega a un potencial eléctrico apenas un poco más negativo que el ΔV de disparo, y entonces la neurona vuelve a disparar ante cualquier estímulo. Si las neuronas afectadas no logran recuperar el ΔV de reposo (repolarización completa), y se sostiene un ciclo repetitivo despolarización-disparo-repolarización incompleta-despolarización se llega al agotamiento celular e interrupción de la transmisión de impulsos eléctricos (Soderlund y col., 2002).

Los PIRs perturban la dinámica de los cambios de estado funcional de los CSDV agotando los mecanismos fisiológicos que dispone el sistema nervioso para sostener una comunicación inter-neuronal satisfactoria (ver Fig 6).

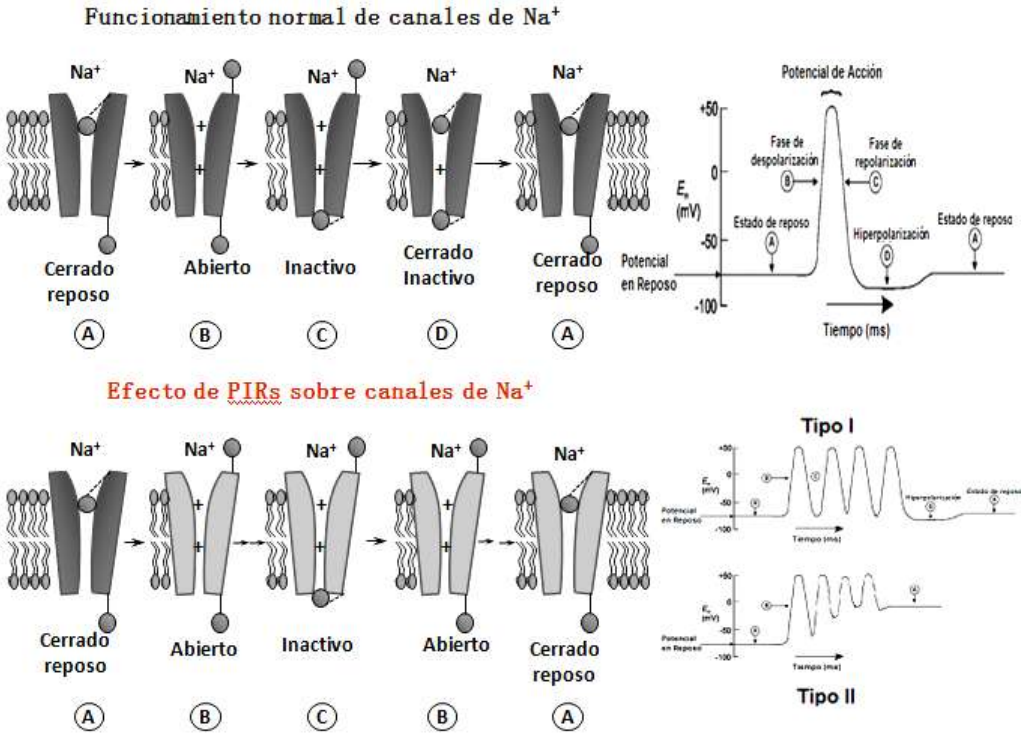


Figura 6. Mecanismo de acción de los insecticidas PIRs. Los PIRs están en contacto con las subunidades sensibles del CSDV prolongando el tiempo de apertura del canal (B) e impidiendo el retorno al estado basal de "cerrado-reposo", y ante cualquier estímulo (correspondiente a una concentración supra- umbral), vuelve a generarse un potencial de acción. Tomado de Davies y col, (2007).

Si bien el MPdT de los PIRs es mediado por la acción específica antedicha en los CSDV, también afectan a los canales de cloro dependientes de voltaje (CClDV). Estos canales se encuentran en las terminaciones nerviosas, fibras musculares y las glándulas salivales. Los PIRs actúan disminuyendo la conductancia de los CClDV. Esta acción "secundaria" probablemente sea, al menos en parte, la responsable de los signos de intoxicación característicos observados en ratas y ratones luego de la exposición aguda a los PIRs Tipo II, por ejemplo la ocurrencia de salivación profusa (Forshaw y col., 2000).

1.2.4. Absorción, distribución y eliminación de PIRs

La toxicocinética de estos plaguicidas está determinada en gran parte por la estructura química, vía de ingreso y/o administración, por el vehículo y por la dosis de los PIRs. Las rutas de ingreso posibles en mamíferos son la inhalatoria, cutánea y oral.

Existe evidencias que señalan mayores porcentajes de absorción en población general por via oral para la cipermetrina (Woollen y col., 1992). En el caso de ciertos grupos de la población, como la ocupacional (formuladores, aplicadores, recicladores de envases) y poblaciones vecinas a agroemprendimientos la absorción por vía dermal e inhalatoria (en forma directa si no se usan elementos de protección personal, o por deriva en el caso de aplicaciones movilizadas por aire) son las vías de ingreso más importantes con niveles relevantes de exposición (Ortiz-Pérez y col., 2005). La exposición no ocupacional a PIRs se produce principalmente por la ingesta de residuos presentes en los alimentos, o por la ingestión o el contacto dérmico con polvo doméstico contaminado o partículas que se adhieren a la superficie, después del uso hogareño-domiciliario (Saillenfait y col., 2015). En los niños muy pequeños, los comportamientos mano-boca y objeto-boca puede aumentar la exposición a PIRs especialmente en zonas contaminadas (Morgan, 2012). Los PIRs se absorben de manera incompleta en el tracto gastrointestinal (en general, 30-70% de lo que ingresó) luego del ingreso por vía oral, alcanzando la concentración plasmática máxima entre 2 y 4 h luego de la administración aguda (Anadón y col., 1996, 2006).

Diversos estudios en ratas y ratones determinaron que los PIRs, debido a su liposolubilidad, se distribuyen rápidamente en los tejidos de alto contenido lipídico (hígado, riñón, cerebro, sangre, plasma), atravesando las membranas celulares y la barrera hematoencefálica (Anadón y col., 2006; Edwards y col., 1986; Kim y col., 2006; Marei y col., 1982). Sin embargo, la evidencia parece indicar que su rápida metabolización y la alta velocidad de excreción de los metabolitos por orina y jugos biliares en el hombre, impiden que ocurra una bioacumulación toxicológicamente relevante (Miyamoto, 1976; Soderlund y col. 2002; Tsuji y col., 2011).

1.3. Evidencia de efectos tóxicos por exposición a PIRs a bajas dosis en animales de laboratorio

1.3.1. Estudios neuroconductuales

En los estudios históricos de PIRs, la evaluación del MPdT de los PIRs, así como también su clasificación de acuerdo a los signos de intoxicación, se realizó tratando animales de laboratorio (principalmente ratas y ratones) con dosis únicas que causaban intoxicación severa (y/o letalidad) administradas por vía intravenosa o

intracerebral. En general, los efectos de los PIRs evaluados de esa forma ocurrían con una latencia corta (pocos min) independientemente de su estructura. En el caso del tratamiento con dosis bajas-intermedias (claramente sub-letales) de PIRs solubilizados en aceite de maíz por vía oral (estudios reportados a partir de 1984), se observó una mayor variabilidad entre PIRs en los patrones tiempo-dosis-respuesta y en los signos neuroconductuales de neurotoxicidad (Soderlund y col., 2002; Wolansky y Harrill, 2008).

Existen estudios que demuestran que la administración oral de dosis efectivas bajas a medias conduce a una exacerbación leve de la actividad motora y de comportamientos estereotipados (rascado, lamido de patas, cavado de viruta, etc.) en ratas adultas. Dosis mayores causan disminución del movimiento en forma dependiente de la dosis. Este efecto motor no depende de la estructura del compuesto (o sea, para cualquier PIR se observa caída de la actividad locomotora), si bien existe hasta ~300 veces variabilidad en la potencia de los PIRs modernos (Crofton y Reiter, 1988, 1984; Wolansky y Harrill, 2008). Para otros efectos agudos que producen los PIRs en ratas, como alteración del reflejo sensoriomotor de sobresalto por estimulación acústica, perturbación del aprendizaje y cambios en el control de la temperatura corporal las alteraciones son de distinta magnitud y en distintas direcciones dependiendo del compuesto (Wolansky y Harrill, 2008). La temperatura corporal (Tc) fue el efecto seleccionado para este trabajo de tesis.

1.3.2. Efecto sobre la temperatura corporal por exposición a PIRs

Los procesos biológicos dependen de la Tc, ya que influye en el metabolismo celular así como también en la actividad y en la función neuronal (Swadlow y col., 1981). Ante la presencia de una sustancia tóxica se generan respuestas bioquímicas y celulares que pueden llegar a afectar la recuperación de la homeostasis. Un cambio en la Tc puede llegar a alterar el proceso de absorción de una sustancia tóxica en los tejidos, la actividad de una ruta metabólica, el balance hidrosalino etc, así como también los mecanismos moleculares de toxicidad (Gordon, 2005) (Fig.7).

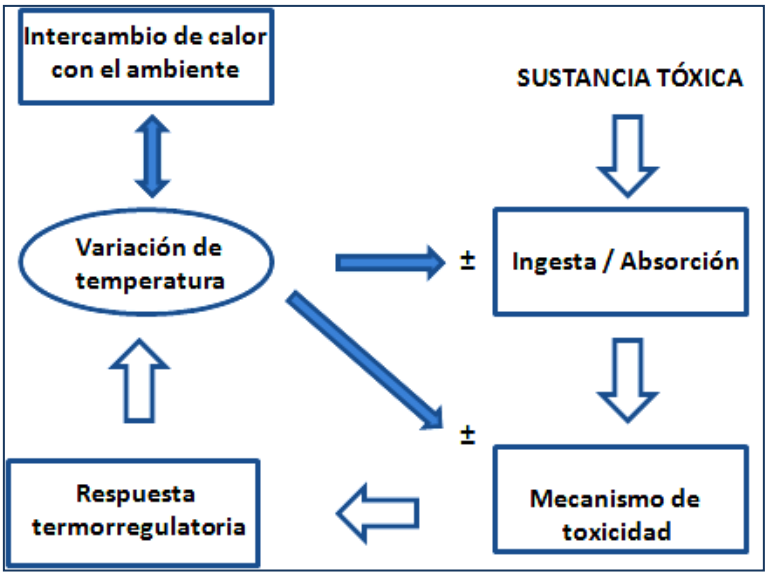


Figura 7. Respuesta termorregulatoria ante la presencia de una sustancia tóxica. Influencia de la temperatura del ambiente y de la presencia de sustancias tóxicas sobre la temperatura corporal (Tc) (Gordon, 2005).

La exposición a dosis de baja efectividad de PIRs en ratas y ratones causa alteraciones en la Tc que se hacen evidentes durante los primeros 30-90 min. Este efecto depende del tipo de PIR administrado. En general, dosis medias-altas de los PIRs tipo I causan hipotermia, y los tipo II causan hipertermia, en ambos casos en forma dependiente de dosis. También se pueden presentar respuestas bifásicas, en forma dependiente de la dosis y del tiempo en el que se realizan las mediciones. En general, si las dosis orales administradas no alcanzan a producir intoxicación aguda o síndromes cuasi-letales, los animales recuperan su Tc basal dentro de las 6 h post-administración (McDaniel y Moser, 1993; Soderlund y col., 2002; Wolansky y col., 2007a).

1.4. Métodos analíticos empleados en la determinación y cuantificación de PIRs en matrices biológicas.

A través de técnicas analíticas se ha podido identificar y cuantificar a los PIRs presentes en varios tejidos de animales de laboratorio, especialmente en rata (hígado, sangre, cerebro, riñón, grasa). Los métodos más aplicados según la literatura abierta disponible corresponden a:

- Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector espectrofotométrico UV/Vis (HPLC-UV/Vis) (Aprea y col., 2002; Aumann y Horne, 1996; Ueyama y col., 2010).

- Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC-MS) (Leng y Gries, 2009; Ramesh y Ravi, 2004).
- Cromatografia gaseosa acoplada a un detector de captura de electrones (GC-ECD) (Class y Kintrup, 1991; Mekebri y col., 2008; Santos y col., 2011).
- Cromatografía gaseosa acoplada a un detector de ionización de llama (GC-FID) (Class y Kintrup, 1991; De Souza Pinheiro y de Andrade, 2009).

En general, en el caso de los protocolos que utilizan GC-ECD se obtiene una sensibilidad hasta ~10 veces mayor respecto a HPLC-UV/Vis y GC-MS convencionales, y hasta 10^2 veces superior respecto a GC-FID. Esto se debe a que el detector de ECD es sensible a la presencia de elementos electronegativos en la estructura del analito. Los PIRs tienen en su estructura entre 2 a 4 átomos de halógenos unidos al extremo ácido de la molécula, como es el caso de cloro y flúor presentes en TEF y BIF, y de cloro y bromo en α-CPM y DTM respectivamente (Figs. 4-5). Otros sistemas cromatográficos aún más sensibles se han usado en la última década para cuantificar a los PIRs, dado que incorporan un sistema tándem masas como HPLC-MS-MS y GC-MS-MS (Scollon y col., 2011; Starr y col 2012 y 2014).

1.5. Evaluación del riesgo por exposición a mezclas de PIRs

Los seres vivos estamos expuestos cotidiana y simultáneamente a múltiples y variadas sustancias químicas, ya sea porque están presentes en el medio ambiente porque son ingeridas junto con la dieta (residuos que quedan en los alimentos) o a través de consumo de medicamentos, por exposición colateral a residuos de productos plaguicidas y formulados de limpieza entre otros. Estas sustancias se encuentran en bajas concentraciones, es decir a un nivel de trazas (ng/g, ng/mL o pg/g, pg/mL). Las mezclas de las diferentes sustancias pueden provocar diversas respuestas biológicas a nivel farmacológico o toxicológico, respecto a las que produce cada componente por separado, ya que pueden presentarse efectos sinérgicos, aditivos o antagónicos, incluso cuando cada uno esté presente en concentraciones similares o menores a su NOAEL.

Son pocos los estudios que muestran la cantidad de plaguicidas a los que podemos estar expuestos en forma diaria, lo cual es especialmente relevante en el caso de las poblaciones más vulnerables como es el caso de los niños en desarrollo. En el 2006, se realizó la "*First National Environmental Health Survey of Child Care*

Centers" (CCC) de USA en 334 jardines de infantes (Tulve y col., 2006), donde lograron identificar por GC-MS hasta 16 insecticidas, **de los cuales 8 eran PIRs.** Lo anterior generó el interés de incorporar en el proceso de evaluación de riesgo por exposición a insecticidas, estudios experimentales que generen información relacionada con los efectos de las mezclas de plaguicidas, y cuyos resultados puedan ser utilizados en los procesos de elaboración de marcos regulatorios con mayor grado de certidumbre (Silins y Högberg, 2011).

En el caso de insecticidas PIRs, la forma en que éstos se encuentran en un escenario real de exposición, es como producto comercial formulado con uno o más isómeros y enantiómeros de un mismo PIR y/o mezclas de PIRs además de contener excipientes inertes e ingredientes denominados "inactivos" como son los potenciadores de los efectos en las plagas (Gan J. y col., 2008).

La mayoría de los estudios realizados para estimar el riesgo de sufrir efectos adversos en la población humana, evaluaron el perfil toxicológico de estos insecticidas en animales de laboratorio, examinando los PIRs de a uno a la vez (Anadón y col., 1996; Crofton y Reiter, 1984, 1988; Scollon y col., 2011; Wolansky y Harrill, 2008; Wolansky y Tornero-Velez, 2013). Los ensayos dosis-respuesta evaluando ~15 PIRs distintos en ratas adultas bajo condiciones similares de exposición por vía oral y monitoreo de ciertos efectos agudos mostraron en todos los casos que hay una reducción de la actividad motora en forma dependiente de la dosis administrada (Crofton y Reiter, 1984, 1988; Wolansky y col., 2006).

Durante la década pasada, la EPA (USA) estudió en ratas la exposición a una mezcla de 11 PIRs, administrados por vía oral y evaluando la actividad motora como medida del efecto (Wolansky y col., 2009). Inicialmente seleccionaron una DE_{30} para cada PIR que estimaron sería un nivel de dosis equitóxica, es decir una dosis que causa la misma magnitud de efecto respecto al grupo control. La dosis equitóxica de cada PIR se estimó a partir de los resultados de los estudios de exposición simple. Además de la dosis de baja efectividad (DE_{30}) se modelaron los datos para estimar, para cada PIR, la dosis máxima que no generaba efecto sobre la actividad motora. Luego se construyó una mezcla con las dosis equitóxicas. En el estudio dosis-efecto de la mezcla de los 11 PIRs la mayor concentración de la preparación administrada contenía la tercera parte de la DE_{30} de cada insecticida. Considerando las relaciones dosis-respuesta para cada PIR

evaluado separadamente, cada [DE_{30}/3] se consideraba claramente subtóxica, y entonces no se esperaba ningún efecto observable de la mezcla sobre la actividad motora. Dicha mezcla se usó para poner a prueba la hipótesis por defecto utilizando el Modelo de Dosis Aditiva (Berenbaum, 1989; Roell y col., 2017) dado que se trataba de plaguicidas que actúan en un mismo tejido blanco y con un modo de acción similar. La mezcla causó una disminución marcada de la actividad motora (AM) en forma dependiente de la dosis (60% de caída de AM respecto al valor control), lo cual excluyó la posibilidad de que hubiera ocurrido adición de efectos (Fig. 8). Este estudio permitió confirmar la hipótesis: la combinación de dosis individualmente sub-efectivas de 11 PIRs actuó de la forma que postulaba el Modelo de Dosis Aditiva (Wolansky y col., 2009). Este hallazgo sugería que teniendo datos de las relaciones dosis-respuesta de los PIRs (evaluados separadamente) se podía predecir con aceptable aproximación como actuaría una mezcla de dosis bajas de los mismos. Sin embargo, estos estudios no podían ser generalizados, dado que solo se había probado la hipótesis usando una medida de efecto (actividad motora) que todos los PIRs examinados afectaban de la misma forma (todos la disminuían; no había distinción entre distintos subtipos de PIRs). En este trabajo doctoral se estudió un efecto distinto, la Tc, que se modifica en forma cualitativamente distinta dependiendo del subtipo de PIR.

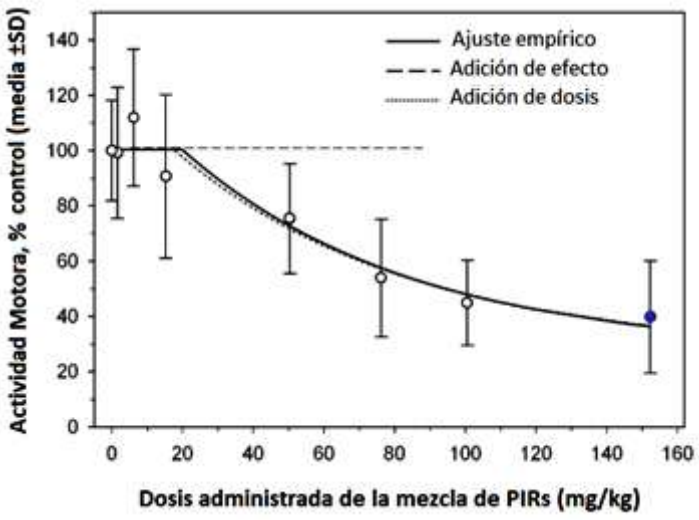


Figura 8. Aplicación del modelo de dosis aditiva en el estudio de la exposición oral aguda a la mezcla de 11 PIRs en rata adulta. Se usó actividad motora como medida del efecto de neurotoxicidad. El punto azul corresponde a la dosis total administrada de la mezcla stock: 152 mg/kg, ΣDE_{30}/3 de cada PIR (Wolansky y col., 2009).

La tabla 3 muestra la potencia relativa y DE_{30} de cada uno de los PIRs evaluados en el estudio de la mezcla de 11 PIRs mencionado anteriormente. Hubo una diversidad de hasta ~300 veces en la potencia para el efecto sobre la actividad motora, y los 4 PIRs examinados en esta tesis (DTM, α-CPM, TEF, BIF) presentaron potencias relativas entre las 6 más altas del grupo de 11 PIRs.

Tabla 3. Valores calculados de DE_{30} y potencias relativas de 11 PIRs evaluando actividad motora como medida de efecto neurotóxico.

Piretroide	Tipo	Potencia Relativa	DE_{30} mg/kg
Deltametrina	II	1,000	2,51 ± 0,29
Esfenvalerato	II	2,092	1,20 ± 0,14
λ-Cialotrina	II	1,902	1,32 ± 0,13
β-Ciflutrina	II	1,136	2,21 ± 0,20
Teflutrina	I	1,111	2,26 ± 0,22
Bifentrina	I	0,782	3,21 ± 0,32
Fenpropatrina	I/II	0,326	7,70 ± 0,65
Cipermetrina	II	0,235	10,70 ± 1,34
Permetrina	I	0,059	42,66 ± 3,58
s-Bioaletrina	I	0,028	90,48 ± 8,05
Resmetrina	I	0,009	292,00 ± 24,19

En el estudio referido, Deltametrina corresponde al PIR seleccionado como índice químico. Tomado de Wolansky y col., 2006.

1.6. Relevancia de las relaciones entre dosis administrada, concentración en tejido y efecto

En las fases de identificación del peligro y caracterización del riesgo de los estudios de análisis de riesgo se utiliza la cuantificación de los agentes tóxicos en tejidos para describir la relación entre el nivel de exposición, la dosis interna (concentración en tejido) y el efecto adverso generado, y emplearla como una herramienta útil que puede mejorar la precisión en la extrapolación entre especies.

En el caso de los PIRs, existen pocos estudios que relacionen los efectos agudos de dosis bajas, la concentración en tejidos, su toxicocinética y su toxicodinamia luego de la administración oral de estos compuestos. Los estudios de este tipo disponibles en la literatura determinaron la concentración en sangre, cerebro y en algunos casos hígado y tejido adiposo para BIF y DTM (Hughes y col., 2016b; Santos y col., 2011; Scollon y col., 2011; Tornero-Velez y col., 2010). Uno de esos estudios evaluó la concentración

en varios tejidos y actividad motora como medida de efecto tóxico luego de la exposición a una mezcla de dosis bajas (algunas subefectivas y otras de baja efectividad) de 5 PIRs (Starr y col., 2012, 2014), sacrificando los animales y extrayendo tejidos a distintos tiempos luego de la administración. Además, para dosis subletales de TEF y α-CPM antes de iniciar este trabajo de tesis no se disponía de información sobre la relación entre dosis administrada, las concentraciones en tejidos, y algún efecto neurotóxico. Por todo lo antedicho, nuestro laboratorio consideró de interés toxicológico ampliar el conocimiento que ya se tenía sobre el riesgo de intoxicación luego de exposición a combinaciones de dosis bajas de PIRs (Wolansky y col., 2009; Starr y col., 2012) usando como medida de efecto la Tc en vez de la AM. Conociendo las relaciones entre dosis administrada, dosis interna, concentración en tejidos blancos para cada PIR se puede predecir que puede ocurrir cuando una persona se expone a una mezcla de dosis bajas de los mismos. Esta información es especialmente relevante en Argentina, donde existe uso de múltiples PIRs en diversas aplicaciones a nivel urbano, suburbano y rural en forma secuencial o simultánea, y en las campañas contra insectos vectores de enfermedades como el Chagas (Alzogaray, 2003; MSAL, 2007, 2010).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS

2.1 La acción conjunta de los piretroides va a seguir los postulados de la teoría del modelo de dosis aditiva.

Se postula que la exposición a mezclas de insecticidas que tienen un mismo tejido blanco y un mecanismo de acción similar, genera un efecto conjunto que depende de las dosis individuales y de las potencias relativas de los insecticidas.

2.2 Si se administran distintas concentraciones de PIRs constituyendo una mezcla a dosis bajas (siendo éstas equitóxicas) se espera que cada PIR se mantenga en los tejidos en la misma proporción en la que se encuentra en la solución stock de la mezcla.

Lo anterior solo podría modificarse si se presenta algún tipo de interacción entre los PIRs o con el sistema biológico, lo cual no es esperable si cada insecticida es administrado en concentraciones que individualmente están muy alejadas de los niveles que saturan los sistemas de absorción, transporte y metabolización.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Elaborar estrategias válidas que permitan establecer la relación *[Dosis administrada – Dosis Interna - Efecto]* para mezclas de insecticidas piretroides usando ratas como modelo animal experimental, empleando dosis bajas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a. Evaluar la temperatura subcutánea como marcador de efecto neurotóxico en ratas adultas jóvenes machos expuestas a PIRs.

b. Evaluar la relación Dosis Administrada y Efecto en ratas adultas machos tratadas con dosis oral aguda de PIRs individuales y una mezcla cuaternaria de los mismos.

c. Identificar y cuantificar los insecticidas PIRs seleccionados:

- A partir de homogenatos de tejidos (sangre, hígado y cerebelo) incubados con cada compuesto individual para la validación del método.
- En los tejidos extraídos de los animales experimentales luego de la administración de los tratamientos con PIRs individuales.
- En los tejidos extraídos de los animales experimentales luego de la administración de la mezcla cuaternaria de dosis bajas de los PIRs que fueron previamente examinados en forma individual.

d. Evaluar e interpretar los datos obtenidos (temperatura corporal y concentraciones de PIRs en los tejidos) en cada uno de los escenarios de exposición examindos.

MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES

En esta sección se describirán los materiales, reactivos, equipos e instrumentación utilizados, desde la preparación de los animales experimentales hasta la cuantificación de los insecticidas PIRs en los tejidos seleccionados.

Los procedimientos de tratamiento, evaluación de temperatura subcutánea (Tsc) y disección, se realizaron en el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. El análisis de los plaguicidas en los tejidos, se realizó en la Cátedra de Toxicología y Química Legal de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

4.1 Reactivos

Para la realización de este trabajo se emplearon insecticidas PIRs de grado técnico tanto para los estudios *in vivo* como en las determinaciones cromatográficas, con porcentaje de pureza de 96,3 - 99,5%. Los reactivos de PIRs utilizados como estándares correspondieron al mismo lote que los empleados en los estudios *in vivo*.Todos fueron adquiridos comercialmente a través de ChemService (Philadelphia, PA, EEUU), salvo TEF que fue generosamente donado por Syngenta (Greensboro, NC, EEUU) (Ver tabla 4). Por su parte, Clorpirifos (CLORP) (ChemService, Philadelphia, PA, EEUU) se empleó como estándar interno en las determinaciones cromatográficas. Los solventes orgánicos: acetona, acetato de etilo (AcOEt), metanol (MeOH) y n-hexano fueron de calidad para análisis de plaguicidas (Aberkon Química, Buenos Aires, Argentina). Además se empleó sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4 anh.) de grado analítico (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) y solución salina de cloruro de sodio al 0,9% (Merck, Darmstadt, Germany). El Nitrógeno extra puro, usado para la evaporación de los extractos, y el ultra puro, usado como gas carrier en el cromatógrafo de gases, se adquirieron en INDURA Argentina.

Tabla 4. Clasificación estructural y toxicológica de los insecticidas utilizados

Nombre común de insecticidas	Nombre IUPAC	CAS	Tipificación según estructura y síndrome	Pureza (%)	DL_{50} (mg/kg)
α-Cipermetrina	(R)-α-ciano-3-fenoxibencil (1S,3S)-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclo propanocarboxilato y (S)-α-ciano-3-fenoxibencil (1R,3R)-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropano-carboxilato	67375-30-8	PIR tipo II	99,5	79[a]
Bifentrina	2-metilbifenil-3-ilmetil (Z)-(1R)-cis-3-(2-cloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enil)-2,2-dimetilciclopropano-carboxilato	82657-04-3	PIR tipo I**	99	55[a]
Deltametrina	(S)-ciano-(3-fenoxifenil)metil (1R)-cis-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato	52918-63-5	PIR tipo II	99	66,7[b]
Teflutrina	2,3,5,6-tetrafluoro-4-metilbencil (Z)-(1R)-cis-3-(2-cloro-3,3,3-tri-fluoroprop-1-enyl)-2,2-dimetilcipropano- carboxilato	79538-32-2	PIR tipo I**	96,3	22[a]

** **Bifentrina y Teflutrina** son PIRs modernos que se han clasificado como Tipo I por presentar un perfil toxicológico similar a permetrina. Las estimaciones de DL_{50} corresponden a valores obtenidos en estudios de toxicidad oral aguda, en general utilizando aceite de maíz como vehículo. [a]WHO (2010), [b](Gaines, 1969).

4.2 Modelo experimental seleccionado para los estudios "in vivo"

Se usaron ratas Wistar (colonia Hsd:WI:FCEN), adultos machos, de 8-9 semanas de edad (250 – 350 g al recibirlos). Los animales fueron adquiridos en la colonia del Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (FCEN, UBA). Inicialmente se alojaron en grupos de dos animales, en jaulas de policarbonato translúcido (45 cm x 24 cm x 20 cm; Tecniplast, Italia) que contenían viruta de madera de origen comercial (Gilardoni-Cabañas, CABA, Argentina). Todos los animales se mantuvieron en condiciones controladas con fotoperiodo de 12 h de luz/ 12 h de oscuridad, a una temperatura de 22,5 ± 2,5 °C y una humedad entre el 40 y 80%. Se les proporcionó alimento balanceado (ACA Cooperación, Provincia de Buenos Aires, Argentina) y agua *ad libitum* excepto cuando se indica de otro modo.

Para un uso ético de los animales se siguieron las recomendaciones de la "Guía para el cuidado y utilización de animales de laboratorio" del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NRC, 2011) y la orientación profesional brindada por el personal del Bioterio Central.

Las soluciones de PIRs empleadas para la administración oral de los animales fueron preparadas en aceite de maíz (Sigma Aldrich, MO, EEUU) y administradas usando jeringas plásticas conectadas a intubadores de acero inoxidable de 2,5" de largo, con punta redonda pulida para realizar la intubación intragástrica de roedores pequeños (Popper & Sons, NY, EEUU). El registro de Tsc se realizó utilizando un sistema telemétrico de captura y procesamiento de datos de identidad del animal y temperatura corporal, desarrollado por la empresa Biomedic Data Systems (BMDS) (www.bmds. com; Seaford, DE, EEUU).

4.3 Preparación de muestras- Extracción de PIRs de los tejidos

La extracción de PIRs, a partir de los tejidos, se realizó empleando un agitador rotatorio vertical CK-T modelo Multi RS-60 (Biosan Ltd, Riga, Latvia) y una centrífuga PRESVAC, DCS-16-RV. El proceso de clean-up se efectuó por extracción en fase sólida usando cartuchos (SPE) de sílica de fase normal, SEP-PAK SILICA de 3 cc/500 mg (Waters, Inc., Milford, MA, USA), dispuestos en un colector de extracción de 12 posiciones incorporado a un sistema de vacío (SUPELCO VISIPREP Cat N^{o}. 5-7030).

4.4 Análisis cromatográfico

El análisis cromatográfico del extracto de las muestras fue llevado a cabo en un Cromatógrafo Gaseoso con Detector de Micro-Captura de Electrones (GC-μECD), Hewlett Packard 5890 SERIES II. El sistema GC-ECD estuvo equipado con dos inyectores y dos detectores (canales A y B) de ^{63}Ni, con inyector automático dual-HP-5890, y sistema de inyección "split/splitless" y dos columnas cromatográficas de diferente polaridad:

- DB5 (Zebron, L = 30 m x I.D = 0,32 mm x df = 0,25 μm; Phenomenex, Torrance, CA, EEUU)
- PAS1701 (L = 25 m x I.D = 0,32 mm x df = 0,25 μm; Hewlet Packard, Palo Alto, CA, EEUU).

Los microviales, viales, jeringas y demás consumibles utilizados durante el procedimiento analítico fueron de la calidad recomendada por los protocolos internacionales de referencia y la experiencia de la Cátedra de Toxicología y Química Legal (FFyB, UBA).

5. MÉTODOS

5.1 Selección de PIRs para los ensayos experimentales.

Se tuvieron en cuenta varios criterios para seleccionar el número e identidad de los insecticidas PIRs que se estudiaron en este trabajo de tesis doctoral. Primero, se seleccionaron compuestos que representan el rango más bajo de DL_{50} oral en ratas adultas dentro de esta clase de insecticidas (WHO, 2010; Wolansky y Harrill, 2008).

La mezcla de PIRs seleccionada estuvo integrada por cuatro compuestos: dos PIRs sin grupo ciano, BIF y TEF, y dos ciano-PIRs, α-CPM y DTM. Se buscó combinar dosis bajas de los compuestos individuales, en concentraciones por debajo de los niveles de efecto que causan signos de neurotoxicidad evidente en rata adulta tales como salivación, temblores y coreoatetosis (Pato y col., 2011; Scollon y col., 2011; Wolansky y col., 2006, 2007a, 2007b). Además, se consideraron los resultados del "*First National Environmental Health Survey of Child Care Centers"* (CCC) de USA (Tulve y col., 2006). En dicho relevamiento se seleccionaron 334 jardines de infantes en Estados Unidos de los cuales en 168 de ellos fue posible determinar la presencia de PIRs. Los autores hallaron simultáneamente 2, 3 y hasta 4 PIRs distintos en el 30, 15 y 10% de los sitios CCC evaluados, respectivamente. También se tuvo en cuenta la frecuencia en la que se habían detectado α-CPM y DTM en varios estudios ambientales y en residuos de alimentos (Jardim y Caldas, 2012; Morgan, 2012; Tulve y col., 2006). Por último, en este trabajo se seleccionaron ciano y no ciano PIRs a fin de evaluar los síndromes neuroconductuales específicos que la mezcla de estos insecticidas causan en ratas (Wolansky y Harrill, 2008).

5.2 Estudios dosis-respuesta utilizando temperatura subcutánea (Tsc) como medida de efecto.

En función a los resultados de estudios previos realizados por nuestro laboratorio (Pato y col., 2011; Wolansky y col., 2007a) y por otros grupos (Gordon, 2005; Gordon y col., 2008; McDaniel y Moser, 1993) se seleccionó la Tsc como medida de efecto. En la etapa de poner a punto la utilización de este parámetro para evaluar toxicidad aguda, en el laboratorio se realizaron previamente varias pruebas, incluyendo una comparación de mediciones de temperatura rectal (Trec) y Tsc (usando animales del mismo peso y edad que luego fueron usados en los estudios definitivos). Si bien, como era esperable,

los registros de Trec y Tsc no fueron iguales (presentan diferentes balances entre generación y pérdida de calor corporal), se comprobó que existía una correlación aceptable entre éstos (Pato y col., manuscrito en preparación). La Tsc se monitoreó usando un sistema semi-automatizado que simultáneamente permite identificación de cada animal del ensayo, mediante medición telemétrica de temperatura y procesamiento de datos. La medición se basa en la capacidad de un sensor-microchip de tipo "transponder" (IPTT-300®, *Implantable Programmable Temperature Transponder*, http://www.bmds.com) que previamente se implanta en el animal, que es capaz de captar la Tsc, convertirla en una señal electrónica y retransmitirla a un escáner manual conectado a la interfase de procesamiento de datos.

5.2.1 Implante de microchip (transponder BMDS IPTT-300) y registro de Tsc por telemetría

El microchip BMDS IPTT-300® de 2 mm de diámetro y 14 mm de largo (tamaño similar al de un grano de arroz) viene en una jeringa estéril precargada y lista para usar. El microchip se inyecta en la zona lumbar del animal a nivel subcutáneo. Este se "ancla" al tejido en la zona del implante y estimula al tejido blando a la formación de una cápsula a su alrededor que lo fija en la posición deseada (Fig. 9). El procedimiento requiere condiciones de asepsia para lo cual se emplea etanol 96%, tanto para desinfectar el área de trabajo como también la zona de implante. No requiere de anestesia, el procedimiento se realiza en menos de 1 min y el animal tiene una recuperación rápida (24 a 48 h), si bien se recomienda esperar más tiempo para estudios funcionales. En este trabajo de tesis, para asegurar la recuperación completa de los animales implantados y ajustarse a la disponibilidad del cuarto experimental del Bioterio, entre la implantación y los experimentos transcurrió 1 - 2 semanas. La recuperación se constató observando al animal desde afuera de la jaula, y registrando:

- Actividad ambulatoria, comportamientos no locomotores (olfateo, acicalado, cavado de jaula, rascado) y actividad vertical.
- Consumo de agua y alimento
- Aspecto del punto de implante
- Aspecto de la materia fecal
- Monitoreo de Tsc los días previos al día del experimento para descartar infección local.

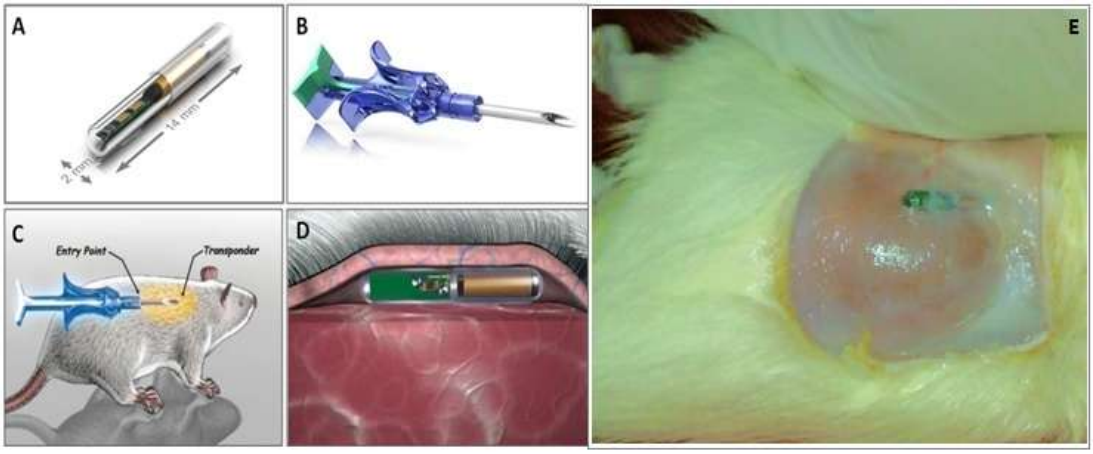


Figura 9. Implante de chips en animales para estudiar Tsc por radiotelemetría. A) Esquema y dimensiones de los chips implantados en los animales para los estudios termométricos. B) Jeringas pre-cargadas con microchip. C) Zona de implantación en el animal. D) Ilustración del chip ya implantado subcutáneamente indicando a su alrededor el tejido muscular, dermis y pelaje. Fuente: http://www.bmds.com. E) Representación real del microchip IPTT-300® implantado en uno de los animales utilizados en las pruebas piloto. Se observa el encapsulamiento del dispositivo. Foto: Gentileza del Lic. Alejando Pato.

Luego de la recuperación del animal post-implantación, se registró la Tsc con ayuda de un escáner, que al aproximarse a la zona del implante, permite capturarla de manera instantánea. Se realizó el registro y almacenamiento de los datos a través del programa DAS-Host. El registro de Tsc se realizó varias veces a lo largo de la semana previa al experimento a fin de establecer la Tsc basal de cada animal.

Este sistema de medición de temperatura produce menos estrés que la técnica clásica de medición por sonda rectal, especialmente cuando se requiere monitorear Tc en forma repetida dentro de un intervalo de tiempo de pocas horas. Existe experiencia de casi 2 décadas de uso de este sistema de microchip en estudios fisiológicos, farmacológicos y toxicológicos de monitoreo de temperatura en organismos vivos adultos y en desarrollo (Kort y col., 1998; Pulikanti y col., 2011). Dicha experiencia incluye el monitoreo de Tsc como medida de respuesta tóxica luego de la administración oral aguda a PIRs que se realizó en nuestro laboratorio en ratas infantes (Bardullas y col., 2015), y estudios de otros laboratorios realizados con ratas adultas jóvenes (Williams y col., 2007). Los datos que se pueden obtener con este sistema de microchips subcutáneos son comparables a lo reportado en trabajos que estudiaron el

efecto tóxico de plaguicidas sobre la temperatura corporal interna (*core temperature, Tcore)*. Según Gordon, el mejor método para generar alta productividad de datos de T_{core} por telemetría con mínimo estrés y alta reproducibilidad era el sistema de radiotransmisores implantados a nivel intraperitoneal (Gordon et al., 2008). Las desventajas de este sistema son su alto costo tanto para la adquisición de los equipos, como de los procesos de exportación-importación de los transmisores para cada ciclo de reacondicionamiento, y también la imposibilidad de incluir más de un animal por jaula, y consecuentemente se requiere un mayor espacio. De este modo, estos microchips subcutáneos tienen aplicabilidad en modelos experimentales de Toxicidad Oral Aguda de sustancias tóxicas en rata y ratón.

5.2.2 Diseño de los estudios dosis-respuesta para los estudios de administración simple

Primero se realizaron ensayos independientes de tipo Dosis-Respuesta donde se evaluó cada PIR en forma individual (TEF, BIF, α-CPM, DTM). Cada animal fue usado para un único experimento y un único grupo de dosis, dado que luego de los monitoreos de Tsc fue sacrificado para la extracción de tejidos. Los procedimientos de tratamiento y medición de Tsc fueron idénticos en todos los experimentos.

Los rangos de las dosis orales fueron seleccionadas de acuerdo a información obtenida de estudios previos (Soderlund y col., 2002; Wolansky y col., 2006, 2007b, 2009; Wolansky y Harrill, 2008) en los cuales se evaluaron cambios en la actividad motora como medida de la neurotoxicidad aguda en ratas adultas machos jóvenes, y también de otros estudios conducidos bajo condiciones comparables de exposición y con similares efectos (McDaniel y Moser, 1993; Soderlund y col., 2002; Wolansky y Harrill, 2008). Del análisis global de esos trabajos se pudo estimar para cada PIR examinado la "dosis de mínimo efecto", comparable a un LOAEL (*Lowest Observable Adverse Effect Level*). En los trabajos antes mencionados, para aproximar la dosis de baja efectividad neurotóxica se tomó como referencia la dosis DE_{30}, o sea el nivel de exposición que causaba un 30% de caída en la actividad motora respecto a la actividad promedio del grupo control. Las estimaciones de la DE_{30} equivalían a una dosis oral aguda que generaba efectos biológicos, tales como aumento de actividad estereotipada e inquietud-hiperactividad locomotora inicial, seguida de aletargamiento, pero sin causar

signos devidentes de intoxicación moderada a severa (Wolansky y col., 2006, 2007b; Wolansky y Tornero-Velez, 2013). La α-CPM no estuvo incluida en los trabajos previos antes mencionados ni en la clasificación toxicológica original de PIRs en rata (Verschoyle y Aldridge, 1980), por lo que el esquema de exposición se definió a partir de las siguientes fuentes de información: i) un documento técnico sobre α-CPM y cipermetrina (Pronk y col., 1996), ii) una estimación de la diferencia de toxicidad oral aguda entre α-CPM y cipermetrina en base a los valores reportados de DL_{50} en rata (WHO, 2010), iii) un trabajo donde se examinaron los efectos de dosis sub-letales de una preparación de cipermetrina sobre la Trec (McDaniel y Moser, 1993), y iv) datos generados en pruebas pilotos en nuestro laboratorio.

Teniendo en cuenta todas las fuentes de información mencionadas previamente, lo que se buscaba *a priori* era seleccionar al menos una dosis que no generara efecto sobre la Tsc, una o dos dosis de bajo efecto y una o más dosis que causaran variaciones en el marcador de efecto (Tsc) sin llegar a producir una intoxicación severa. Para 3 de los 4 PIRs examinados esto fue posible a partir de las primeras fases experimentales, pero la evaluación del efecto mínimo de dosis bajas para TEF fue un desafío particular, dado que las relaciones dosis-efecto tanto para actividad motora (Wolansky y col., 2006) como Tc (pruebas pilotos de este trabajo de tesis) presentaron una pendiente positiva muy alta, siendo el rango de dosis efectiva para Tsc muy estrecho, y las dosis que causaban alteraciones evidentes de normotermia fueron muy cercanas a la dosis letal (ver más detalles la sección resultados).

Para cada uno de los estudios de exposición simple y de evaluación de la mezcla se requirió un número de animales que era imposible manejar simultáneamente en un único experimento, debido a las razones siguientes:

- Infraestructura y tiempos habilitados para el trabajo en el bioterio experimental.
- Colaboradores disponibles en los experimentos a lo largo de las semanas que duraba cada bloque experimental para la cría, implante de microchips subcutáneos, monitoreo pre-exposición, disección, etc.
- Tiempos de demora en el sacrificio y disección de cada animal luego del monitoreo de Tsc.

Por lo anterior, la planificación del diseño experimental del estudio se realizó en bloques, es decir, pequeños grupos de animales por dosis administrada incluyendo siempre un grupo control (tratado con el vehículo). Cada bloque experimental requirió de las siguientes instancias: reserva de animales, aclimatación en la sala experimental, implante de chips para evaluación de efecto, monitoreo del estado de los animales post-implante varios días antes del dia de experimentación, administración de PIRs y disección de tejidos, demandando un tiempo total de aproximadamente 4 meses.

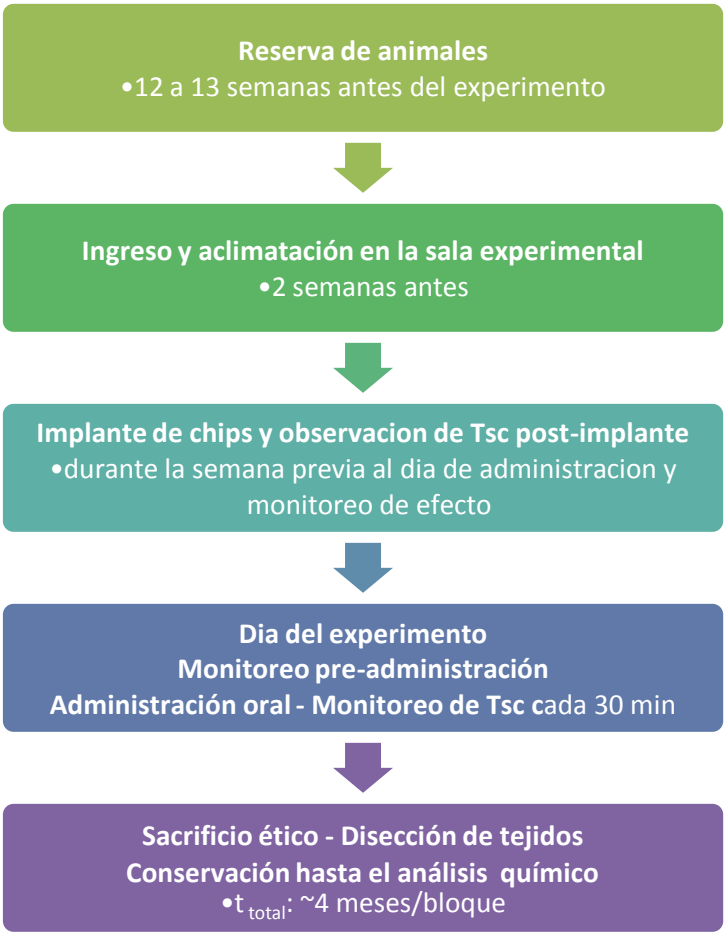


Figura 10. Etapas del diseño experimental en los estudios de exposición simple y evaluación de la mezcla.

Todos los bloques fueron realizados bajo condiciones similares de manipuleo de animales, alimentación, alojamiento (dimensiones y material de jaulas; tipo de lecho de viruta), temperatura ambiental, y por los mismos experimentadores.

La Tabla 5 muestra la distribución de los animales en bloques y las dosis administradas.

Tabla 5. Organización de los ensayos de administración de dosis oral aguda de PIRs individuales a ratas Wistar adultos macho. Considerando todos los bloques de todos los estudios, se utilizaron 6 a 10 animales por grupo de dosis.

PIRs	No. de Bloques	Dosis mg/kg
α-Cipermetrina	4 Bloques	Control 0,5 3 6 9 12 15
Bifentrina	3 Bloques	Control 0,5 3 9 12
Deltametrina	4 Bloques	Control 1,5 3 6 9 12
Teflutrina	4 Bloques	Control 0,1 3 6 6,75 7,5 9*

*La dosis de 9 mg/kg produjo cambios más robustos y reproducibles en temperatura, pero también causó signos de intoxicación severa que requirieron el sacrificio ético de los animales (ver más detalles en resultados).

Aproximadamente una hora antes de iniciar el experimento se suspendió el suministro de alimento y agua a los animales, luego se pesaron y se registró la Tsc (tiempo t_0 = 30 - 45 min antes de iniciar la serie de administraciones). Ese valor de Tsc pre-tratamiento se consideró como la temperatura inicial.

Las soluciones de los PIRs estudiados se prepararon ~2 h antes del experimento. El compuesto puro fue disuelto en aceite de maíz (vehículo), hasta obtener una solución homogénea. El volumen administrado de la dosis oral aguda se calculó de acuerdo al peso corporal (1 mL/kg). Los animales pertenecientes al grupo control, incluidos en cada bloque, fueron administrados con 1 mL/kg de vehículo. En genral, el volumen de

dosis administrado estuvo dentro del rango 0,28 - 0,35 mL de acuerdo al peso del animal.

Los animales se trataron mediante sonda gástrica que consiste en la introducción de una sonda metálica hasta el esófago (Fig. 11). Las sondas se acoplaron a una jeringa estéril graduada de 1 mL. El diseño de estas sondas permite que la dosis llegue en forma rápida y precisa justo antes del estómago del animal, evitando daño en el sistema digestivo y episodios de aspiración pulmonar.

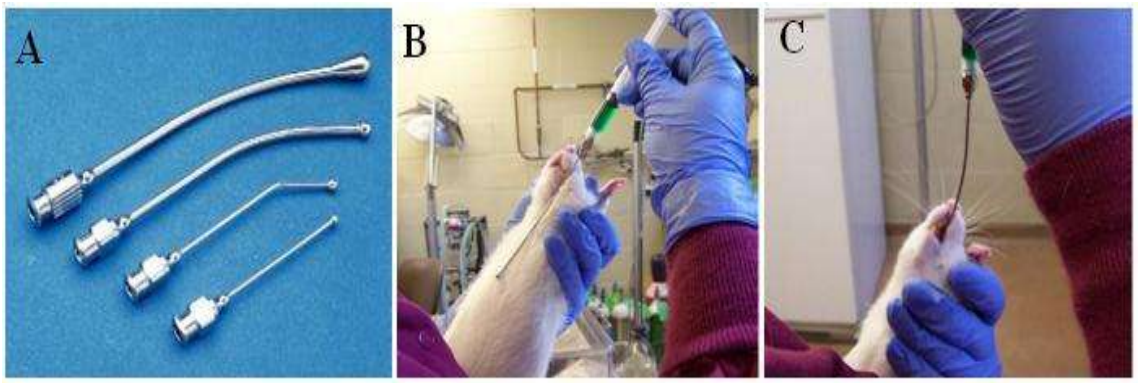


Figura 11. Técnica de intubación gavage. A) jeringas curvas de acero inoxidable de diferentes tamaños para intubación oral de roedores. B) estimación de distancia entre la cavidad oral y boca del estómago. C) Introducción oral de la jeringa en una rata adulta (Kris Andrews y Shelly McErlane, 2015).

5.2.3 Selección de dosis individuales para el estudio de la mezcla cuaternaria

La concentración de PIRs en la mezcla se seleccionó en función del valor estimado de la dosis de referencia BMD_{30} (por sus siglas en inglés: *benchmark dose 30*) el cual en este trabajo corresponde a la dosis que a un tiempo específico genera un cambio del 30% en la Tsc respecto al valor basal (pre-administración).

A continuación se presentan los detalles sobre modelado de datos y estimación de BMD_{30}:

Para estimar una dosis equitóxica de cada PIR a partir de los estudios de exposición simple se utilizó el sistema de estimación de BMD propuesto por USEPA (2012) *Benchmark Dose Modeling Software* (versión 2.4, USEPA, 2012, www.epa.gov) operado conjuntamente con el programa R (versión 2.15; www.r-project.org). Los datos

fueron ajustados a un modelo de medidas repetidas denominado *ToxicoDiffusion Beta* (https://www.epa.gov/bmds/about-benchmark-dose-software-bmds). El uso de este sistema de modelado a fin de estimar dosis de baja efectividad para Tsc para cada PIR, fue previamente puesto a punto en el trabajo de una tesista doctoral de nuestro grupo de investigación (Romero, 2014). La BMD_{XX} es la dosis estimada a partir de los datos experimentales (mediante el sistema de modelado antedicho) que causa un cambio predeterminado en la respuesta R (o sea, BMR = XX) al comparar un grupo tratado *vs* el grupo control correspondiente (Fig. 12). El sistema de modelado matemático utilizado fue desarrollado por USEPA (2012) a partir de algoritmos previamente establecidos (Crump, 1984). En el reporte de Sand y col. (2008) se explican los fundamentos matemáticos de la aplicación de este sistema en toxicología y se muestra como se llega a estimar un *Punto de Partida* (PoD por las siglas en inglés de *Point of Departure*), o sea un punto a partir del cual se puede obtener la dosis de referencia aguda (en Inglés, *Acute Reference Dose*, o ARfD) luego de aplicar los factores de seguridad e incertidumbre que corresponda al extrapolar del modelo animal experimental a humanos. El sistema de estimación de BMD_{XX} es un procedimiento alternativo que reduce la incertidumbre que poseían los métodos tradicionales de PoD basados en la identificación de NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) o LOAEL (*Lowest Observable Adverse Effect Level*).

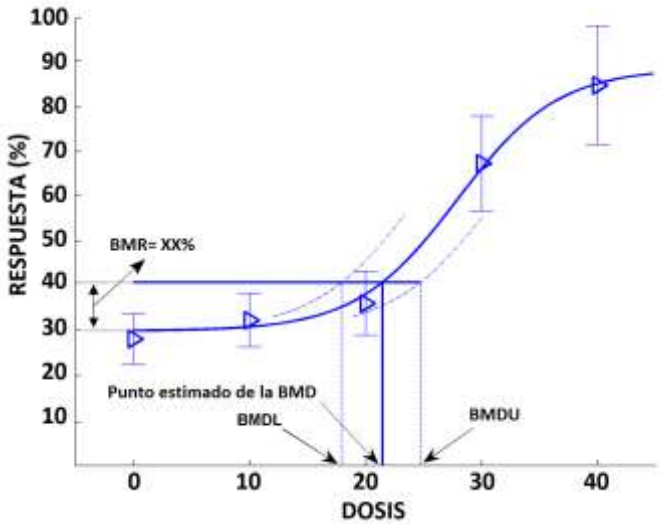


Figura 12. Modelado de datos para calcular la dosis BMD de interés. Representación de la estimación de la dosis BMD. Donde BMD_L y BMD_U son los límites inferior y superior del Intervalo de Confianza ($IC_{95\%}$) que corresponde a la estimación de la dosis BMD que causa un cambio en la respuesta del XX% (BMR = XX%) (Tomado de EFSA, 2017).

En este trabajo de tesis el propósito del modelado de datos era identificar para cada PIR una dosis equitóxica, es decir, aquella que causa una magnitud de respuesta similar en la Tsc independientemente del PIR evaluado, y a su vez, usar una fracción de este valor para construir la mezcla. La intención era que para cada PIR la dosis que se buscaba combinar sea un nivel que separadamente no alcanzaría para causar cambios estadísticamente significativos en Tsc respecto al grupo control. Por eso se estimó para cada PIR su BMD_{30} [R = 30%; BMR = 0,30], y la **dosis más alta examinada en el estudio dosis-efecto de la mezcla consistió de ½ de cada BMD_{30}.** A partir de la dosis BMD_{30} estimada para cada PIR se calcularon las concentraciones de las 3 dosis para evaluar en el estudio de mezclas: D1, D2 y D3, que corresponden a $^{1}/_{20}$ x $BMD_{30,}$ ¼ BMD_{30} y ½ BMD_{30}, respectivamente (Tabla 6). De este modo, se asumió que cada PIR aportaría un mismo porcentaje de efecto tóxico (sobre la Tsc en este caso), o sea un 25% de la carga tóxica total incluída en cada dosis de la mezcla (Fig. 13A).

Tabla 6. Composición de la solución stock de la mezcla cuaternaria. Valores de las concentraciones individuales de los PIRs combinados en la mezcla stock. Se examinaron 3 dosis de la mezcla: D1, D2 y D3. Si se sumaban los efectos individuales aportados por cada PIR, se esperaba que las 3 concentraciones elegidas no provocaran intoxicación aguda evidente, y que las dosis D1 y D2 fueran dosis de no efecto para Tsc.

Parámetro	BIF	TEF	α-CPM	DTM	Total (mg/kg)
BMD_{30} (mg/kg) *	6,82	5,22	4,06	1,80	17,90
Proporción en la mezcla	0,38	0,29	0,23	0,10	1,00
D3 (mg/kg)	3,41	2,61	2,03	0,90	8,95
D2 (mg/kg)	1,705	1,305	1,015	0,450	4,475
D1 (mg/kg)	0,341	0,261	0,203	0,090	0,895
Tiempo max efecto teórico (h)*	2,8	1,5	1,2	2,9	-
PEM experimental (h)**	2,5-3	1-1,5	2-2,5	2,5-3,5	-

*Determinado utilizando BMDS software

**PEM = Periodo de Efecto Máximo; intervalo de tiempo donde se observó la mayor magnitud del efecto de cada PIR sobre Tsc en los experimentos donde se evaluó el rango completo de dosis (ver Figs. 17, 19, 33 y 35 en la sección de resultados).

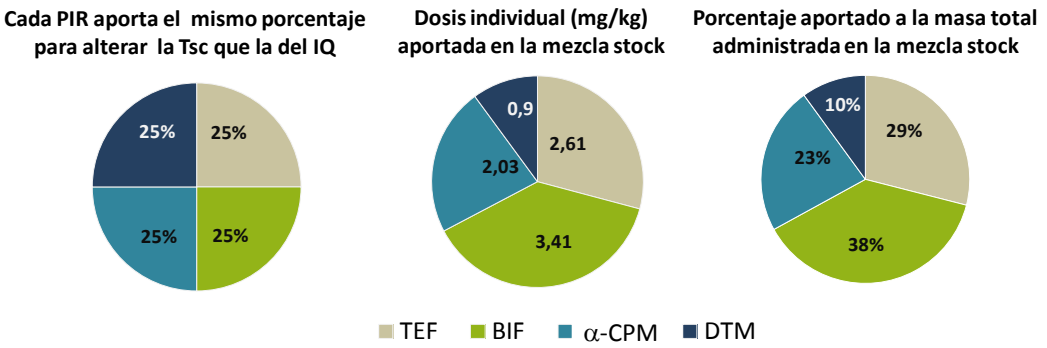


Figura 13. Composición de la mezcla cuaternaria. Se muestran los aportes de cada uno de los PIRs que conforman la mezcla en función a A) porcentaje de la capacidad total que presentó la combinación de PIRs para alterar la Tsc, B) dosis en mg/kg, y C) porcentaje que representa la dosis de cada PIR luego de expresarla como equivalentes de toxicidad.

El estudio de la mezcla de PIRs se realizó utilizando el mismo modelo y condiciones de los ensayos de administración de PIRs individuales. Esto incluye: el modelo animal experimental (cepa, peso, edad y colonia), y los procedimientos para el implante de microchips, la preparación de soluciones stock, el protocolo para la administración oral y el registro de Tsc. El diseño experimental incluyó un grupo control tratado con aceite de maíz y tres grupos dosificados con la mezcla de PIRs (N = 4 - 6 por grupo). Para cada PIR examinado, los valores de concentraciones seleccionados para la administración simultánea resultaron cercanos a los niveles de no efecto estimados en estudios previos en ratas adultas machos que evaluaron actividad motora y temperatura corporal interna como indicadores de efecto (Wolansky y col., 2007a, 2009, 2006).

5.2.4 Medición de Tsc – Observaciones clínicas - Registro de signos de intoxicación

Después de la administración oral se registró la Tsc de cada animal cada 30 min durante 4,5 - 5 h. Antes de administrar el tratamiento se tomó también el registro de Tsc (valor de "tiempo cero"), que representa la línea de base para cada animal.

La ocurrencia potencial de signos de neurotoxicidad se evaluó mediante observaciones realizadas al momento de capturar los registros de Tsc. Se tomó nota de alteraciones motoras (hiper-/hipo-actividad ambulatoria), la ocurrencia de

fasciculaciones musculares, la exacerbación de comportamientos estereotipados (exacerbación de actividad mandibular del tipo mascado, rascado, olfateo, acicalamiento, cavado de lecho de viruta, sacudida de cabeza o cuerpo entero, movimientos repetidos de las extremidades delanteras). Esto no se hizo en los mismos intervalos de tiempo post-tratamiento en todos los casos, por lo cual se presenta una síntesis de carácter cualitativo (ver sección resultados).

5.3 Sacrificio de los animales, disección y almacenamiento de tejidos

Aproximadamente 60 min después de completar la última serie de registros de Tsc, los animales fueron sacrificados para extraer los tejidos de interés. Los animales se trasladaron al cuarto de disección del Bioterio Central, donde fueron anestesiados en cámara de CO_2/O_2. De cada animal se tomaron muestras de sangre (SG) (2 - 3 muestras de 2 mL) por punción cardíaca utilizando una jeringa estéril heparinizada. Las muestras de SG fueron colectadas en viales de vidrio. Luego de constatarse la muerte del animal se procedió a la decapitación en guillotina de acero lo cual permitió acceder a la región encefálica. A continuación se extrajeron cortes de uno de los lóbulos mayores del hígado (HG) (2 - 3 muestras de ~1 g cada uno) y el cerebelo (CE), los cuales fueron almacenados en microtubos plásticos tipo Eppendorf. Las muestras de SG, HG y CE fueron inmediatamente introducidas en un recipiente con hielo, y luego almacenadas en freezer hasta su procesamiento.

Nota: Cada bloque de los estudios de administración simple y combinada a PIRs requirió de 3 - 4 semanas desde la llegada de los animales al cuarto experimental, su aclimatación y el implante de microchips hasta el momento del experimento (desde la administración a la disección de tejidos). Las tareas de instalación y puesta a punto del sistema telemétrico de monitoreo de Tsc, pruebas pilotos de monitoreo de Tsc en ratas adultas jóvenes (Pato y col., manuscrito en preparación), y en cada bloque experimental la implantación de los animales, monitoreo del estado fisiológico los días previos al experimento, la administración y la disección de tejidos demandó un trabajo intensivo de equipo de 3 - 4 personas, dentro del cual el Lic. Alejandro Pato tuvo un rol fundamental. También participaron el Dr. Wolansky, la Dra. Delfina Romero y la Lic. Carla Sosa-Holt.

5.4 Determinación de concentraciones de PIRs en los tejidos

El estudio de la relación entre la dosis administrada y la concentración en SG, HG y CE se realizó usando técnicas analíticas que incluyeron protocolos de extracción de los PIRs, purificación de los extractos, e investigación y cuantificación de los PIRs. La selección de la técnica analítica más conveniente priorizó la sensibilidad. Primero se realizaron pruebas de análisis de testigos de PIRs preparados en n-hexano usando dos sistemas cromatógraficos: HPLC-UV y GC-ECD. Los resultados obtenidos condujeron

a seleccionar el método por GC-ECD por tratarse del método con mayor sensibilidad, hasta 10 veces mayor con respecto a HPLC-UV (datos no mostrados).

El método analítico fue validado previamente, y se aplicó a los estudios de distribución y dosimetría en los tejidos de interés: PIRs individuales y una mezcla cuaternaria de PIRs. Para la validación del método se determinó linealidad, recuperación, límites de detección (LDD) y cuantificación (LDC), exactitud, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), y se realizaron pruebas de estabilidad de acuerdo a Kim y col. (2006), Niewiadowska y Kiljanek, (2010) y Pang y col. (2006). Durante todo el proceso de validación se usaron muestras de SG, HG y CE de ratas (que no recibieron tratamiento) del mismo sexo (machos), edad y rango de peso y provenientes de la misma colonia que los utilizados en los estudios dosis-efecto incluidos en este trabajo.

A continuación se describen los procesos de extracción, limpieza del extracto (*clean-up*) y condiciones cromatográficas.

5.4.1 Extracción de PIRs

Se determinó la concentración de PIRs en muestras de SG (~2 mL), HG y CE (~250 – 300 mg). El procedimiento para extraer los PIRs de los tejidos fue similar al reportado por Scollon y col. (2011), con una modificación en el protocolo de homogenización. A una porción de tejido húmedo (HG, CE o SG), pesado exactamente y trozado, fue homogeneizado con cantidad suficiente de Na_2SO_4 (anh.) ~1 g, hasta obtener un polvo fino. Se adicionó 1 mL de solución salina (NaCl al 0,9%) a fin de favorecer el *salting out* y facilitar la extracción.

Los PIRs presentes en el homogenato se extrajeron con 5 mL de una mezcla n-hexano: acetona (80:20). La muestra fue agitada intensamente durante 1 min, luego se llevó al agitador rotatorio por 15 min y finalmente se centrifugó a 7000 rpm durante 15 min. La fase orgánica se separó y el procedimiento se repitió una vez más. A las fracciones orgánicas combinadas se les agregó 5 µL del estándar interno Clorpirifos (100 ng/mL). El extracto se evaporó bajo corriente de N_2 a T_{amb} y finalmente se reconstituyó con 1 mL de n-hexano.

5.4.2 Limpieza de extracto (clean-up) por Extracción en Fase Sólida (SPE)

El proceso de extracción en fase sólida se realizó en un dispositivo Visiprep con colector de vacío. Un volumen de 1 mL del extracto orgánico, proveniente de la extracción líquido-líquido, fue cargado en una columna SPE de sílica de fase normal, la cual fue pre-acondicionada con 5 mL de n-hexano. Cada extracto fue lavado con 5 mL de n-hexano, y luego los PIRs fueron eluídos con 5 mL de una mezcla hexano:AcOEt (94:6). El extracto obtenido se evaporó bajo corriente de N_2 a T_{amb}, y finalmente se reconstituyó con 200 µL de n-hexano. Una fracción del extracto se colocó en un microvial, para ser finalmente analizada en el sistema GC-ECD.

5.5 Condiciones cromatográficas

El extracto reconstituido en n-hexano se analizó por GC-ECD utilizando las dos columnas cromatográficas (ver especificaciones en la sección 1.4). El programa de temperatura utilizado para el análisis de PIRs incluyó un rango de temperatura del horno de 80 ºC hasta 280 ºC según se indica en la Tabla 7. El inyector y el detector fueron operados a 270 °C y 300 ºC, respectivamente. Se empleó N_2 como gas carrier a una velocidad lineal de 1,4 mL/min. El volumen inyectado bajo el modo splitless fue de 2 µL. También se observan los valores de la rampa o niveles de temperatura empleada en el horno y las demás condiciones cromatográficas específicas. Se realizaron ensayos preliminares para verificar que las condiciones de análisis y no afectaran la estabilidad de los PIRs.

Tabla 7. Condiciones cromatográficas empleadas en el estudio de PIRs.

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS	
Temperatura de los Inyectores A y B)	270 °C
Presión de N_2 en los los inyectores	7,52 psi
Temperatura de los Detectores A y B	300 °C
Velocidad de flujo de N_2 en la columna	1,4 mL/min
Rampa de temperatura	Nivel 1 80 ºC por 1 min Nivel 2 30 ºC/min hasta 190 ºC Nivel3 3,6 ºC/min hasta 280 ºC por 20 min
Tiempo total de corrida	50 Min

5.6 Validación del método analítico

El criterio para seleccionar los parámetros de validación del método analítico utilizado en este trabajo de tesis doctoral siguió las recomedaciones de la FDA (1998, 1994) para Cromatografía Gaseosa (GC) y los establecidos para los métodos bioanalíticos (FDA, 2001), como se describe a continuación.

5.6.1 Selectividad

La selectividad del método analítico tiene como fin comprobar la ausencia de sustancias que eluyan al mismo tiempo de retención (t_r) que los analitos a investigar (PIRs y EI), que pueden interferir con el protocolo de identificación y con su posterior cuantificación. Por ello se analizaron todas las fuentes potenciales de interferencias, tales como: pureza del gas carrier, calidad de los solventes y las matrices biológicas (SG, HG y CE). Durante la evaluación de selectividad se procesaron 10 muestras de cada tejido enriquecidas con 50 μL de una solución 100 ng/g de EI y 10 muestras de tejidos enriquecidas con 100 μL de una solución 100 ng/g de PIRs (TEF, BIF, α-CPM y DTM). Cada determinación contó con la preparación del blanco de muestra (extracto de tejido sin analito ni EI) y con blanco de solvente (n-hexano).

5.6.2 Linealidad e intervalo de trabajo

Luego de comprobar la ausencia de picos interferentes en los cromatogramas (con iguales t_r que las sustancias de interés a investigar), se evaluó la relación entre la concentración del analito y la respuesta del detector. Para ello se prepararon soluciones con los 4 PIRs (TEF, BIF, α-CPM y DTM) disueltos en n-hexano. Se emplearon 6 puntos o niveles de concentración, cubriendo el rango 2,5 - 100 ng/mL. Por cada nivel de concentración se prepararon 3 réplicas experimentales y 3 réplicas instrumentales (inyecciones). Se estableció el modelo lineal de ajuste por cuadrados mínimos a través de la ecuación $y = mx + b$. Se evaluó el coeficiente de correlación lineal entre la concentración y el área del pico, para cada uno de los PIRs, a fin de asegurar la existencia de un aumento de la respuesta cromatográfica con el aumento de la concentración y poder establecer el rango de trabajo.

Las 6 concentraciones usadas para evaluar la respuesta lineal se emplearon para realizar la curva de calibración. Todos los PIRs fueron cuantificados usando la curva de calibración.

5.6.3 Recuperación

La estimación de la recuperación se realizó para evaluar la eficiencia del método de extracción. El porcentaje de recuperación de los PIRs fue calculado para los 3 tejidos estudiados. Se seleccionaron 3 niveles de concentración dentro del intervalo de trabajo: nivel bajo (5 ng/mL), nivel medio (50 ng/mL) y nivel alto (100 ng/mL).

El proceso se inició con el agregado de 50 μL de la solución patrón de PIR a cada homogenato del tejido y 50 μL del estándar interno (EI). Luego de 30 min, tiempo necesario para que los analitos se absorban en el tejido (verificado mediante pruebas previas), se realizó la extracción. Posteriormente se realizó el clean-up (ver secciones 2.3.1 y 2.3.2). Los mismos procedimientos se usaron para los 3 niveles seleccionados. Para cada uno de los tejidos se prepararon 3 muestras blancos sin adición del PIR (blanco de reactivo) y por cada nivel de concentración se procesaron 3 muestras experimentales con 3 repeticiones instrumentales para cada una.

Las áreas cromatográficas de los picos de los PIRs obtenidos se utilizaron para calcular la concentración mediante la ecuación de la curva de calibración.

La recuperación de cada uno de los PIRs se calculó a partir de la ecuación 1:

$$\%\ \text{Recuperación PIR} = \frac{\text{C muestra fortificada} - \text{C muestra no fortificada}}{\text{C agregada}} \times 100\% \qquad (1)$$

Donde C es la concentración.

5.6.4 Límites de Detección (LDD) y Límites de Cuantificación (LDC)

A través del cálculo de los límites de detección y de cuantificación de los analitos fue posible determinar los niveles mínimos a los que éstos pueden identificarse y cuantificarse en las matrices biológicas de interés (SG, HG y CE) por el método

cromatográfico GC-ECD seleccionado. El LDD se calculó usando 10 muestras de homogenato de cada tejido, provenientes de animales no tratados (mismas características biológicas que los de los ensayos tiempo-dosis-efecto). Estas muestras fueron enriquecidas con 50 μL de la solución patrón de PIR en las concentraciones más bajas (0,25 y 1 ng/mL) y 50 μL de EI. Luego de extraer los analitos de interés, los extractos purificados se inyectaron por triplicado en el cromatógrafo. El LDD se calculó en el punto más bajo de la curva de calibración, aplicando el criterio de 3 desvíos estándar (DS) de la concentración mínima detectable, y el LDC aplicando 10 DS al valor de la desviación estándar (DS) de la concentración mínima observable (FDA, 1998).

5.6.5 Precisión

La precisión permite apreciar la proximidad de los valores de los datos para una serie de mediciones realizadas bajo las mismas condiciones analíticas. Según la FDA, (1994) la precisión tiene 3 componentes: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. En este trabajo se tomaron 2 componentes: repetibilidad y precisión intermedia, ya que no fue posible realizar la verificación inter-laboratorios (reproducibilidad).

5.6.5.1 Repetibilidad – Precisión intra-ensayo

Para establecer la repetibilidad de las determinaciones cromatográficas de los analitos presentes en cada matriz biológica examinada, se evaluaron 3 niveles de concentración: bajo (5 ng/mL), medio (50 ng/mL) y alto (100 ng/mL). Para ello se agregaron 50 μL de las soluciones de PIRs más el EI a cada uno los tres tejidos (SG, HG y CE) a fin de obtener las concentraciones previstas. Luego de realizar el proceso de extracción de PIRs y el clean-up, los extractos correspondientes se inyectaron en el cromatógrafo. Las concentraciones se calcularon por interpolación en la curva de calibración. El procedimiento se realizó durante 3 días consecutivos, procesando una concentración por día. Se usaron 3 repeticiones experimentales y 5 instrumentales para cada nivel.

Se tomó como criterio de reproducibilidad lo indicado por la FDA (1994), que señala que el análisis de múltiples muestras de igual concentración se realiza por el

mismo analista o experimentador, bajo las mismas condiciones experimentales y analíticas.

5.6.5.2 Precisión intermedia – Precisión inter-ensayo

La precisión intermedia está asociada a la robustez de método analítico. Este parámetro busca evaluar que tan fiable es el método cuando se modifican algunas condiciones, tales como: analista, días de testeado, concentraciones del analito e incluso instrumentos (FDA, 1994). En función de los recursos disponibles, se decidió evaluar la precisión intermedia del método aplicando variaciones en los parámetros "días y concentración de analito". De esta manera, a cada muestra de los tejidos se le adicionó 50 μL de la solución de PIRs usando 3 niveles de concentración incluidos en el intervalo de trabajo: 2, 40 y 100 ng/mL, más el EI. Los extractos procesados, de acuerdo al método de extracción y clean-up ya explicado, se procesaron durante 5 días consecutivos y cada día se analizaron los 3 niveles de concentración con 3 réplicas instrumentales en cada caso.

5.6.6 Estabilidad

Se estudió la estabilidad de los PIRs en el extracto de cada tejido estudiado usando 3 niveles de concentración: 10, 50 y 100 ng/mL. A cada muestra se le agregó 50 μL de la solución patrón de cada nivel más el EI. Todos los extractos de las muestras se inyectaron en el cromatógrafo por triplicado. Se analizó una alícuota de cada muestra preparada en el día, otra mantenida durante 48 h a T_{amb}, y una tercera luego de ser almacenada durante 30 días en el freezer (-18 °C). Para cada ciclo de evaluación de estabilidad se contó con un extracto de testigo.

Los valores de las concentraciones calculadas para las 3 muestras, que contenían la mezcla de PIRs+EI de concentración conocida (10, 50 y 100 ng/mL), se compararon con la concentración media de los analitos presentes en el extracto del tejido testigo obtenido el mismo día de la validación.

5.7 Determinación de la concentración de PIRs en tejidos

Al finalizar el monitoreo de Tsc se realizó el sacrificio de los animales y la extracción de tejidos siguiendo el mismo protocolo tanto en los estudios de

administración simple de PIRs como en el estudio de mezclas (coadministración simultánea de los 4 PIRs). De igual manera, los resultados obtenidos en la validación del método analítico se emplearon para determinar la concentración de los PIRs en los tejidos individuales utilizando las mismas condiciones de extracción, de análisis y cuantificación. Aquellos tejidos cuya concentración de PIRs fue menor al LDC se excluyeron del análisis estadístico.

5.8 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Statistica (TIBCO Software Inc. Versión 13.3). Se aplicó ANOVA de medidas repetidas y de contraste *post-hoc* (Tukey Unequal N HSD) en los ensayos de dosis-efecto. En los casos de no cumplir con los supuestos de normalidad se usó el test ANOVA de Friedman y se aplicaron pruebas no paramétricas como Kruskal Wallis y test de Wilcoxon. La relación entre dosis administrada y concentración en tejido se evaluó aplicando pruebas de regresión lineal simple. El test de Spearman se aplicó para establecer la correlación entre la concentración de PIRs en tejidos (HG y CE) respecto de SG. Un valor de $p < 0,05$ fue establecido como criterio de significancia estadística. Los gráficos se realizaron en Origin (vesión 8.0) y SigmaPlot (versión 14).

5.9 Comparación entre los resultados de los estudios de administración simple *vs* mezcla. Prueba de la hipótesis de aditividad de dosis.

Existe un modelo de ajuste no lineal (*Non-Linear Threshold Additivity Model)* aplicable al caso de estudios de los efectos de mezclas de dosis bajas (Casey y col., 2004; Yeatts y col., 2010) que permite comparar curvas dosis-respuesta basándose en algoritmos matemáticos validados y metodologías estadísticas. Ese modelo fue aplicado para evaluar estadísticamente la hipótesis de concordancia entre una curva predictiva teórica y la curva experimental para varias clases de xenobióticos, incluyendo una mezcla de PIRs (Wolansky y col., 2009). Dado que en nuestro diseño experimental, la cantidad de dosis examinadas y la variabilidad intra- e inter-grupo para punto final seleccionado no eran adecuadas para aplicar esa metodología matemática-estadística, tomamos como aproximación exploratoria la comparación de las curvas (teórica y experimental) ajustadas con modelos que tienen menos requerimientos matemáticos.

5.9.1 Cálculo de las potencias relativas y equivalentes de TEF en función de la BMD_{30}

A fin de estimar la equivalencia de la capacidad tóxica total de cada una de las 3 dosis de la mezcla en términos de la relación dosis-respuesta para el IQ TEF (o sea, estimar el nivel de mg/kg de equivalentes EQ_{TEF}) se aplicó el método de las Potencias Relativas (Dinse y Umbach 2013; USEPA 2003) (ver Glosario y sección 5.2.3.). Esto permitió expresar la dosis (mg/kg) de cada PIR como si fueran mg/kg de TEF y luego calcular los equivalentes totales de TEF (EQ_{TEF}) en la mezcla. Así las dosis de la mezcla (D1, D2 y D3) se expresaron como EQ_{TEF} aplicando la ecuación 2:

$$EQ_{TEF} = \sum \lceil PIR_i \rceil * PR_i \quad (2)$$

Donde:
EQ_{TEF}: Equivalentes de TEF en mg/kg
$\lceil PIR_i \rceil$: Concentración en mg/kg de PIR en la mezcla
PR: Potencia Relativa

De todo el período de monitoreo de Tsc se seleccionó un tiempo representativo del pico máximo de impacto de todos los PIRs sobre la medida de efecto. En vista de los resultados de los experimentos de exposición simple y combinada, se escogió t = 2 h. Para poder realizar la comparación de los efectos máximos sobre Tsc observados luego de la administración de la mezcla de PIRs con los de la administración simple del IQ (en este caso, TEF) se precisaba que para cada dosis de mezcla (D1, D2, D3) cada nivel de EQ_{TEF} sea uno de los valores de dosis administrada que hubiera sido examinado experimentalmente en el estudio dosis-respuesta de exposición simple al IQ. Como esto no era posible dado que los valores de las fracciones de BMD_{30} derivaban de estimaciones matemáticas, hacía falta ajustar la curva dosis-respuesta del PIR IQ (TEF) y luego interpolar en la función los valores de efecto sobre Tsc para los 3 valores de X correspondientes a cada dosis de mezcla expresada en EQ_{TEF} totales. De este modo se estimaron los 3 valores ΔTsc a partir de la curva dosis-respuesta del IQ TEF que correspondían a los 3 valores de EQ_{TEF} de la mezcla utilizando un ajuste polinomial. Cabe aclarar que para realizar el ajuste de los datos dosis-respuesta del IQ se estableció como concentración máxima 9 mg/kg ya que en la curva ajustada el valor de EQ_{TEF} correspondiente a la dosis de mezcla D3 (10,44 mg/kg) quedaba fuera del rango examinado en el estudio de exposición simple a TEF.

Los ΔTsc teóricos se obtuvieron aplicando la ecuación 3.

$$y = y0 + ae^{bx} \qquad (3)$$

Donde:

y = ΔTsc teórico a 2 h
y0 = ΔTsc cuando x = 0
x = Dosis administrada
b = Pendiente máxima de la curva

RESULTADOS

6. Validación del método analítico - Identificación y cuantificación de PIRs en tejidos

6.1. Parámetros de la validación

Como parte del proceso de validación se realizaron previamente pruebas empleando diversas técnicas cromatográficas, tales como GC-MS, HPLC-UV y GC-ECD, para determinar cuál era el método analítico más sensible para cuantificar PIRs en concentraciones a nivel de trazas. En esta fase inicial del trabajo se consideró que, en función de las características de los equipos y los protocolos de trabajo ensayados, con los métodos por GC-MS y HPLC-UV no se alcanzaba la sensibilidad requerida para detectar cambios de concentración de PIRs en los tejidos de interés y generar datos de dosis-efecto para el rango de dosis administrada de 0,5 a 5 mg/kg pc (Anadón y col., 2006, 1996; Edwards y col., 1986; Kim y col., 2008, 2006). En cambio, mediante el uso de GC-ECD fue posible detectar concentraciones bajas, hasta un orden de magnitud menor (datos no mostrados) que con los primeros métodos mencionados. Otros laboratorios utilizaron GC-MS-MS y HPLC-MS-MS para cuantificar concentraciones de PIRs entre 1-100 ng/mL en forma satisfactoria (Gammon y col., 2015; Hughes y col., 2016a, 2016b; Scollon y col., 2011; Starr y col., 2012, 2014), pero esos equipos no estuvieron disponibles para realizar este trabajo de tesis.

A continuación se consignan los resultados del proceso de validación de acuerdo a los criterios mencionados en la sección 5.6.

6.1.1 Selectividad/especificidad

El análisis individual por cromatografía GC-ECD de las soluciones puras de PIRs y del estándar interno (EI) preparadas en hexano, permitió determinar el orden de elución y tiempo de retención (t_r) de los analitos y confirmar la ausencia de sustancias interferentes, las cuales podrían ser aportadas por el solvente, el gas carrier o la fase estacionaria.

El análisis de la mezcla de analitos (PIRs + EI) en hexano y en la matriz biológica (SG, HG y CE) no mostró superposición de picos o señales que interfirieran con la identificación. Cada analito eluyó a un tiempo lo suficientemente distanciado de los otros (6 - 12 min) presentando una única señal, lo que facilitó su identificación y

cuantificación. Como medida de la intensidad de la respuesta del detector se tomó el área integrada de cada pico cromatográfico, y se calculó el t_r relativo usando el EI (t_r PIR / t_r EI).

La Fig. 14 incluye algunos de los cromatogramas obtenidos en el proceso de validación. En esta figura se muestran los correspondientes a la mezcla de patrones o analitos puros (PIRs + EI) en hexano (panel A), extractos de tejidos sin analitos + EI (paneles B, D y F), y extracto de tejidos enriquecidos con la mezcla de analitos + EI (paneles C, E y G). En ellos puede apreciarse la diferencia de la respuesta del detector en ausencia o presencia de los analitos, y la variación del perfil del cromatograma de acuerdo a la matriz analizada. Además se observa que los picos asociados a los analitos están suficientemente separados entre sí, aun cuando se encuentran en matrices complejas como es el caso de SG, HG y CE. El primer PIR en eluir fue TEF (~10 min) y el último el DTM (~37 min). El tiempo total de corrida fue de 50 min garantizándose la elución total de los PIRs y de cualquier otra sustancia que estuviera presente en los extractos. La Tabla 8 muestra el orden de elución y t_r relativo de los analitos en hexano y en la matriz biológica.

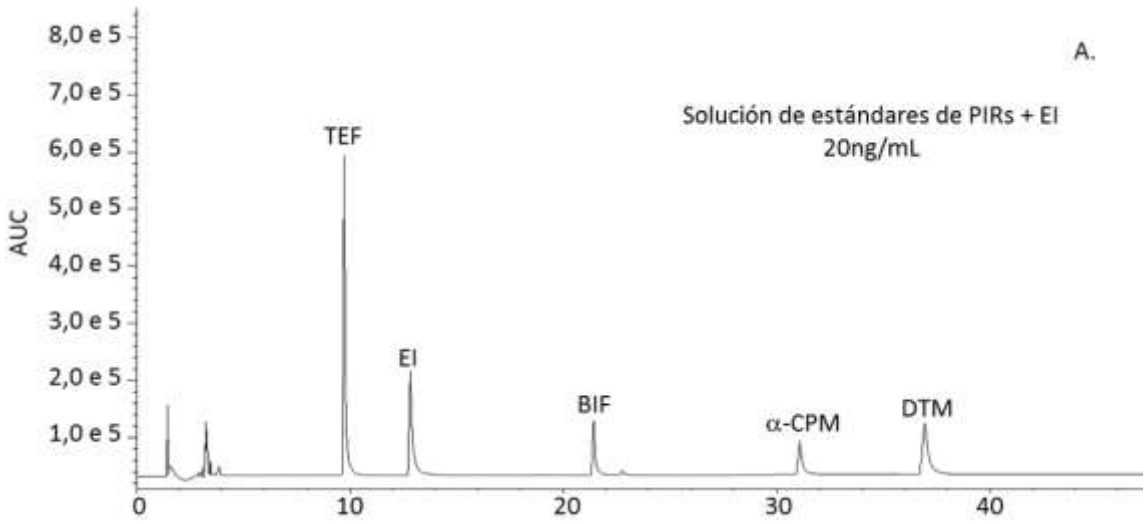


Figura 14. Cromatogramas de los PIRs presentes en las matrices biológicas estudiadas. Se muestran los cromatogramas de la mezcla de estándares de los analitos puros en hexano (PIRs + EI) (A), extractos de tejidos sin analito de Sangre (B), Hígado (D) y Cerebelo (F), y extractos de tejidos cargados con la mezcla de PIRs+EI (C, E y G). Los picos cromatográficos se expresan como unidades de área del pico (AUC) en función del tiempo de retención (min).

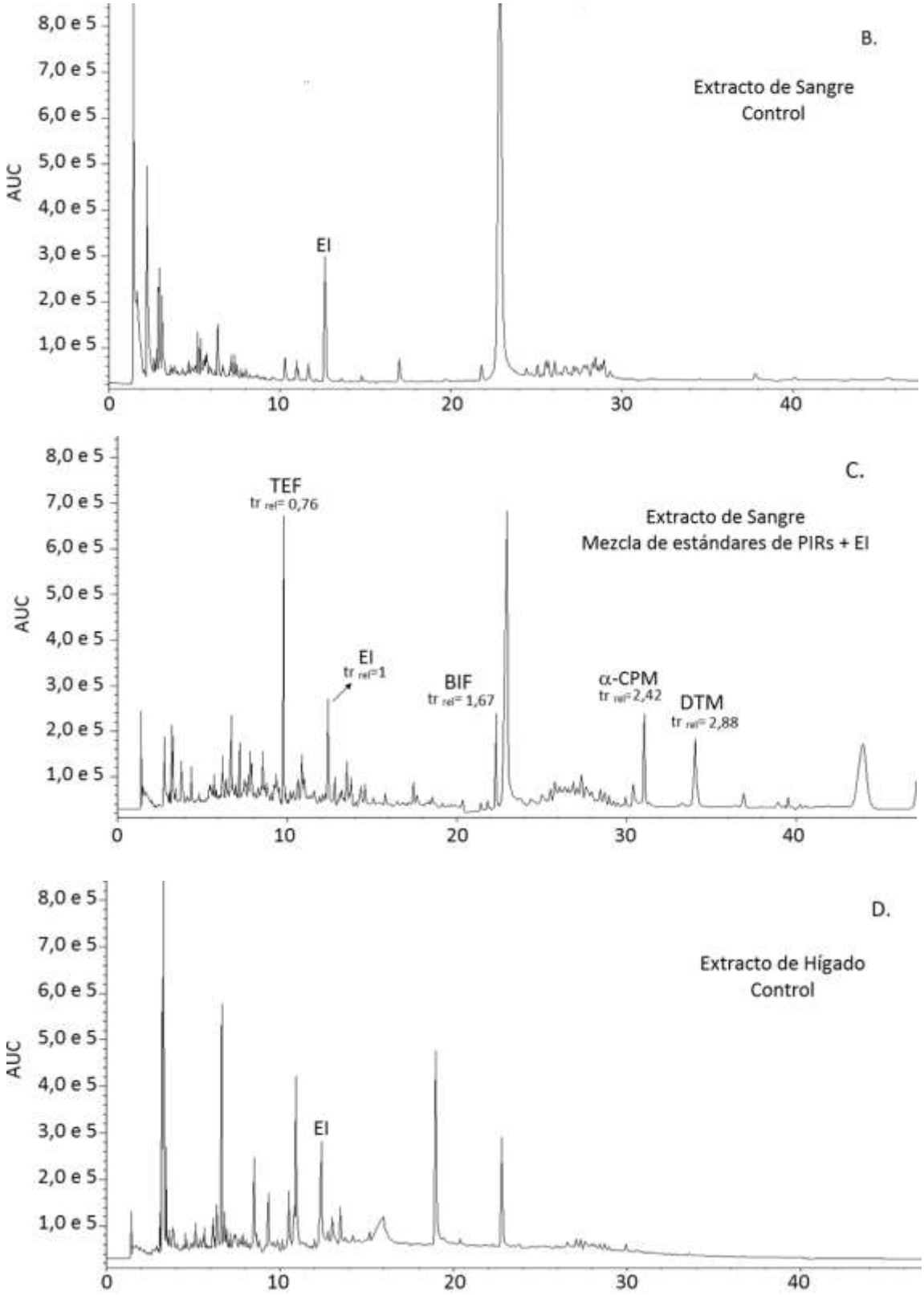


Figura 14. Continuación. Cromatogramas de los PIRs presentes en las matrices biológicas estudiadas.

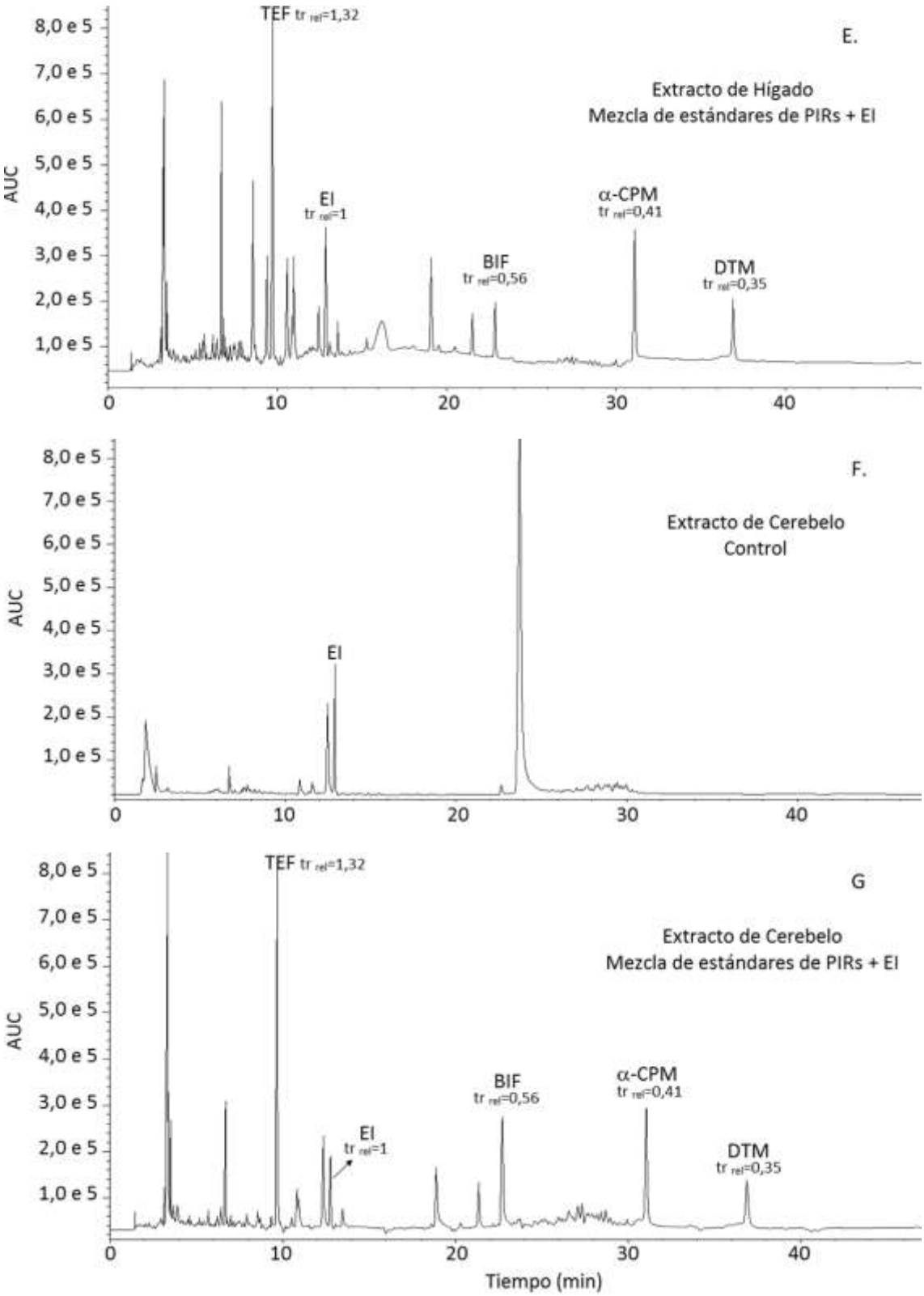


Figura 14. Continuación. Cromatogramas de los PIRs presentes en las matrices biológicas estudiadas.

Tabla 8. Orden de elución y tiempos de retención absoluto y relativo de los PIRs y EI. Determinación del orden de elución y t_r absoluto y relativo de los analitos (TEF, BIF, α-CPM y DMT) y EI (CLORP) en hexano. El t_r relativo corresponde a la relación del t_r del analito sobre t_r del EI en min.

Oden de elución de PIRs	t_r absoluto min± DS	t_r relativo min
TEF	9,73 ± 0,01	0,758
CLORP	12,84 ± 0,01	1,000
BIF	21,44 ± 0,01	1,670
α-CPM	31,13 ± 0,02	2,424
DTM	37,00 ± 0,03	2,882

6.1.2 Linealidad

El cálculo de respuesta lineal del detector se realizó a partir de la elaboración de una curva de calibración usando seis puntos de concentración de los analitos puros (PIRs + EI) preparados en hexano. Se cubrió un rango entre 2,5 - 100 ng/mL para los insecticidas estudiados (Fig. 15). La ecuación de la recta de calibración se obtuvo al aplicar la prueba de regresión lineal simple, obteniéndose en todos los casos valores de $R^2 > 0{,}99$. Lo anterior también fue confirmado aplicando el análisis estadístico *t*-Student ($t_{cal} < t_{crit}$, df = 20, $p \leq 0{,}01$). Todo ello indica una muy buena correlación entre las diferentes concentraciones de los PIRs y la respuesta del detector, lo cual permite realizar la cuantificación de los analitos en las matrices biológicas estudiadas.

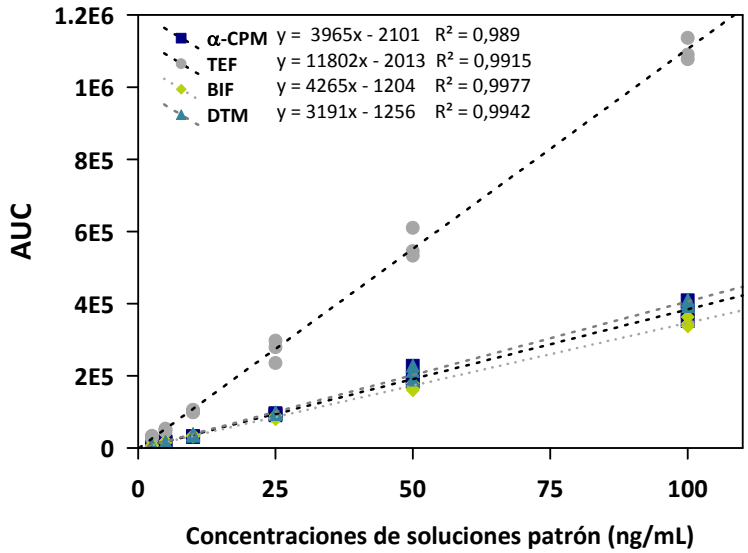


Figura 15. Curva de calibración para los PIRs examinados. Las concentraciones estuvieron comprendidas entre 2,5 – 100 ng/mL para TEF, BIF, α-CPM y DTM (N = 18).

6.1.3 Recuperación

Se obtuvieron altos porcentajes de recuperación de PIRs en los tres tejidos estudiados (80% - 107%). El valor más bajo se obtuvo en SG para la concentración 5 ng/mL (80 - 91%), mientras que en CE la recuperación fue **>** 90% para todos los PIRs en los tres niveles de concentración evaluados. El análisis estadístico t-Student no mostró diferencias entre la concentración teórica y la experimental (p > 0,05). Los valores registrados en la Tabla 9 confirman la aceptabilidad del método de extracción y de cuantificación.

Tabla 9. Recuperación. Porcentaje de recuperación y coeficiente de variación (%CV) Para PIR (α-CPM, BIF, DTM y TEF) en SG, HG y CE. Se tomó como criterio de aceptación el valor de porcentaje de recuperación entre 80 - 110%, CV ≤ 15% (FDA, 2001). Los resultados se expresan como la media del porcentaje de recuperación y su desvío estándar ($\overline{X}$±DS) para N = 9 (tres réplicas experimentales y tres réplicas instrumentales).

	Recuperación de PIRs en tejidos por nivel de concentración (%)					
	SANGRE					
	Conc Baja	**%CV**	**Conc Media**	**%CV**	**Conc Alta**	**%CV**
α-CPM	86 ± 3	14,2	95 ± 5	9,1	99 ± 10	3,4
BIF	80 ± 3	3,4	98 ± 2	4,2	94 ± 6	6,6
DTM	80 ± 7	11,6	91 ± 2	8,9	97 ± 4	10,2
TEF	92 ± 3	3,0	97 ± 2	5,1	100 ± 1	4,2
	HIGADO					
	Conc Baja	**%CV**	**Conc Media**	**%CV**	**Conc Alta**	**%CV**
α-CPM	90 ± 3	11,5	86 ± 8	9,0	101 ± 7	3,6
BIF	91 ± 3	8,5	85 ± 4	7,8	80 ± 5	2,6
DTM	90 ± 3	4,9	89 ± 8	8,9	94 ± 3	7,0
TEF	97 ± 4	6,1	92 ± 5	10,7	95 ± 4	4,4
	CEREBELO					
	Conc Baja	**%CV**	**Conc Media**	**%CV**	**Conc Alta**	**%CV**
α-CPM	90 ± 11	12,4	105 ± 8	4,2	104 ± 7	1,4
BIF	90 ± 3	3,1	107 ± 3	3,9	97 ± 6	2,2
DTM	99 ± 5	6.0	101 ± 12	4,9	97 ± 5	5,1
TEF	90 ± 6	9,5	100 ± 2	2,1	101 ± 2	4,7

6.1.4 Límite de detección (LDD) y límite de cuantificación (LDC)

Los LDD y LDC obtenidos para los 4 PIRs fueron bajos (1,7 – 5,5 ng/mL; ng/g). Los resultados para cada PIR se presentan en la tabla 10.

Tabla 10. LDD y LDC. Los resultados se expresan en ng/g de tejido o ng/ml de sangre como la media del LDD y LDC a partir de diez replicas experimentales y tres replicas instrumentales y su correspondiente coeficiente de variación, N = 30.

Analitos	LDD ng/g; ng/mL	LDC ng/g; ng/mL
α-CPM	1,7	6
BIF	1,4	5
DTM	1,6	5
TEF	1,1	4

6.1.5 Precisión

Los resultados de la determinación de precisión se expresaron en función de la repetibilidad (intra-ensayo) y de la precisión intermedia (inter-ensayo) (FDA, 1998). Como resultado se obtuvo un coeficiente de variación para la repetibilidad ≤ 8,1% y para la precisión intermedia ≤ 12,8%, por lo tanto, el método analítico cumplió con los requisitos de precisión.

Los resultados permitieron afirmar que la determinación de la concentración de PIRs, presentes de manera individual y en mezclas en las matrices analizadas, presentó mediciones cercanas entre sí y por lo tanto fueron precisas. En la Tabla 11 se observa la variación de la concentración de PIRs en tejidos, en los tres niveles de concentración, que se encontraron dentro del rango de trabajo.

Tabla 11. Precisión intra-ensayo e inter-ensayo. Los resultados se expresan como la media del coeficiente de variación (%) para cada PIR con un N = 9.

	Precisión Intra-ensayo / Repetibilidad (%CV)			Precisión inter-ensayo (%CV)		
Analito	Bajo 5 ng/mL	Medio 50 ng/mL	Alto 100 ng/mL	Bajo 2 ng/mL	Medio 40 ng/mL	Alto 100 ng/mL
α-CPM	6,9	3,3	4,7	3,1	6,5	2,8
BIF	8,1	7,4	2,6	7,3	4,0	3,4
DTM	5,9	4,1	2,8	12,8	6,6	3,3
TEF	2,2	2,5	3,0	1,7	5,7	3,5

6.1.6 Estabilidad

Los resultados de estabilidad confirmaron que los analitos (PIRs) fueron estables a través del tiempo, aun cuando se sometieron a diferentes condiciones ambientales de almacenamiento, tales como bajas temperaturas a -18 °C, o por conservación a T_{amb} hasta 48 h después de preparar el extracto. Esta prueba buscó emular situaciones que pueden presentarse durante el proceso de análisis. Los resultados se expresaron en función del porcentaje de la concentración media calculada de cada analito (PIRs + EI) presente en el extracto del tejido. Se estableció como criterio de aceptación una estabilidad entre 75 - 100% para los 3 ciclos de temperatura y almacenamiento evaluados. Los menores porcentajes se obtuvieron para TEF y α-CPM para la concentración más baja evaluada (10 ng/mL) durante el ciclo 3. Para los 3 tejidos estudiados la estabilidad de los PIRs en las condiciones mencionadas estuvo entre 74 - 102%.

7. Relación entre dosis administrada, dosis interna, dosis en tejidos y efecto para cada PIR evaluado separadamente

Estos estudios de PIRs individuales se presentan en dos secciones: la primera corresponde a los resultados obtenidos para PIRs sin grupo ciano (BIF y TEF) y la segunda para ciano PIRs (α-CPM, DTM).

7.1. Piretroides sin grupo ciano (perfil toxicológico similar a Tipo I)

7.1.1. Relación entre dosis la oral y las perturbaciones en la Tsc

La administración de las dosis más altas de BIF y TEF provocó signos de neurotoxicidad. Los animales manifestaron inquietud moderada poco después de la administración e incremento de la Tsc entre los 60 y 90 min. Los signos de intoxicación fueron más evidentes cuando la dosis administrada fue ≥ 6 mg/kg en el caso de TEF y ≥ 9 mg/kg para BIF. Los animales tratados con dosis entre 0,1 y 6 mg/kg TEF mostraron una débil tendencia en la aparición de la sintomatología típica de los efectos locomotores y no locomotores reportados para no-ciano PIRs en ratas adultas (Soderlund y col., 2002; Wolansky y Harrill, 2008). Los animales tratados con dosis entre 6,75 a 9 mg/kg de TEF, mostraron moderados cambios en Tsc comparados con los valores de la línea de base. Los resultados específicos de variación de Tsc por administración de BIF y TEF se presentan a continuación.

7.1.1.1. Bifentrina

El tratamiento con BIF causó un aumento leve-moderado de Tsc a partir de 30-60 min luego de la administración de las dosis de 3 - 9 mg/kg. Las dosis de 9 - 12 mg/kg causaron hipertermia moderada a severa de duración prolongada (hasta 4,5 h post-tratamiento) llegando a incrementar la Tsc hasta 2 °C sobre la línea base (Fig. 16). Unos pocos animales tratados con estas dosis mostraron temblores que fueron visibles hasta el momento del sacrificio.

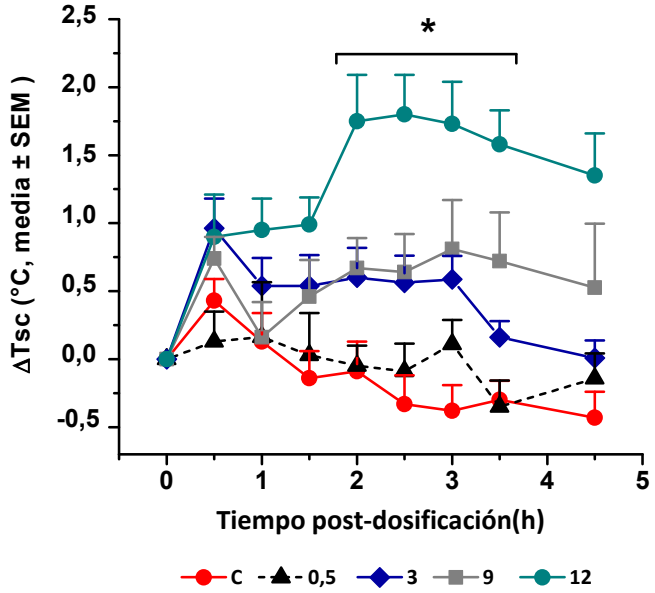


Figura 16. Relación dosis-respuesta de Bifentrina. Monitoreo de Tsc luego de la administración de BIF (0,5 a 12 mg/kg). Las curvas representan ΔTsc (T_{ti}-T_{to}) en función del tiempo (h), desde ~30 min antes del tratamiento (t_0) hasta 4,5 h. Los resultados se expresan como la media de ΔTsc ($\overline{X}$±SEM). C=grupo control (vehículo).*indica el período donde se presentó el efecto máximo de BIF sobre Tsc respecto al grupo control.

El análisis estadístico para estudiar el efecto de BIF sobre ΔTsc se realizó aplicando pruebas no paramétricas. En primer lugar se realizó ANOVA de Friedman para todos los tiempos evaluados (0 - 4,5 h) obteniendo un valor de $p < 0{,}001$. El mismo análisis realizado para el periodo de máximo efecto (2 - 3,5 h) dio como resultado un valor de $p = 0{,}006$. Por lo anterior se confirma que existen diferencias en el efecto de acuerdo a la dosis administrada.

Para determinar la influencia de la dosis sobre el efecto, en cada uno de los tiempos en los cuales se midieron las Tsc, se aplicó la prueba de Kruskal–Wallis. Los resultados mostraron que el efecto de la dosis sobre la ΔTc medido a 0, 0,5, 1 y 1,5 h, no presentaron diferencias significativas ($p > 0{,}05$). Sin embargo, el efecto ΔTsc si varia significativamente de acuerdo a la dosis ($p < 0{,}05$) entre las 2 y 4,5 h. A modo de síntesis el efecto de BIF en función de la dosis administrada, muestra en la Fig. 17 la ΔTsc durante el periodo entre 3 - 3,5 h.

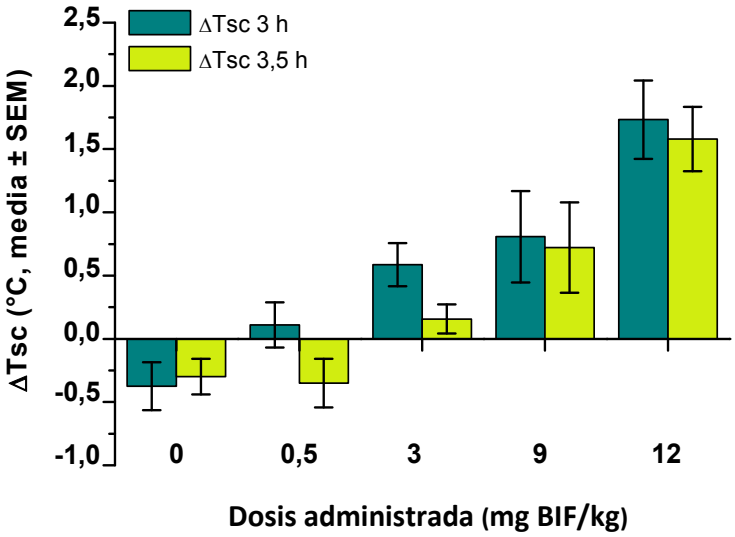


Figura 17. Relación dosis-respuesta de la ΔTsc durante el tiempo de máximo efecto luego de la administración de Bifentrina. Los resultados se expresaron como la media de ΔTsc ($\overline{X}$±SEM) para el periodo que presentó mayores diferencias significativas con respecto al grupo control (3 - 3,5 h).

El análisis por pares se hizo aplicando el test de Wilcoxon. Al comparar los valores de ΔTsc en el tiempo de máximo efecto entre las dosis administradas (pares), se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las dosis de 3, 9 y 12 mg/kg con el grupo control y 0,5 mg/kg. Para el tiempo de 3,5 h las diferencias significativas de las dosis más altas se presentaron también con la dosis de 3 mg/kg.

7.1.1.2. Teflutrina

El tratamiento con TEF causó un incremento de Tsc a partir de 6 mg/kg. El efecto fue más evidente al administrar dosis superiores a 6,75 mg/kg. En general, la alteración máxima de Tsc se presentó entre 1 - 1,5 h luego de administrar 3 - 7,5 mg/kg, observándose recuperación casi total de los valores basales (T_{to}) luego de 5 h. En los ensayos, un animal tratado con la dosis de 7,5 mg/kg se sacrificó una hora después de la administración debido a la severidad del cuadro tóxico que presentó, y cuyo progreso fue rápido. La dosis más alta examinada fue 9 mg/kg. Su selección se basó en un estudio previo realizado en condiciones de administración similares (Wolansky y col., 2006), el cual sugirió que los síndromes letales aparecían luego de administrar dosis > 9 mg/kg. En este trabajo de tesis, esta dosis causó toxicidad severa en la mayoría de los animales,

llegando a incrementar la temperatura basal hasta 2,5 °C, lo cual fue evidente 2 h después de la administración. Sólo en un animal del grupo (N = 7) no se observaron signos de intoxicación severa y fue posible registrar la variación de su Tsc durante todo el periodo del ensayo. Los otros 6 animales del grupo sólo pudieron monitorearse durante las primeras 2 h, ya que la severidad de los síntomas de intoxicación condujeron a decidir realizarles eutanasia antes de completarse el período de monitoreo de Tsc. Por lo antedicho, para realizar el análisis estadístico se consideraron todos los valores de ΔTsc obtenidos hasta t = 2 h a fin de establecer diferencias significativas dentro y entre los grupos de dosis en el período de máximo efecto (1 - 2 h) (Fig. 18).

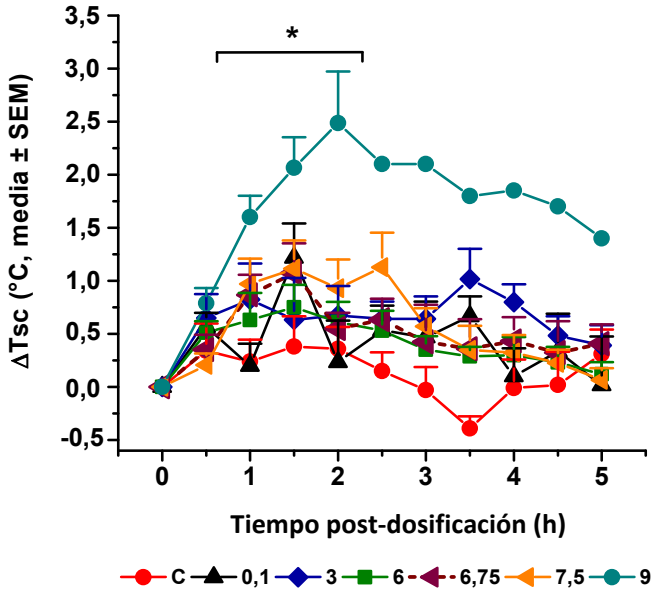


Figura 18. Relación dosis-respuesta de Teflutrina. Monitoreo de Tsc luego de la administración de TEF (0,1 a 9 mg/kg). Las curvas representan a ΔTsc (T_{ti}-T_{to}) en función del tiempo (h) desde ~30 min antes del tratamiento (t_0) hasta 5 h. Los resultados se expresan como la media de ΔTsc ($\overline{X}$±SEM). C=grupo control (vehículo).
* indica el período donde se presentó el efecto máximo de TEF sobre Tsc respecto al grupo control.

Nota: La dosis de 9 mg de TEF /kg muestra las barras de error estándar únicamente hasta las 2 h, debido a que un solo animal no presentó intoxicación severa y pudo completar el tiempo de monitoreo; los otros animales fueron sacrificados.

A través de ANOVA de Friedman se encontró que para todos los tiempos evaluados (0 - 5 h) existen diferencias significativas en el efecto ΔTsc en función de la dosis (p < 0,001). El análisis correspondiente para el periodo de máximo efecto (1 - 2 h)

dio como resultado un valor de p = 0,003 confirmando que el efecto es significativo respecto a la dosis administrada (Fig. 18).

Por otro lado, la determinación del periodo en el cual se produjo el máximo efecto hipertérmico se hizo aplicando el test de Kruskal-Wallis. Se observaron incrementos en los valores de ΔTsc a 1, 1,5 y 2 h, confirmando que hay diferencia significativas de ΔTsc de acuerdo a la dosis administrada y respecto al grupo control (p < 0,05) (Fig. 19).

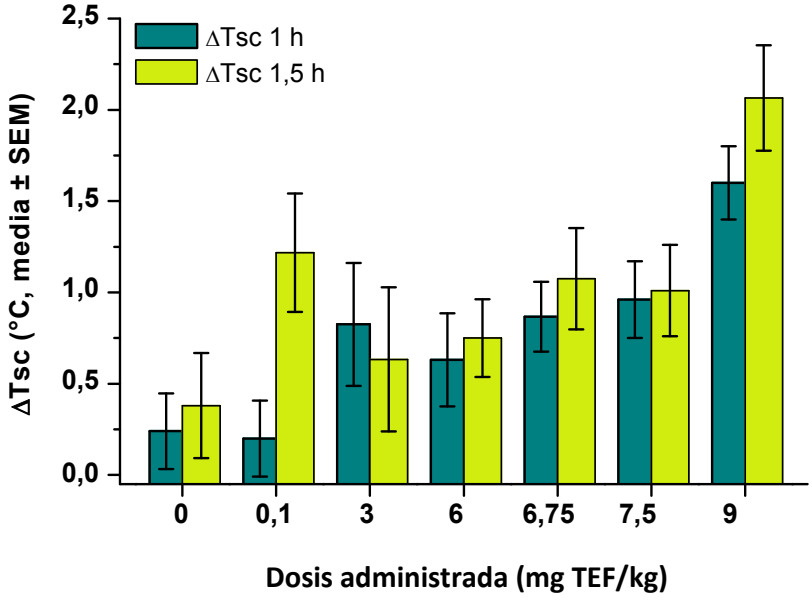


Figura 19. Relación dosis-respuesta de la ΔTsc durante el tiempo de máximo efecto luego de la administración de Teflutrina. Los resultados se expresan como la media de ΔTsc ($\overline{X}$±SEM) para el periodo que presentó mayores diferencias significativas respecto al control (1 - 1,5 h).

Nota: En el grupo administrado 0,1 mg/kg el aumento aparente observado en t = 1,5h pareció estar más relacionado a la inquietud de los animales a medida que los animales administrados con las dosis altas manifestaban signos de intoxicación severa que una acción especifica de TEF en el tejido. No existe ninguna evidencia previa que sugiera que una dosis de 0,1 mg/kg de TEF puede ser efectiva para modular mecanismos relacionados a la termorregulación ni afectar la actividad motora (Soderlund y col., 2002; Wolansky y col., 2006).

En la Fig. 19 se muestra la acción de TEF sobre ΔTsc en función de las dosis administradas dentro del periodo de máximo efecto, 1 y 1,5 h. Además, este análisis permite incluir en los contrastes estadísticos, el grupo de dosis 9 mg/kg, dado que en tiempos posteriores el N para este grupo fue igual a 1, debido al sacrificio ético de casi

todos los animales. El análisis de las diferencias entre los grupos experimentales se realizó a través de la prueba de Wilcoxon. Las comparaciones de las dosis por pares mostraron que a 1 h el grupo tratado con 9 mg/kg fue diferente de los grupos control, 6,75 y 7,5 mg/kg ($p \leq 0,05$), mientras que a 1,5 h se observaron diferencias significativas respecto al control y a los grupos administrados con las dosis 3 y 6 mg/kg ($p < 0,05$). En t = 2 h, cuando se observaron signos de intoxicación severa y los animales fueron sacrificados, el valor de ΔTsc en el grupo tratado con 9 mg/kg fue significativamente mayor respecto a todos los otros grupos experimentales ($p < 0,05$).

En el caso de BIF, para dosis **>** 3 mg/kg, al terminar el periodo de monitoreo se observó un aumento de Tsc en forma dependiente de la dosis. En el caso de TEF, para dosis **>** 0,1 mg/kg, los valores de ΔTsc habían retornado al rango de valores del grupo control entre 4 a 5 h luego de la administración. Finalmente, para la dosis más alta (9 mg/kg), la Tsc continuó siendo elevada incluso al terminar el monitoreo del único animal de ese grupo que no presentó signos persistentes de intoxicación severa.

En resumen, TEF y BIF causaron aumentos de Tsc en forma dependiente de la dosis administrada. En el caso de TEF, debido al incremento rápido de la severidad de la intoxicación a medida que se aumentaba la dosis administrada, solo se pudo completar el monitoreo dosis-respuesta dentro del intervalo 0,5 - 2,0 h. Los tiempos de máximo efecto fueron 1 - 2 h para TEF y 2 - 3,5 h para BIF. Para BIF y TEF, considerando los intervalos de tiempo de efecto máximo, el análisis visual de los datos sugiere que la dosis mínima efectiva para Tsc fue ~3 mg/kg y ~3 - 6 mg/kg, respectivamente (ver Figs. 16 - 17 y 18 - 19).

7.1.1.3. Observaciones clínicas por administración de Bifentrina y Teflutrina

Además de registrar la Tsc se realizaron observaciones de los signos clínicos de intoxicación presentados en los animales expuestos a BIF y TEF. La mayoría de los animales tratados con las dosis más altas presentaron signos de intoxicación incluyendo incremento de la movilidad (*restlessness*), rascado de hocico, cavado de viruta y otros signos característicos de la exposición a PIRs Tipo I (Wolansky y Harrill, 2008).

Para TEF, los animales tratados con 0,1 - 3 mg/kg mostraron cierta exacerbación de comportamientos estereotipados (rascado, lamido, olfateo, etc.) sin observarse cuadros de intoxicación severa. La recuperación de la condición fisiológica típica de los animales controles se logró a partir de los 90 min para la dosis de 0,1

mg/kg y tardó algo más de 2 h para la dosis de 3 mg/kg. Para las ratas tratadas con TEF ≥ 6 mg/kg se observaron signos de intoxicación prolongados en el tiempo con recuperación casi total luego de 4 h de iniciar el monitoreo de Tsc. El tratamiento con la dosis de 9 mg/kg causó los mismos signos pero con intensidad mucho mayor dentro de las 1,5 - 2 h, llegando a presentarse signos persistentes de intoxicación severa que cumplían las condiciones pre-establecidas de sacrificio ético. De este modo, dichos animales fueron sacrificados luego del registro de Tsc (t = 2 h), o sea antes de terminar el periodo de monitoreo.

7.1.2. Concentración en tejidos

7.1.2.1. Bifentrina

La Fig. 20 muestra algunos cromatogramas representativos del análisis de BIF en SG, para las dosis de 3 y 12 mg/kg (A y B respectivamente) y para HG (C). En el cromatograma del extracto de cada tejido, se observó que BIF eluye a un t_r rel de 1,67. Luego de integrar el área del pico cromatográfico, se calculó la concentración de BIF.

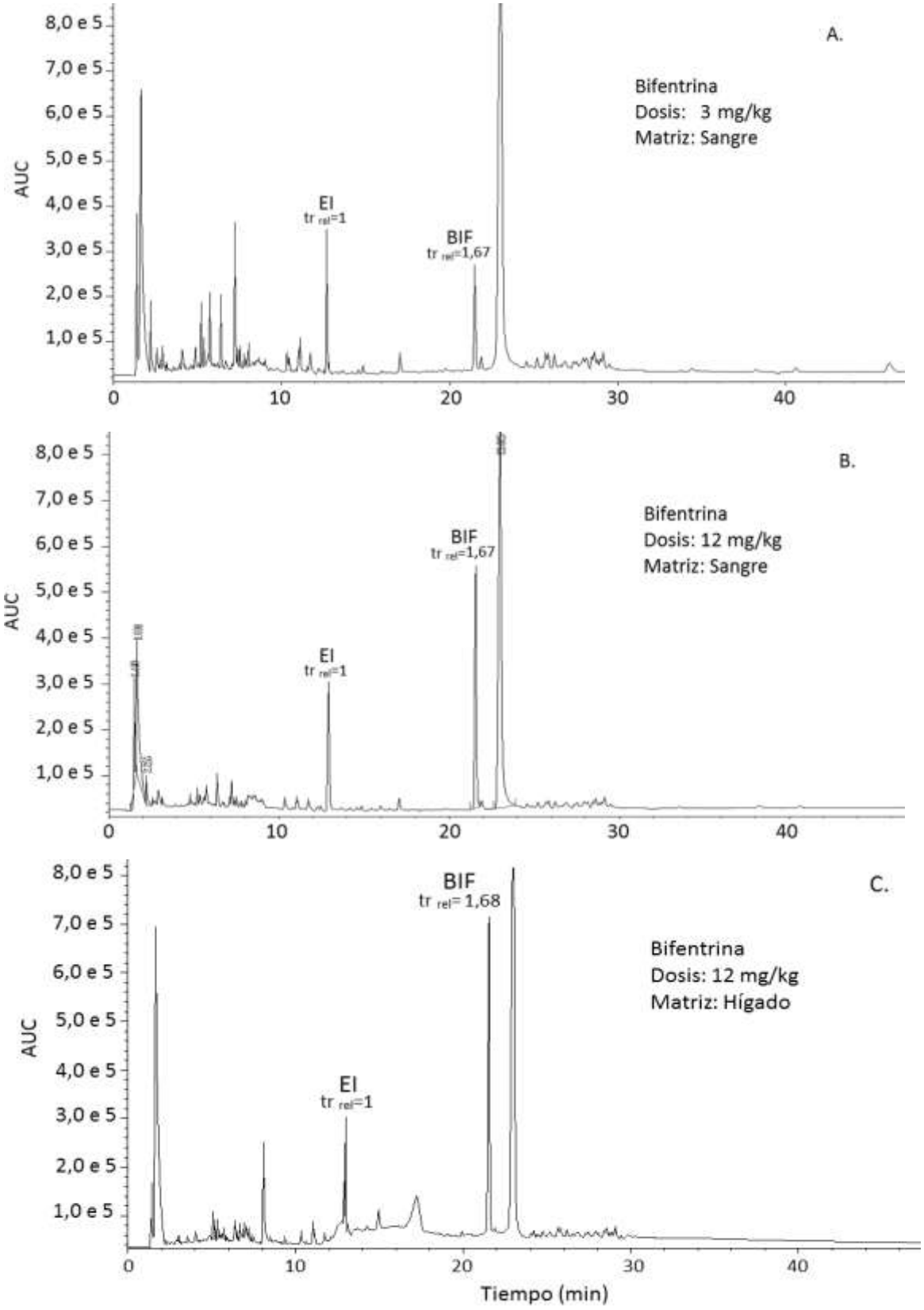


Figura 20. Cromatogramas obtenidos para la cuantificación de BIF en sangre e hígado luego de su administración por vía oral. Se muestran los cromatogramas correspondientes a los extractos de las dosis 3 y 12 mg/kg en SG (A y B) y 12 mg/kg en HG (C).

Los valores de las concentraciones obtenidas indican que la concentración de BIF en los tres tejidos fue dependiente de la dosis administrada. Para todas las dosis examinadas se encontró que el tejido con menor concentración de BIF fue SG, seguido de CE e HG. Las dosis administradas mostraron diferencias significativas en las concentraciones halladas de BIF en los tres tejidos (ANOVA de Kruskal-Wallis; $p < 0{,}001$). Por otro lado, el análisis estadístico determinó que existen diferencias significativas en la concentración de BIF entre los tres tejidos (Wilcoxon, $p \leq 0{,}05$).

Los resultados obtenidos para BIF fueron consistentes con lo reportado previamente por otros autores (Hughes y col., 2016a; Scollon y col., 2011), ya que para dosis, vehículo y tiempos post-administración similares a los usados en este trabajo, se encontró que la concentración en SG fue menor respecto a las de HG y CE. La Fig. 21 integra los resultados de BIF en los tejidos, observándose claramente que, para todos los tejidos, la concentración fue proporcional a la dosis administrada. Además, la relación entre dosis administrada de BIF e incremento de su concentración en tejidos fue mucho más marcada (con mayor pendiente positiva) para HG en comparación a CE y SG.

La concentración en HG en los animales administrados con dosis de 3, 9 y 12 mg/kg fue hasta cuatro veces mayor que la encontrada en SG y casi el doble que en CE (Fig. 21). Al evaluar el efecto del factor tejido sobre las diferencias en la concentración de BIF analizando cada dosis por separado en las dosis más bajas (0,5 y 3 mg/kg), se encontraron diferencias significativas en la concentración de HG y CE respecto a SG (Wilcoxon, $p < 0{,}05$), mientras que entre HG y CE no se presentó significancia estadistica (Wilcoxon, $p > 0{,}05$). En el caso de las dosis más altas (9 y 12 mg/kg) se observó que en HG si hubo diferencias significativas respecto a SG y CE, pero esto no ocurrió al comparar la concentración de BIF entre SG *vs* CE (Wilcoxon, $p > 0{,}05$).

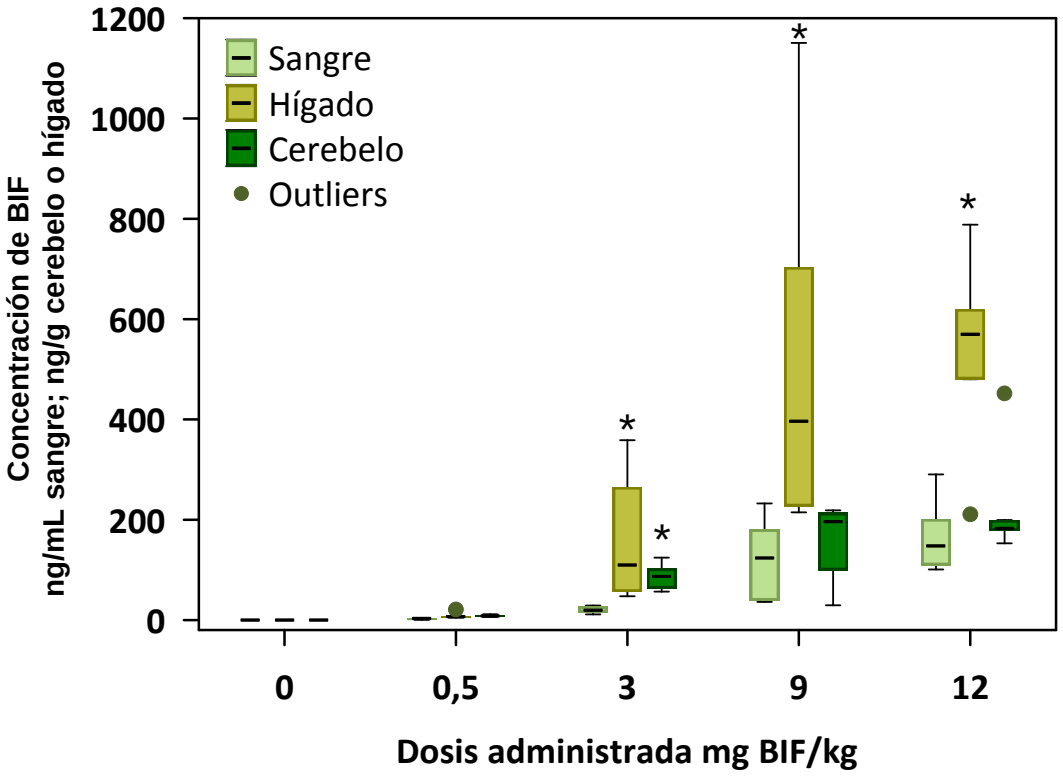


Figura 21. Relación entre la concentración en tejidos y la dosis administrada de Bifentrina. Se muestran los valores de la concentración de BIF entre el cuartil inferior, la mediana y el cuartil superior en ng BIF/g (hígado y cerebelo) y ng BIF/mL (sangre). Las significancia de las diferencias observadas entre los niveles de BIF en los tejidos para cada dosis se marcan con * (Wilcoxon, $p < 0,05$). N = 4, 8, 7 y 6 para las dosis de 0,5, 3, 9 y 12 mg/kg, respectivamente.

En la Fig. 22 se vuelven a graficar los datos de la Fig. 21 pero permitiendo una visualización mas clara de la influencia diferencial de la dosis administrada sobre los hallazgos de concentración de BIF en función del tejido examinado. Para los 3 tejidos se encontró que existen diferencias significativas en la concentración de BIF cuando se compara de a pares los grupos de dosis más altas (9 y 12 mg/kg) respecto a los grupos 0,5 y 3 mg/kg (Wilcoxon; $p < 0,05$).

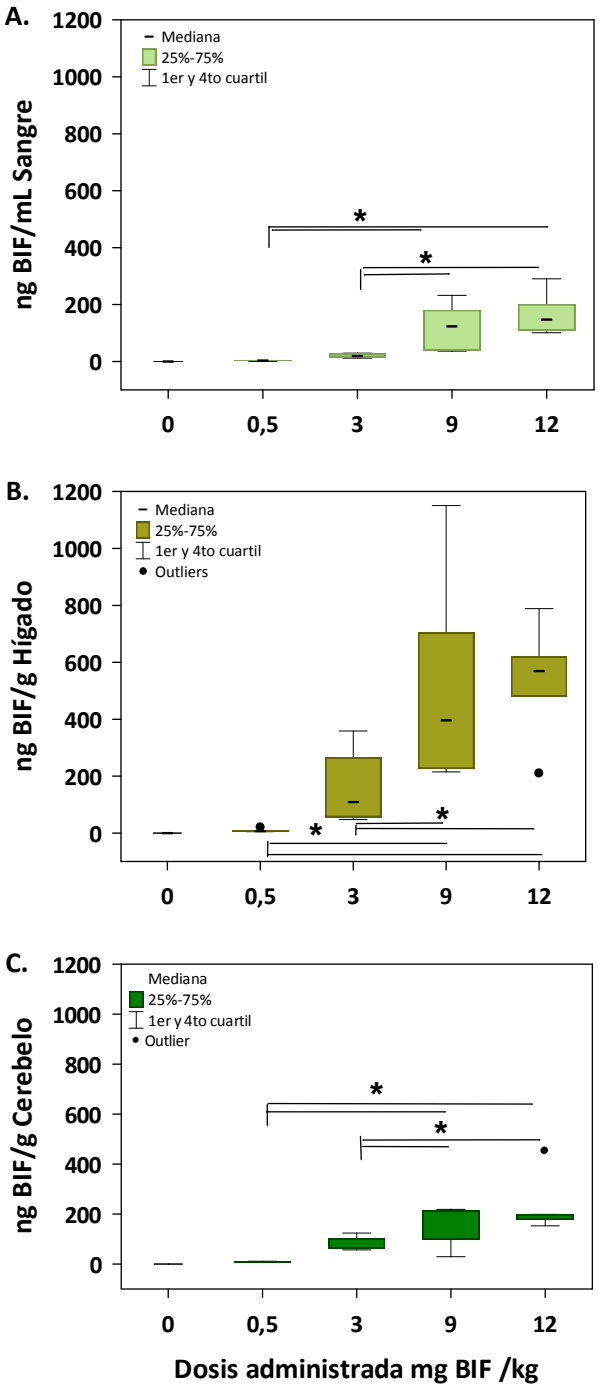


Figura 22. Concentración de Bifentrina en los tres tejidos *vs* la dosis administrada. Se muestran los valores de la concentración de BIF entre el cuartil inferior, la mediana y el cuartil superior sangre, hígado y cerebelo (paneles A, B y C respectivamente). Se marcan las diferencias significativas entre grupos con * (Wilcoxon, $p < 0,05$) N = 4, 8, 7 y 6 para las dosis de 0,5, 3, 9 y 12 mg/kg respectivamente.

Para analizar la asociación entre la concentración de BIF en el tejido y la dosis oral administrada, se aplicó un modelo de regresión lineal simple para la relación HG y

SG y logarítmica para CE y SG, la distribución de los datos mostró un comportamiento "borderline" respecto a la distribución normal (prueba de Shapiro-Wilk). Los factores de regresión de los valores transformados a Ln mostraron una fuerte relación entre las variables estudiadas ($p <$ 0,001 en todos los casos). Los valores de R^2 fueron 0,83 (SG), 0,70 (HG) y 0,63 (CE). Además, la relación entre las concentraciones de BIF en los tejidos, se analizó mediante el estudio de correlación de Spearman (Fig. 23). Los coeficientes de correlación de Spearman fueron significativos en todos los casos ($p <$ 0,001): SG vs HG (Fig. 23A), $r_s = 0,96$; SG vs CE $r_s = 0,94$ (Fig, 23B).

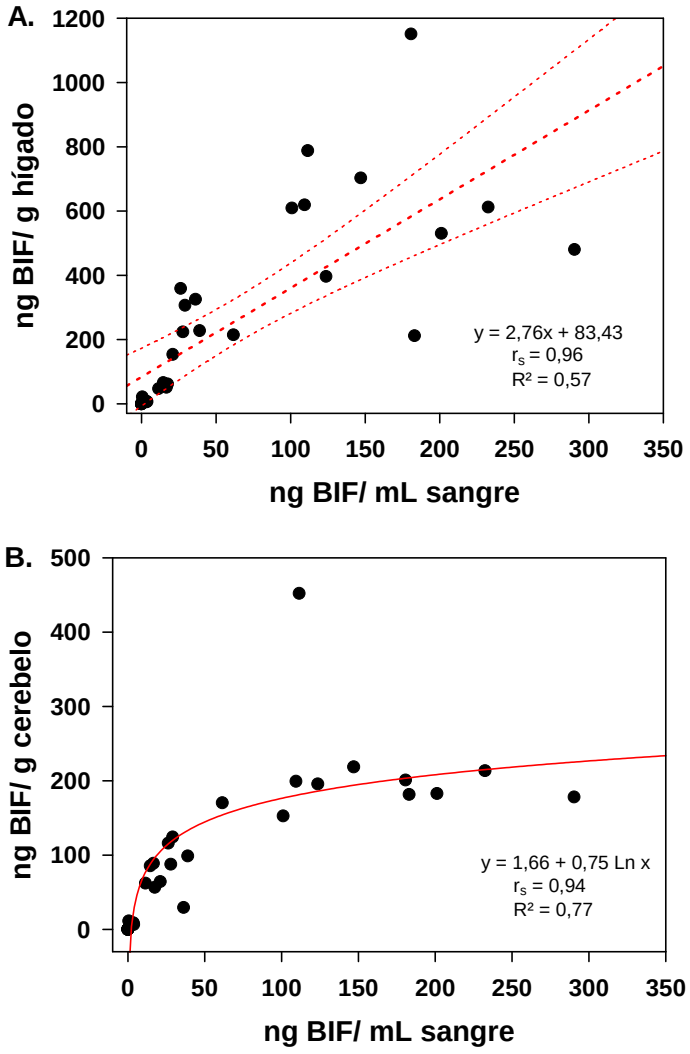


Figura 23. Relación entre la concentración de Bifentrina en hígado y cerebelo con los niveles en sangre. Se muestra la correlación entre las concentraciones de CE *vs* SG aplicando un ajuste logarítmico. La correlación fue alta y significativa ($r_s \geq 0,94$; p <0,05). Cada punto representa la concentración de BIF en cada uno de los tejidos estudiados. N =4, 8, 7 y 6 para las dosis de 0,5, 3, 9 y 12 mg/kg respectivamente.

Por otro lado, en la Fig. 24 se muestra un análisis de la relación de concentraciones de BIF entre CE y SG ([CE]/[SG]) respecto de la dosis administrada. Al aplicar el test de Kruskal-Wallis, se encontró que la relación entre el cociente [CE]/[SG] depende significativamente de la dosis administrada (p < 0,001), observándose una tendencia a un comportamiento bifásico. El grupo administrado con 3 mg/kg mostró un aumento de ese cociente comparado al grupo tratado con la dosis más baja (0,5 mg/kg). En cambio, las dosis de 9 y 12 mg/kg mostraron una disminución del cociente [CE]/[SG] de BIF. Los patrones del cociente de concentraciones entre CE y SG mostraron aceptable coherencia con trabajos previos (Scollon y col., 2011; Starr y col., 2012; Gammon y col., 2015; Hughes y col., 2016a) (ver descripción adicional y análisis crítico de estos resultados en la sección Discusión). Los resultados anteriores se presentan en formato de caja y bigotes (Fig. 24).

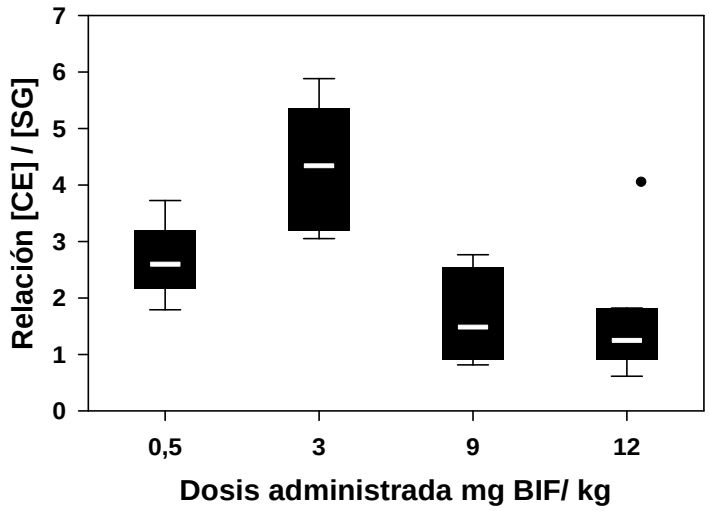


Figura 24. Concentración relativa de Bifentrina en cerebelo respecto a la concentración en sangre en función de la dosis administrada. Para cada nivel de dosis se muestran los valores de la relación [CE]/[SG] entre el cuartil inferior, la mediana y el cuartil superior. N = 4, 8, 7 y 6 para las dosis de 0,5, 3, 9 y 12 mg/kg respectivamente.

7.1.2.2. Teflutrina

Los valores de concentración de TEF en los tejidos se determinaron siguiendo los mismos parámetros que los aplicados en BIF.

A través del análisis cromatográfico se encontró un t_r rel para TEF de 0,76 ± 0,01. La Fig. 25 muestra, a modo representativo, los cromatogramas resultantes del análisis de TEF en extractos de CE de una muestra control (A) y del tratamiento con las

dosis de 7,5 y 9 mg/kg. Puede observarse las diferencias en los tamaños de los picos a medida que aumenta la concentración de TEF.

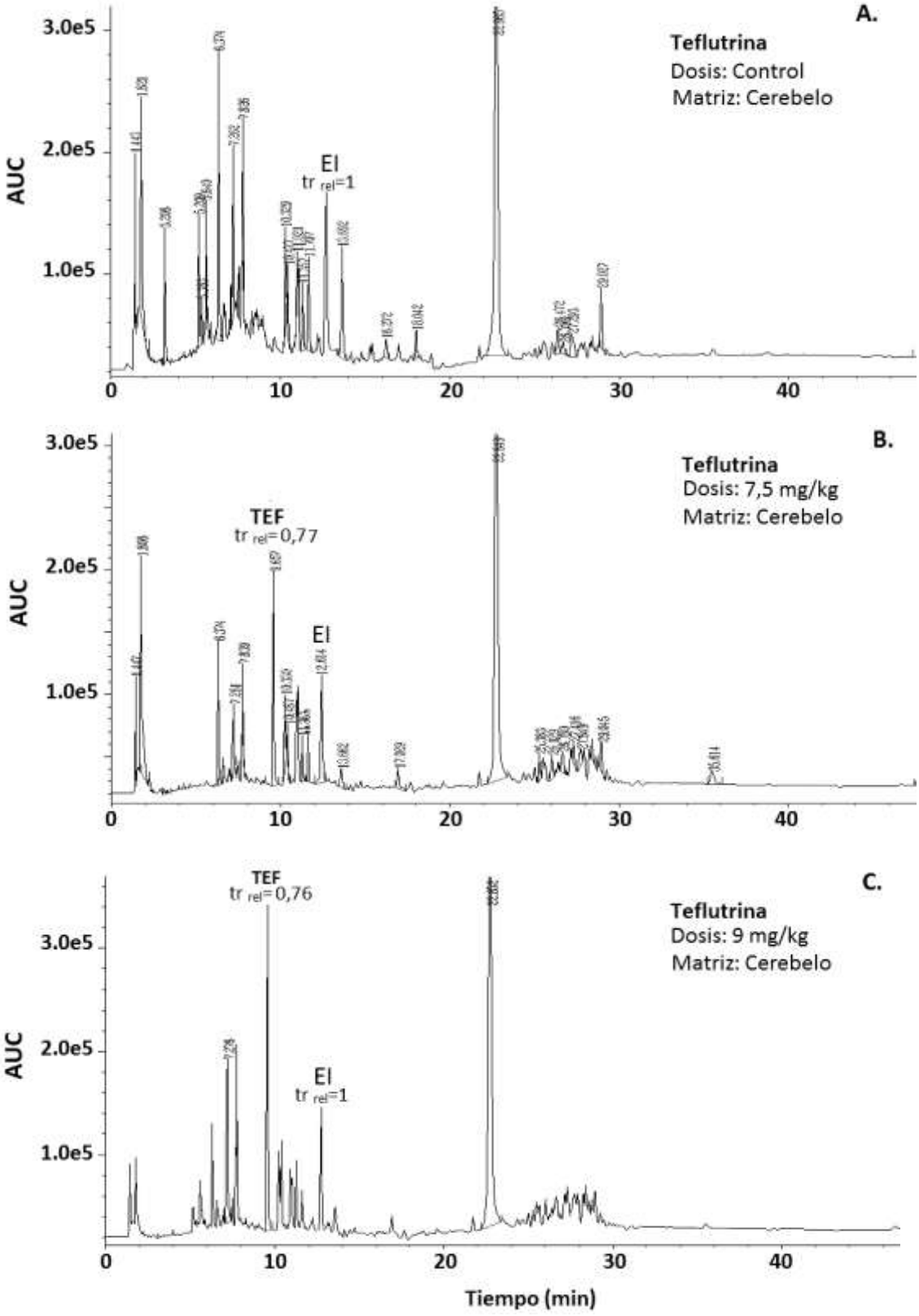


Figura 25. Cromatogramas obtenidos para la cuantificación de TEF en cerebelo luego de la administración por vía oral. Se muestran los cromatogramas de TEF en cerebelo de una muestra control y de los tratamientos con 7,5 y 9 mg/kg.

Se calculó la concentración de TEF en cada tejido a partir de los valores de AUC por el método de la curva de calibración. Al graficar la concentración de TEF en los tejidos en función de la dosis administrada se observó que el nivel de TEF aumentó conforme lo hace la dosis. El análisis ANOVA (Kruskal-Wallis) confirmó que la dosis administrada influye significativamente en la concentración de TEF en todos los tejidos ($p < 0,001$).

La concentración de TEF en CE fué mayor que en HG y en SG. A partir de 3 mg/kg, la concentración promedio en CE e HG, en función de la dosis administrada, fue mayor que en SG. Además, en SG la TEF mantuvo niveles muy similares entre 6 y 9 mg/kg (Fig. 26). Para la dosis más alta (9 mg/kg) se determinó la concentración en un solo animal (ver sección 7.1.1.2 de resultados). Las concentraciones en CE y en HG fueron ~75 - 80 ng TEF/g respectivamente, mientras que en SG se halló una concentración ~8 veces menor.

En el análisis estadístico se compararon las concentraciones de TEF entre los tejidos para cada una de las dosis por separado (Wilcoxon). Se encontró que para la dosis de 0,1 mg/kg no presentó diferencias significativas entre los tres tejidos ($p > 0,05$), mientras que para la dosis de 3 mg/kg presentó diferencias entre las concentraciones de TEF en HG y CE respecto a SG ($p < 0,05$). Por su parte las dosis más altas (6 - 7,5 mg/kg), mostraron diferencias significativas en las concentraciones de TEF entre todos los tejidos.

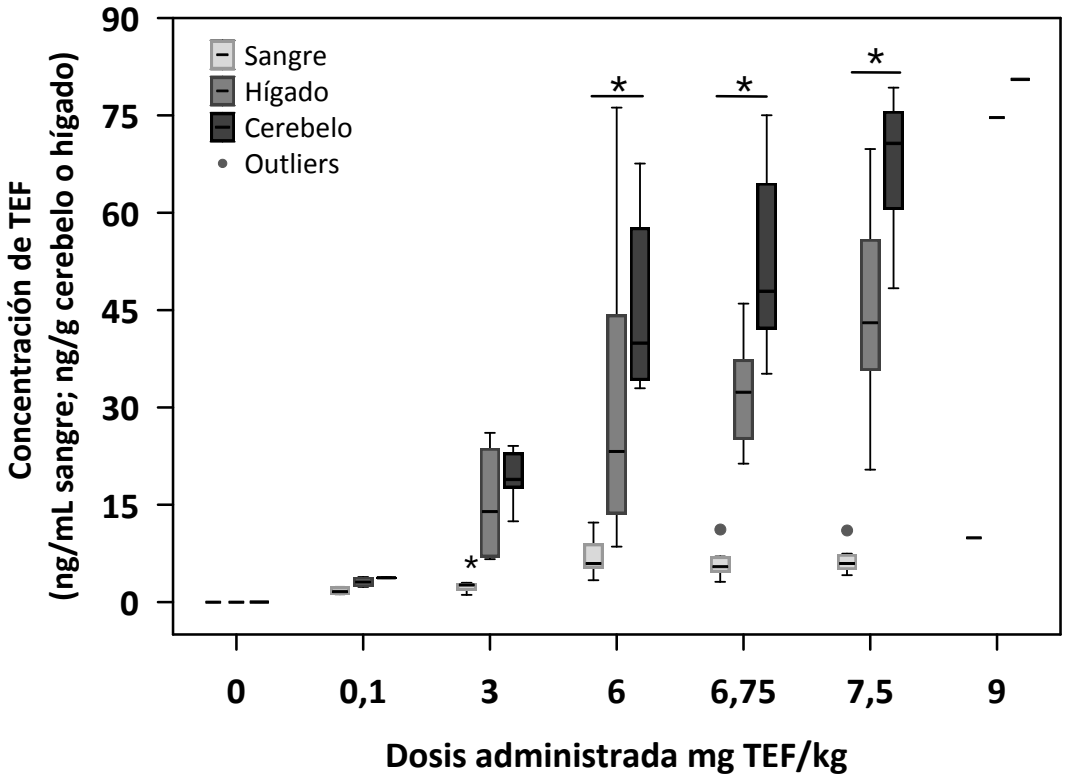


Figura 26. Relación entre la concentración en tejidos y la dosis administrada de Teflutrina. Se muestran los valores de la concentración de TEF entre el cuartil inferior, la mediana y el cuartil superior en ng TEF/g (hígado y cerebelo) y ng TEF/mL (sangre). Se observaron diferencias significativas (test de Wilcoxon) en el rango de dosis entre 3 y 7,5 mg/kg para TEF en CE e HG respecto a SG. Se marcan las diferencias significativas entre los tejidos con * ($p < 0,05$). N = 3, 6, 8, 6, 8 y 1 para las dosis de 0,1, 3, 6, 6,75, 7,5 y 9 mg/kg respectivamente.

El análisis del efecto de la dosis administrada por pares (Wilcoxon) mostró que en SG las dosis más altas (6, 6,75 y 7,5 mg/kg) presentaron diferencias significativas respecto del grupo tratado con 3 mg/kg. Por su parte, el análisis de la concentración de TEF en HG mostró que cuando se administraron dosis de 6,75 a 7,5 mg/kg se encontraron diferencias significativas respecto a los grupos administrados con las dosis 0,1 y 3 mg/kg ($p < 0,05$). Esto mismo se observó en el análisis por pares para CE en donde además se presentaron diferencias entre los grupos tratados con 6 y 7,5 mg/kg. En la Fig. 27 se marcan con * las diferencias significativas entre los distintos tejidos.

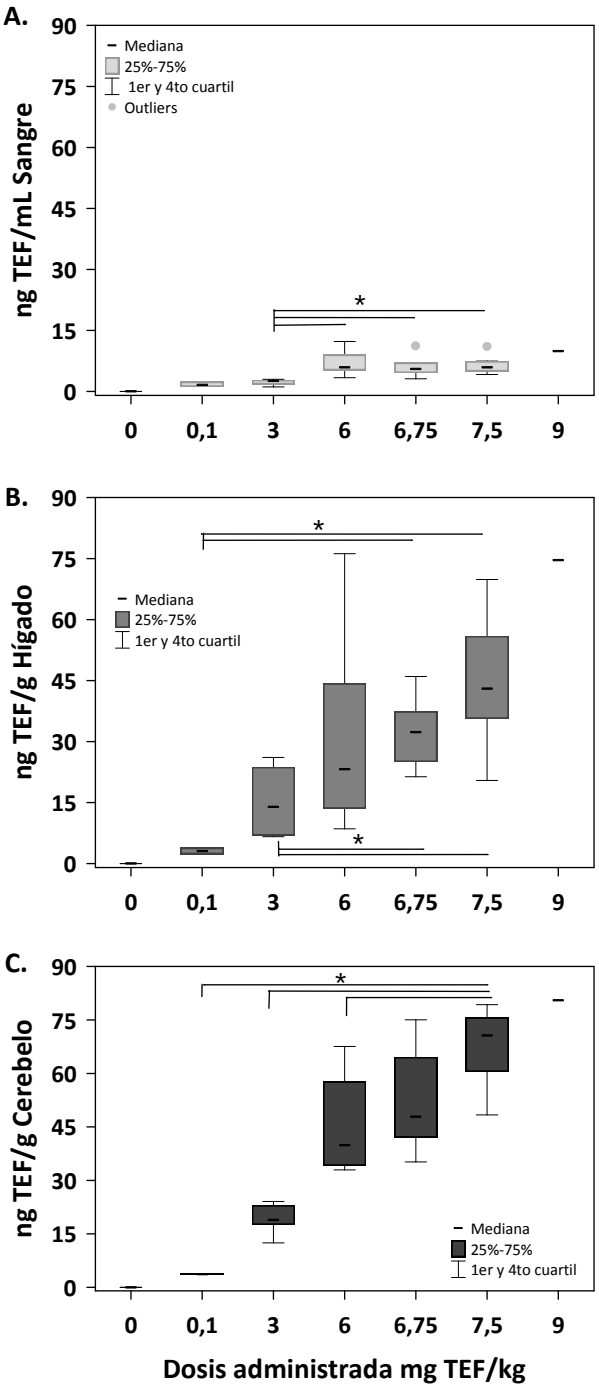


Figura 27. Concentración de Teflutrina en los tres tejidos *vs* la dosis administrada. Se muestran los valores de la concentración de TEF entre el cuartil inferior, la mediana y el cuartil superior en sangre, hígado y cerebelo (paneles A, B y C respectivamente). Se marcan las diferencias significativas entre grupos con * (Wilcoxon, $p < 0,05$). N = 3, 6, 8, 6, 8 y 1 para las dosis de 0,1, 3, 6, 6,75, 7,5 y 9 mg/kg respectivamente.

El análisis de regresión lineal simple permitió verificar la relación entre dosis administrada y concentración en tejido. Se cumplió la condición de normalidad y homocedasticidad de los residuos para aplicar regresión lineal a los valores transformados (Log) de la concentración de TEF en cada tejido y la dosis administrada en los tres tejidos (Shapiro-Wilk, $p > 0,05$). R^2: 0,77 (SG), 0,80 (HG) y 0,87 (CE). Por otro lado, el análisis de correlación de Spearman indicó que las concentraciones de TEF en HG y CE respecto a la concentración en SG (Fig. 28) fue significativa ($p < 0,001$), obteniendo los siguientes coeficientes: $r_s = 0,81$ (SG vs HG), y $r_s = 0,86$ (SG vs CE).

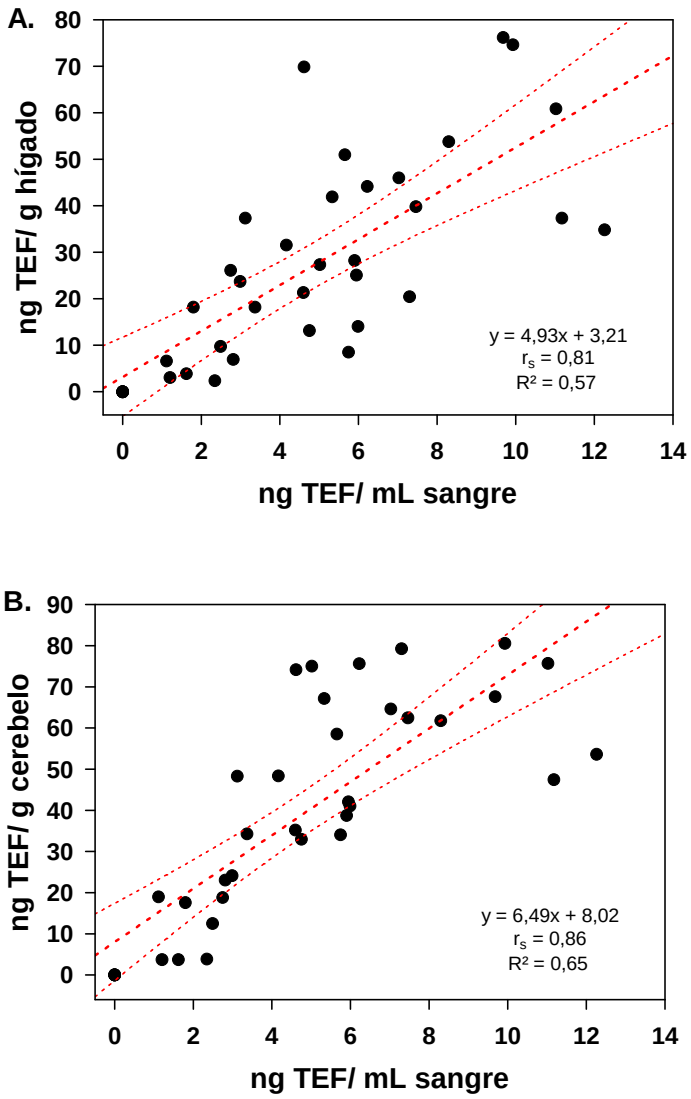


Figura 28. Relación entre la concentración de Teflutrina en hígado y cerebelo con los niveles en sangre. Se muestra la correlación entre las concentraciones en HG *vs* SG (A) y en CE *vs* SG (B). En los dos casos la correlación fue alta ($r_s \geq 0,86$; $p < 0,05$). Cada punto representa la concentración individual de los tejidos estudiados. N = 3, 6, 8, 6, 8 y 1 para las dosis de 0,1, 3, 6, 6,75, 7,5 y 9 mg/kg respectivamente.

En la Fig. 29 se muestra el cociente entre las concentraciones de TEF en CE y en SG ([CE]/[SG]) *vs* la dosis administrada. La dosis administrada influyó significativamente en la relación [CE]/[SG] (Kruskal-Wallis, $p < 0,01$), sin embargo entre el rango de dosis de 3 - 9 mg/kg se observa que la retención de TEF en CE tiende a ser constante perdiendo significancia estadística (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$). Este hallazgo sugiere la tendencia de TEF a ser retenida por CE aun varias horas luego del pico de intoxicación manifestado en los monitoreos de Tsc, aun cuando se consideran las dosis más bajas (intervalo 0,1 - 3 mg/kg).

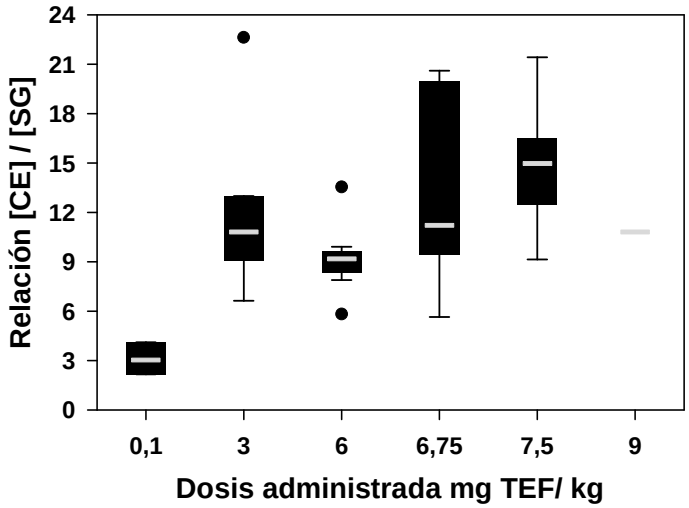


Figura 29. Concentración relativa de Teflutrina en CE respecto a la concentración en SG en función de la dosis administrada. Para cada nivel de dosis se muestran los valores de la relación [CE]/[SG] entre el cuartil inferior, la mediana y el cuartil superior. N = 3, 6, 8, 6, 8 y 1 para las dosis de 0,1, 3, 6, 6,75, 7,5 y 9 mg/kg respectivamente.

7.1.3. Relación entre dosis administrada, concentración en tejido y efecto sobre la Tsc

7.1.3.1. Bifentrina

La concentración de BIF en los tejidos (SG, HG y CE; t = ~6 h; Fig. 20 - 21) y el efecto sobre la ΔTsc (Figs. 16 - 17) mostraron clara dependencia de la dosis administrada. Esta relación entre la dosis administrada, la concentración en tejidos y el efecto sobre la Tsc se presenta en forma integral en la Fig. 30. Se muestran 4 tiempos (2, 2,5, 3 y 3,5 h) que representan el periodo en el cual se observaron diferencias significativas en la Tsc respecto al valor basal. La relación directa entre la dosis administrada, las concentraciones en tejidos y la magnitud de la alteración de Tsc fue

evidente en todos los tejidos, especialmente al considerar ΔTsc en t = 3 - 3,5 h (Fig. 30, paneles C - D), llegando a observarse una ΔTsc de hasta +1,8 °C y concentraciones en tejidos que se incrementan conforme lo hace la dosis (HG > CE > SG).

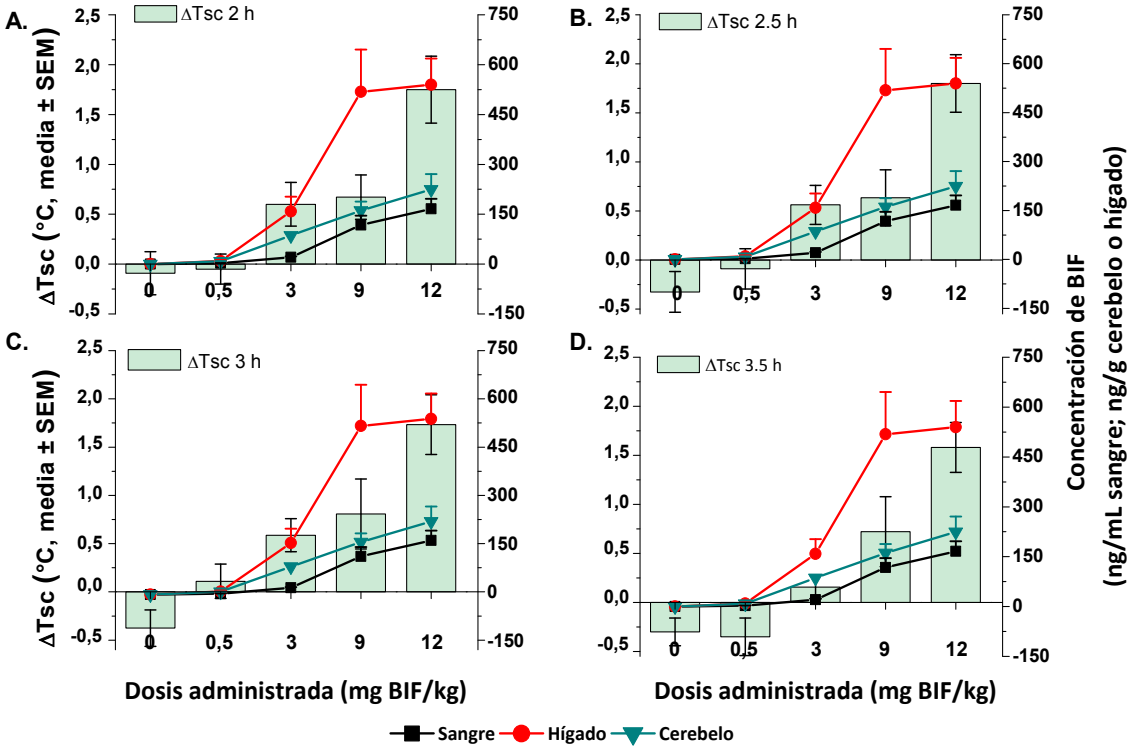


Figura 30. Relación entre la dosis administrada de Bifentrina, la concentración en los tres tejidos y el efecto sobre la Tsc. La relación entre ΔTsc y la concentración en tejidos (ejes Y de la izquierda y derecha, respectivamente) fueron dependientes de la dosis de BIF administrada. Se muestran datos correspondientes al periodo de máximo efecto (2, 2,5, 3 y 3,5 h post-tratamiento, A – D respectivamente). La concentración en cada tejido y ΔTsc se expresa como promedio ($\overline{X}$ ± SEM). N = 4, 8, 7 y 6 para las dosis de 0,5, 3, 9 y 12 mg/kg, respectivamente.

7.1.3.2. Teflutrina

La Fig. 31A - D muestra la relación entre la dosis administrada, la concentración en los tejidos y el ΔTsc, durante el tiempo de máximo efecto: 0,5, 1, 1,5 y 2 h post administración. Puede observarse la relación directa entre el efecto sobre la Tsc y la concentración de TEF en el tejido, ya que ambos aumentan conforme lo hace la dosis administrada. Si bien el efecto de hipertermia leve-moderada es evidente en los cuatro tiempos, el valor de ΔTsc registrado en t = 1 h muestra con mayor claridad la dependencia de la dosis. Por otro lado, se observó también que la concentración de TEF

en HG y CE fue dependiente de la dosis administrada, mientras que los niveles de TEF detectados en SG se mantuvieron casi constantes independientemente del aumento de la dosis administrada.

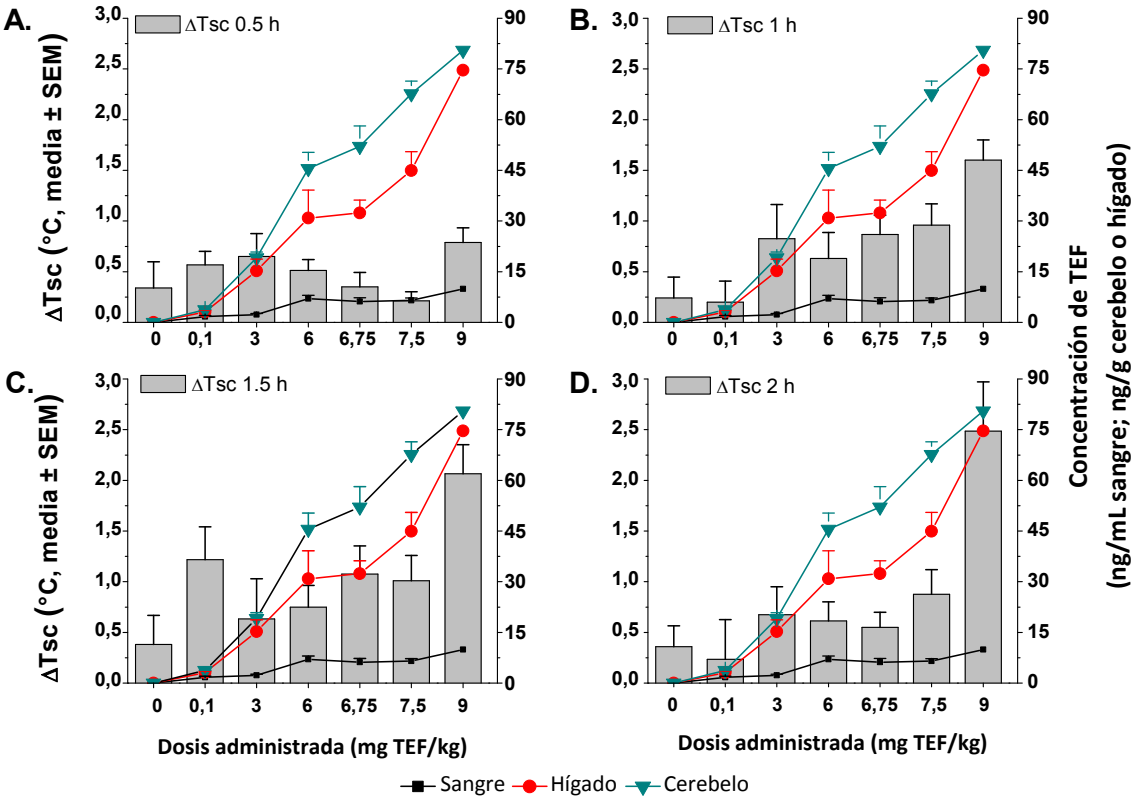


Figura 31. Relación entre la dosis administrada de Teflutrina, la concentración en los tres tejidos y el efecto sobre la Tsc. La relación entre ΔTsc y la concentración en tejidos (ejes Y de la izquierda y derecha, respectivamente) fueron dependientes de la dosis de TEF administrada. Se muestran los datos correspondientes al periodo de máximo efecto (0,5, 1, 1,5 y 2 h post-tratamiento). La concentración en tejidos y ΔTsc se expresaron como promedios ($\overline{X}$ ± SEM). N = 3, 6, 8, 6, 8 y 1 para las dosis de 0,1, 3, 6, 6,75, 7,5 y 9 mg/kg, respectivamente.

7.2. Piretroides con grupo ciano (perfil toxicológico similar a tipo II)

7.2.1. Relación entre la dosis oral y las perturbaciones en la Tsc

Las dosis superiores a 3 mg/kg de α-CPM y DTM causaron los síntomas típicos de intoxicación por PIRs tipo II (Soderlund y col., 2002; Verschoyle y Aldridge, 1980), mientras que las dosis más bajas (0,5 - 3 mg/kg) no generaron signos claros de

neurotoxicidad. A continuación se muestran los resultados de ΔTsc y las observaciones clínicas realizadas en los animales tratados con los PIRs mencionados.

7.2.1.1. *α*-Cipermetrina

La variación de Tsc en función del tiempo y la dosis administrada de α-CPM se muestra en la Fig. 32. Los registros de ΔTsc luego de la administración de la dosis más baja (0,5 mg/kg) no se diferenciaron en forma considerable de los cambios de Tsc observados en el grupo control. Dentro del rango 3 - 9 mg/kg, la dosis de 3 mg/kg causó un un leve incremento de ΔTsc que se sostuvo hasta t = 1,5 h inclusive. En cambio, la dosis más alta (12 mg/kg) causó un claro descenso en la Tsc, llegando en t = 4 h a ~1 °C por debajo del valor de Tsc basal en este grupo. Esta inversión del sentido de cambio en la Tsc se inició 1,5 - 2 h después de la administración de la dosis. Además, en el grupo 12 mg/kg el promedio de ΔTsc fue menor que en el grupo control (mas de 1 °C por debajo) aun en el momento del sacrificio (ver Fig. 32). Respecto a la inversión del efecto a nivel cualitativo (incremento, luego disminución de Tsc), el patrón de cambios observados luego de administrar la dosis 9 mg/kg pareció representar un punto de inflexión más que un estado fisiológico de termoregulación similar al del grupo control. Estos resultados fueron consistentes con lo evaluado en experimentos en los que se emplearon ratas adultas (McDaniel y col., 1993) y en un estudio de ratas infantes realizado en nuestro laboratorio (Bardullas y col., 2015) luego de la administración de Cipermetrina (mezcla de los 8 isómeros).

El análisis estadístico realizado sobre los valores registrados de la ΔTsc en función de la dosis administrada se efectuó aplicando pruebas no paramétricas. El valor de ΔTsc varió a lo largo del período de monitoreo (0-4 h) (ANOVA de Friedman; $p < 0,00001$). El mismo análisis se aplicó en distintos segmentos del periodo para determinar el intervalo de tiempo de máximo efecto de la hipotermia. El análisis mostró que las variaciones de Tsc alcanzaron significancia estadística en el intervalo ~2 - 4 h ($p = 0,033$) (Fig. 32).

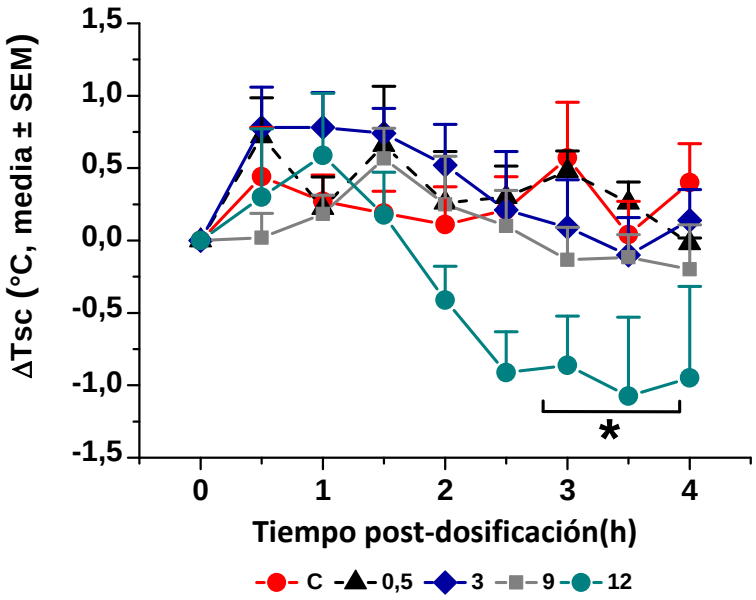


Figura 32. Relación dosis-respuesta de α-Cipermetrina. Monitoreo de Tsc luego de la administración de α-CPM (0,5 a 12 mg/kg). Las curvas representan ΔTsc (T_{ti} - T_{to}) en función del tiempo (h), desde ~30 min antes del tratamiento (t_0) hasta 4,5 h. Los resultados se expresaron como la media de ΔTsc ($\overline{X}$±SEM). C = grupo control (vehículo). * indica el período donde se presentó el efecto máximo de α-CPM sobre Tsc respecto al grupo control.

Las observaciones visuales de los animales tratados con 12 mg/kg sugirieron que el aumento de la variabilidad en Tsc a partir de 2,5 h podría ser el resultado de la combinación de la hipotermia que típicamente causan los ciano-PIRs (Wolansky y Harrill, 2008) y la intensa fasciculación muscular y temblores corporales que manifestaron algunos animales. Como hipótesis, lo que podría estar ocurriendo es que el calentamiento corporal superficial generada por la actividad muscular podría haber actuado contrarrestando la caída de la temperatura Tsc (que se mide mediante chips subcutáneos) observada a partir de t = 2h, posiblemente distorsionando la variabilidad de Tsc intragrupo a medida que aumentaba la dosis (Fig. 32).

La dosis administrada influyó significativamente sobre ΔTsc (caída de Tsc respecto al grupo control) entre las 3 y 3,5 h (Kruskal-Wallis; $p < 0,05$). En consecuencia, estos fueron los tiempos considerados para evaluar la relación entre dosis administrada de α-CPM, su concentración en tejidos y los efectos sobre la Tsc. Los contrastes de a pares confirmaron que la dosis 12 mg/kg de α-CPM causaba una caída significativa de Tsc respecto de los tratamientos control y 0,5 mg/kg a los tiempos t = 3

- 3,5 h, por su parte la dosis 9 mg/kg presentó diferencias significativas con los mismos grupos únicamente a para t = 3 h (Wilcoxon, $p < 0,05$) (ver Figura 33).

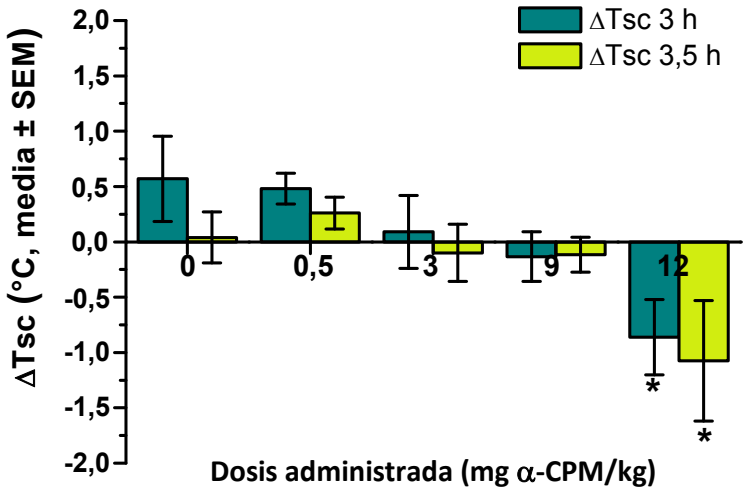


Figura 33. Relación dosis-respuesta de la ΔTsc durante el tiempo de máximo efecto luego de la administración de α-Cipermetrina. Los resultados se expresaron como la media de ΔTsc ($\overline{X}$±SEM) para los tiempos que presentaron diferencias significativas (*p < 0,01) respecto al control (3 - 3,5 h).

7.2.1.2. Deltametrina

La Fig. 34 muestra la relación entre dosis administrada y ΔTsc para DTM. La administración de DTM provocó una alteración bifásica en la Tsc. Durante la primera hora todos los grupos administrados con DTM (1,5 - 12 mg/kg) presentaron un leve incremento en la Tsc respecto del valor basal (y respecto al grupo control). Luego de 1 h se observó una clara disminución de Tsc para las dosis más altas (9 y 12 mg/kg). Se observó un claro efecto hipotérmico (-2,5 °C respecto al valor basal) en el periodo comprendido entre 2 y 3 h. Además, entre 3 y 4,5 h hubo una tendencia a la recuperación de los valores basales en esos grupos de dosis, si bien al final del monitoreo aun se observaron diferencias marcadas con los registros del grupo control. Aquí se repitió lo mismo que lo observado con α-CPM: en algunos animales administrados DTM 9 - 12 mg/kg la ausencia de una clara recuperación de los valores pre-exposición de Tsc al final del monitoreo podría estar más relacionada a la competencia entre el efecto hipotérmico y el calor generado por los episodios de

fasciculación neuromuscular intensa inducidos por DTM que a la velocidad de la recuperación de la hipotermia. El ANOVA de Friedman mostró diferencias significativas en el valor de ΔTsc en función de la dosis administrada durante el tiempo del monitoreo (0,5 - 4,5 h post-administración ($p < 0,001$).

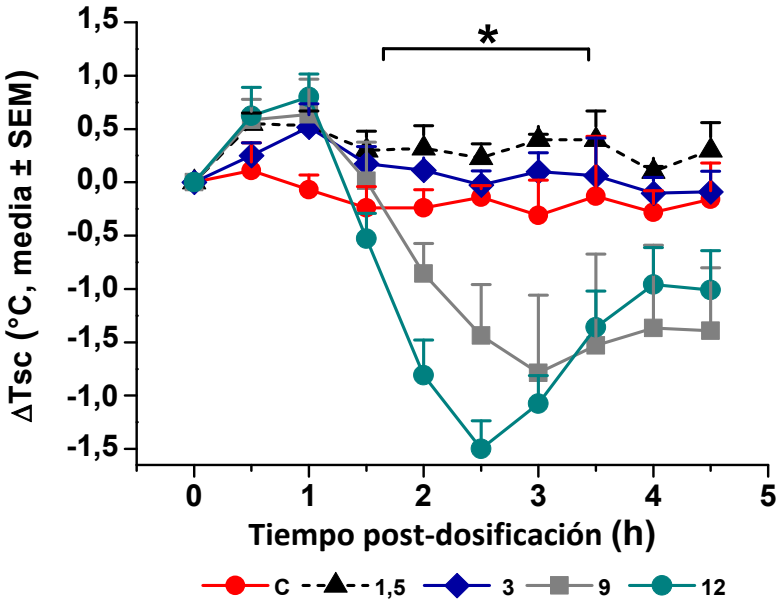


Figura 34. Relación dosis-respuesta de Deltametrina. Monitoreo de Tsc luego de la administración de DTM (1,5 a 12 mg/kg). Las curvas representan ΔTsc (T_{ti} - T_{to}) en función del tiempo (h), desde ~30 min antes de la administración (t_0) hasta 4,5 h. Los resultados se expresaron como la media de ΔTsc ($\overline{X}$±SEM). C = grupo control (vehículo). * indica el período donde se presentó el efecto máximo respecto al grupo control.

Además, se encontró que sólo entre 2 y 3,5 h hubo diferencias significativas en ΔTsc al estudiar el efecto del Tratamiento sobre la Tsc (t = 2h, $p = 0,0013$; t = 2,5 h, $p = 0,0009$; t = 3 h, $p = 0,01$; t = 3,5 h, $p = 0,05$) (análisis de Kruskal Wallis). La prueba por pares (Wilcoxon) permitió finalmente determinar que a 2,5 h las dosis de 9 y 12 mg/kg causaban una caída estadísticamente significativa de ΔTsc respecto a los grupos control, 1,5 y 3 mg/kg. En t = 3 h las diferencias se presentaron entre la dosis de 9 mg/kg con el grupo tratado con 1,5 mg/kg, y entre la dosis de 12 mg/kg con el grupo control, 1,5 y 3 mg/kg (Fig. 35).

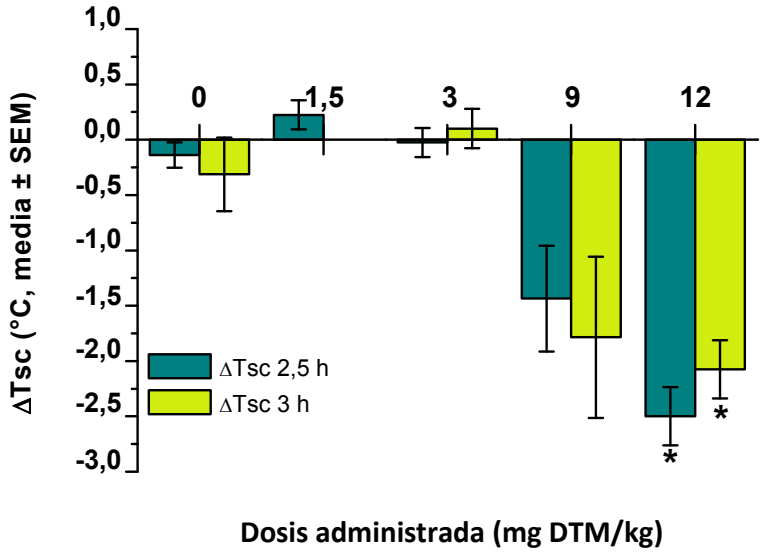


Figura 35. Relación dosis-respuesta de la ΔTsc durante el tiempo de máximo efecto luego de la administración de Deltametrina. Los resultados se expresaron como la media de ΔTsc ($\overline{X}$±SEM) para el periodo que presentó mayores diferencias significativas * ($p < 0,01$) respecto al control (2,5 y 3 h).

7.2.1.3. Observaciones clínicas por administración de α-Cipermetrina y Deltametrina

La administración de las dosis más altas de α-CPM y DTM (9 y 12 mg/kg) provocaron episodios de inquietud (mayor actividad dentro de la jaula), rascado, cavado de viruta e incremento de la conducta de aseo. También dentro del rango superior del esquema de dosis se observó que la mayoría de los animales entre 2 y 4 h después de la administración presentaron marcados movimientos rastreros y/o de coreoatetosis, signos típicos de los síndromes "CS" que causan los ciano-PIRs (Soderlund y col., 2002).

En resumen, el efecto neurotóxico más evidente de α-CPM y DTM fue la disminución de Tsc en forma dependiente de la dosis administrada. En el caso de α-CPM el efecto hipotérmico máximo se manifestó 3 - 3,5 h luego de administrar la dosis más alta, 12 mg/kg; para DTM este efecto fue evidente a partir de t = 2 h en los grupos tratados con 9 y 12 mg/kg. Además, durante la primera hora, el tratamiento con DTM y α-CPM (3 mg/kg) causó un leve incremento de Tsc hasta ~1,5- 2 h. Se observó una tendencia a la recuperación de la Tsc al valor basal a medida que avanzó el período de monitoreo, si bien para las dosis más altas (α-CPM 12 mg/kg; DTM 9 y 12 mg/kg) en

los últimos tiempos de registro (t = 3,5 - 4,5 h) los animales aún no habían alcanzado el valor de la Tsc pre-tratamiento. Considerando el período de efecto máximo, se podría estimar que la dosis mínima efectiva de estos ciano-PIRs para provocar disminución de Tsc se encuentra entre 9 y 12 mg/kg, si bien dosis menores fueron suficientes para causar alteraciones en comportamientos estereotipados y la actividad motora dentro de la jaula (observaciones no sistemáticas no mostradas).

7.2.2. Concentración en tejidos

7.2.2.1. α-Cipermetrina

Bajo las condiciones de trabajo, el análisis cromatográfico mostró que α-CPM eluye a un t_r rel de 2,43 ± 0,01. La α-CPM se presentó como un pico fácilmente identificable en la mayoría de los extractos analizados.

La Fig. 36 muestra los cromatogramas correspondientes al análisis de α-CPM en los extractos de SG, HG y CE de un mismo animal tratado con la dosis de 9 mg/kg (A - C). En esta figura puede observarse la diferencia del tamaño del pico de α-CPM entre los tejidos (HG < SG < CE).

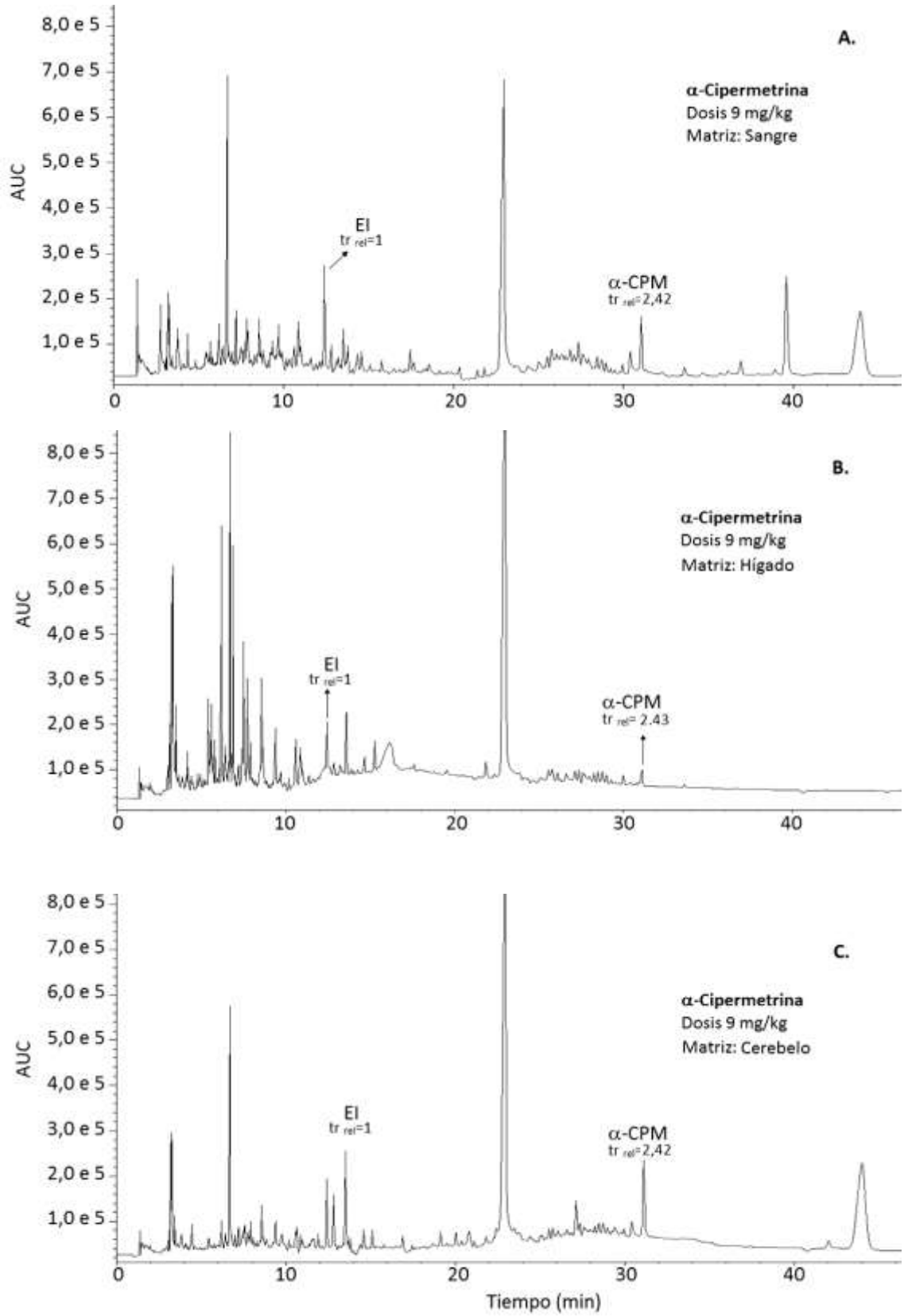


Figura 36. Cromatogramas de los extractos de los tres tejidos de los animales tratados con α-Cipermetrina. Se observa el pico de α-CPM en $t_{r\ rel}$ = 2,4 en los extractos de SG, HG y CE de un animal tratado con 9 mg/kg (paneles A - C).

La concentración de α-CPM presente en SG, HG y CE fue dependiente de la dosis administrada (Kruskal-Wallis; $p < 0{,}001$ en todos los casos). La mayor concentración de α-CPM se encontró en CE, y fue hasta 2 - 4 veces mayor que en SG y HG en los animales tratados con 9 - 12 mg/kg. En HG se detectaron los niveles más bajos. Estas tendencias se mantuvieron en todas las dosis estudiadas (Fig. 37).

Inicialmente se compararon los valores de las concentraciones entre tejidos para cada dosis por separado aplicando el test de Wilcoxon. El análisis por pares mostró que únicamente se presentaron diferencias significativas entre SG e HG para la dosis de 9 mg/kg, mientras que entre HG y CE las diferencias estadísticamente significativas de la concentración de α-CPM se observaron para las dosis de 0,5 y 9 mg/kg. En el caso de la dosis de 12 mg/kg, al comparar los niveles de α-CPM entre HG vs CE se encontró un valor de *p* apenas mayor al criterio de significancia estadística ($p = 0{,}06$). En la Fig. 37 se marcan con * las diferencias significativas entre los tejidos para una misma dosis.

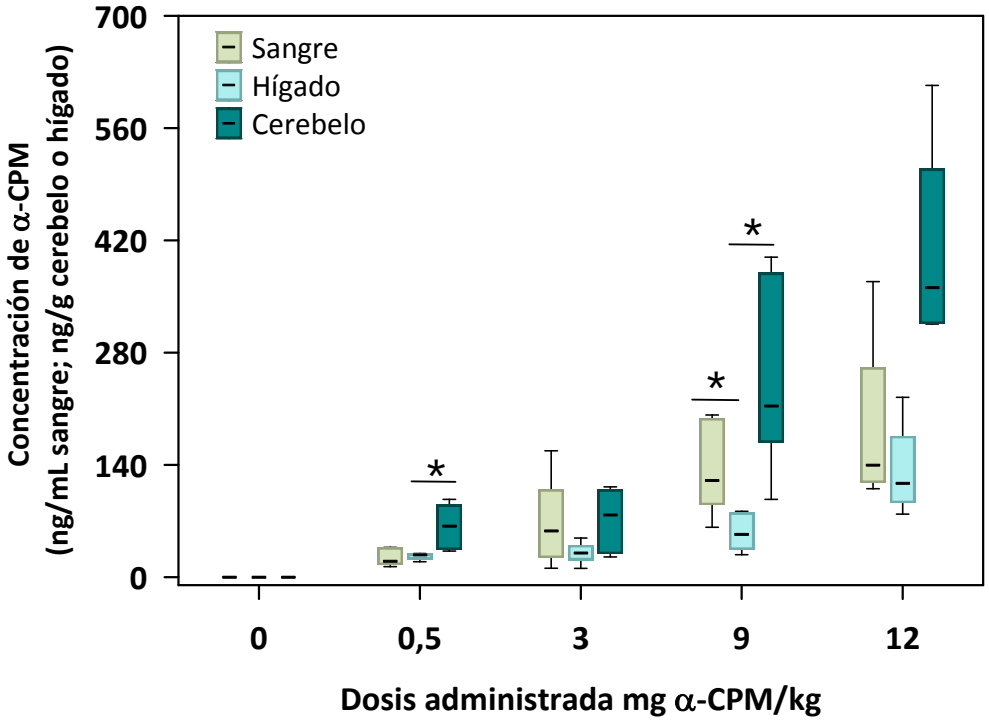


Figura 37. Relación entre la concentración en tejidos y la dosis administrada de α-Cipermetrina. Se muestran los valores de la concentración de α-CPM entre el cuartil inferior, la mediana y el cuartil superior en ng α-CPM /g (hígado y cerebelo) y ng α-CPM /mL (sangre). Las diferencias significativas en los niveles de α-CPM entre tejidos para cada dosis se marcan con *(Wilcoxon, $p < 0{,}05$). N = 4, 5, 5, 6 y 4 para las dosis de C, 0,5, 3, 9 y 12 mg/kg respectivamente.

Al realizar el análisis por pares (Wilcoxon), se encontró que la concentración de α-CPM en CE de los animales tratados con la dosis de 9 y 12 mg/kg, difiere estadísticamente de los niveles encontrados en las dosis más bajas (0,5 y 3 mg/kg; $p < 0,01$). En SG las diferencias fueron significativas entre las dosis de 9 y 12 mg/kg con 0,5 mg/kg. En HG únicamente se hallaron diferencias entre el grupo de dosis de 12 mg/kg respecto a 0,5 mg/kg ($p < 0,01$, Fig.38).

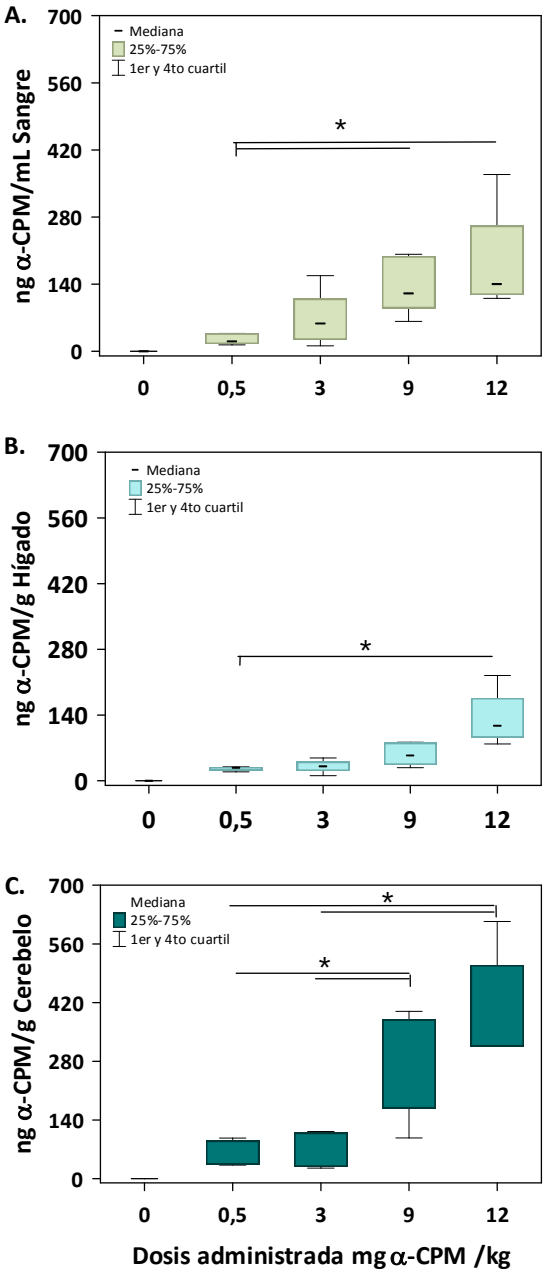


Figura 38. Concentración de α-Cipermetrina en los tres tejidos. Se muestran los valores de la concentración de α-CPM entre el cuartil inferior, la mediana y el cuartil superior en sangre, hígado y cerebelo (paneles A, B y C, respectivamente). Se marcan

las diferencias significativas con * (Wilcoxon, p<0,05). N= 4, 5, 5, 6 y 4 para las dosis de C, 0,5, 3, 9 y 12 mg/kg, respectivamente.

Aplicando un modelo de regresión lineal simple se determinó la relación entre la dosis administrada y la concentración en cada tejido. En todos los casos se obtuvieron coeficientes de regresión positivos para estas variables: R^2 = 0,58, 0,65 y 0,75 en SG, HG y CE, respectivamente.

Por otro lado, se estudió la fuerza de la asociación entre las concentraciones en HG y CE y la concentración en SG (Fig. 39). En los dos casos la asociación fue muy significativa (correlación de Spearman; p < 0,00001). Los altos valores de r_s permitieron inferir una fuerte dependencia de la concentración presente en SG. Los valores de r_s son los siguientes: SG vs HG, r_s = 0,81, y SG vs CE, r_s = 0,78.

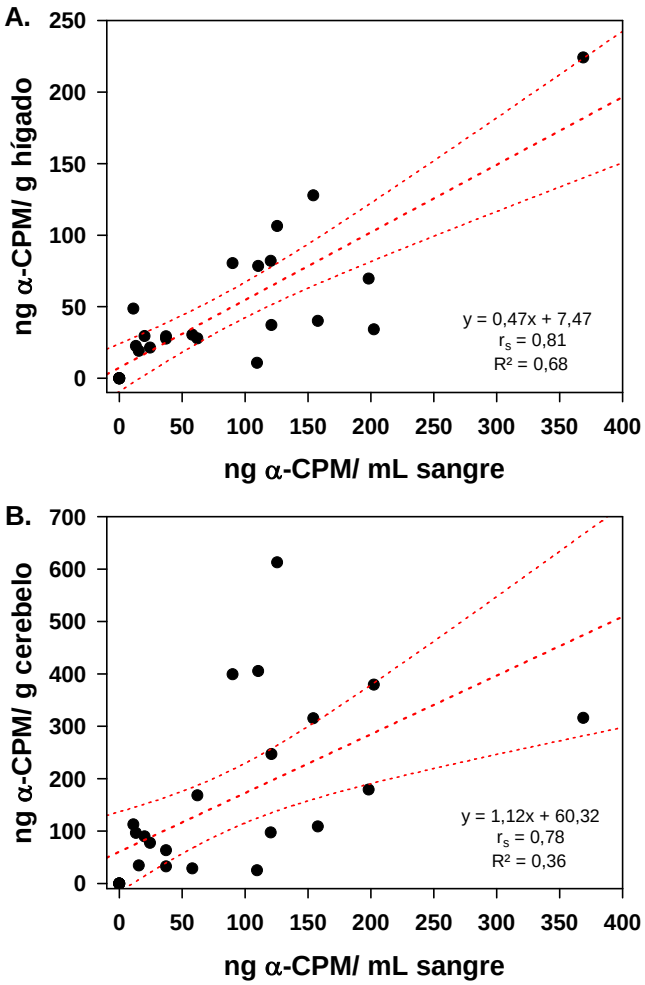


Figura 39. Relación entre la concentración de α-Cipermetrina en hígado y cerebelo con los niveles en sangre. Se muestra la correlación entre las concentraciones de HG *vs* SG (A) y de CE *vs* SG (B). En los dos casos se obtuvo una correlación alta y significativa ($r_s \geq 0,78$; p < 0,01). Cada punto representa la concentración individual en

los tejidos estudiados. N = 4, 5, 5, 6 y 4 para las dosis de C, 0,5, 3, 9 y 12 mg/kg, respectivamente.

Por otro lado, la Fig. 40 muestra el cociente entre las concentraciones de α-CPM en CE y SG ([CE]/[SG]) en función de la dosis administrada. *A priori*, si el *clearance* (velocidad de eliminación) de α-CPM en SG fuera mucho mayor que el de CE e independiente de la dosis absorbida, se esperaría que este cociente tienda a aumentar a medida que aumenta el nivel de exposición. En todos los grupos tratados el cociente promedio fue **>** 1, y la dosis administrada no fue una influencia significativa [CE]/[SG] ($F_{3,16}$ = 0,20; p = 0,90). Aquí amerita enfatizar que la tendencia marcada a un cociente **>** 1 se observó aun cuando la disección de tejidos se realizó ~5,5 - 6 h luego de la administración oral.

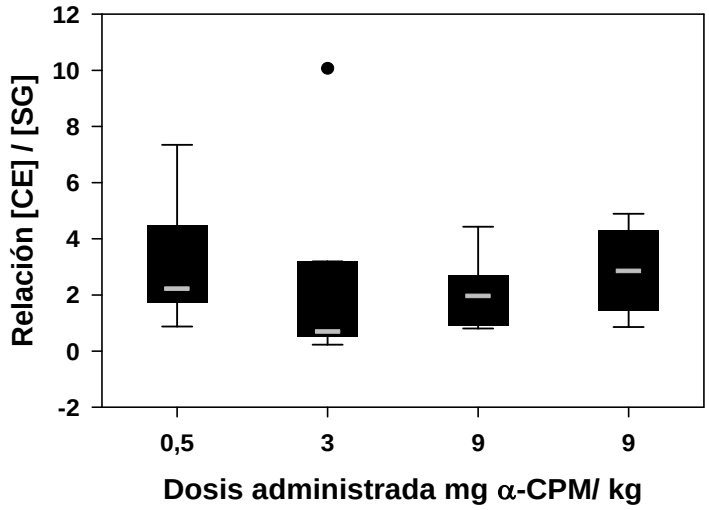


Figura 40. Concentración relativa de α-Cipermetrina en cerebelo respecto a la concentración sangre en función de la dosis administrada. Para cada nivel de dosis se muestran los valores de la relación [CE]/[SG] entre el cuartil inferior, la mediana y el cuartil superior. N = 4, 5, 5, 6 y 4 para las dosis de C, 0,5, 3, 9 y 12 mg/kg, respectivamente.

7.2.2.2. Deltametrina

El análisis cromatográfico mostró que DTM eluyó a un t_r rel de 2,8 ± 0,1 min. Se obtuvo un pico fácilmente identificable en la mayoría de los extractos analizados. La Fig. 41 muestra los cromatogramas correspondientes al estándar de DTM en el extracto de SG, HG y CE de un animal tratado con 9 mg/kg (A - C).

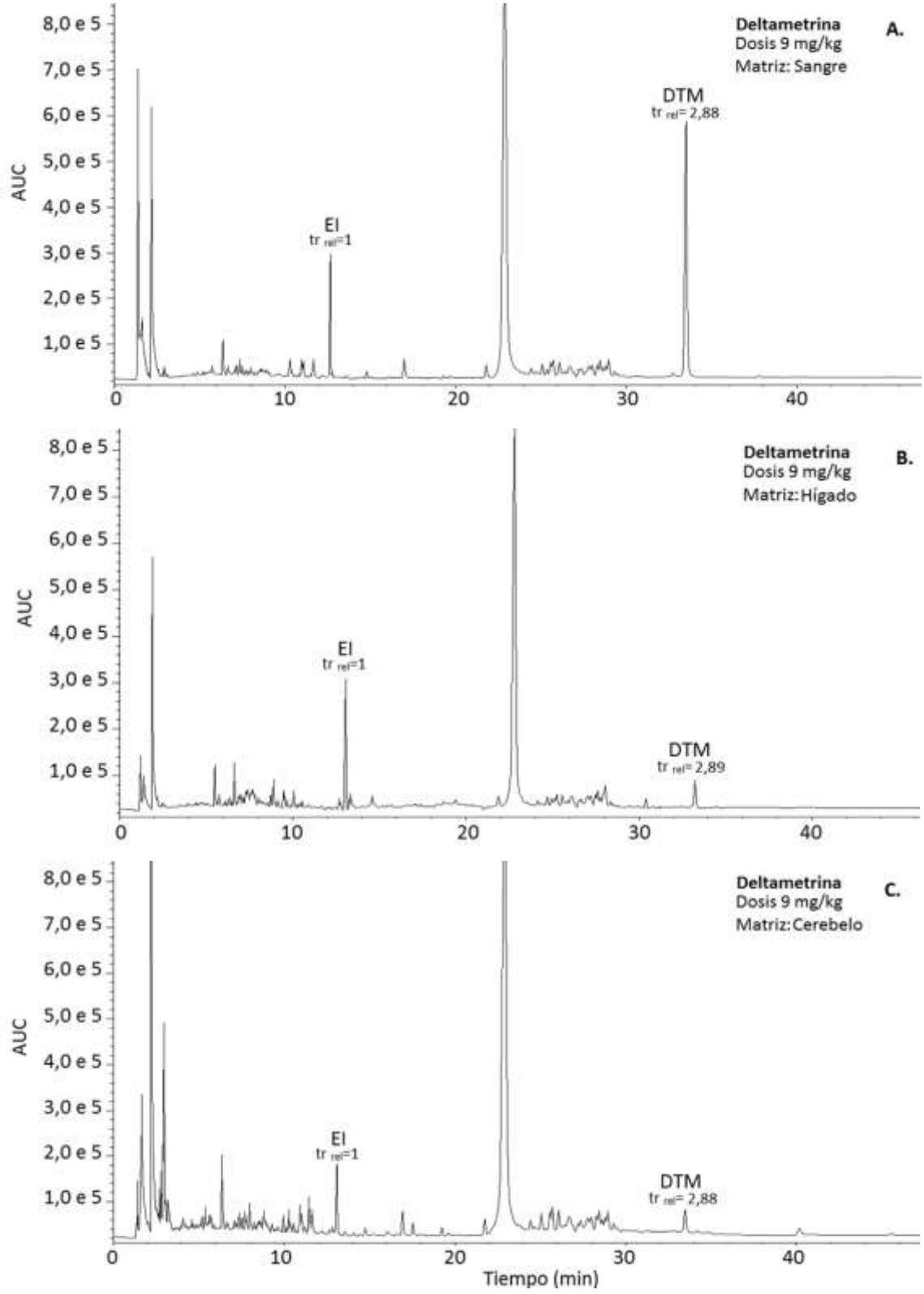


Figura 41. Cromatogramas de los tres tejidos SG, HG y CE luego de la administración de Deltametrina. Se observa la señal característica de DTM en $t_{r\ rel}$ = 2,88 ± 0,01 min en los extractos de SG, HG y CE (C, D y E) correspondientes a las dosis 9 mg/kg.

La concentración de DTM en los tejidos fue dependiente de la dosis administrada (Kruskal-Wallis; $p < 0{,}0001$) (Fig. 42). Para el rago de dosis 9 - 12 mg/kg, la concentración relativa de DTM en SG fue mayor a la de HG y CE. En HG el aumento de concentración de DTM estaría mayormente influenciado por la dosis administrada que en CE. Los resultados del análisis estadístico entre tejidos para cada dosis por separado (test de Wilcoxon) mostró un aumento significativo en los niveles de DTM en SG respecto a HG y CE para la dosis de 9 mg/kg. Además al administrar 12 mg/kg las concentraciones de DTM en los 3 tejidos fueron estadísticamente diferentes, mostrando al CE como el tejido con menor pendiente para la dependencia de la dosis administrada. Si bien hubo niveles detectables de DTM en los 3 tejidos luego de administrar 1,5 y 3 mg/kg, en estos grupos experimentales no se encontraron diferencias significativas entre los tejidos (Fig. 42).

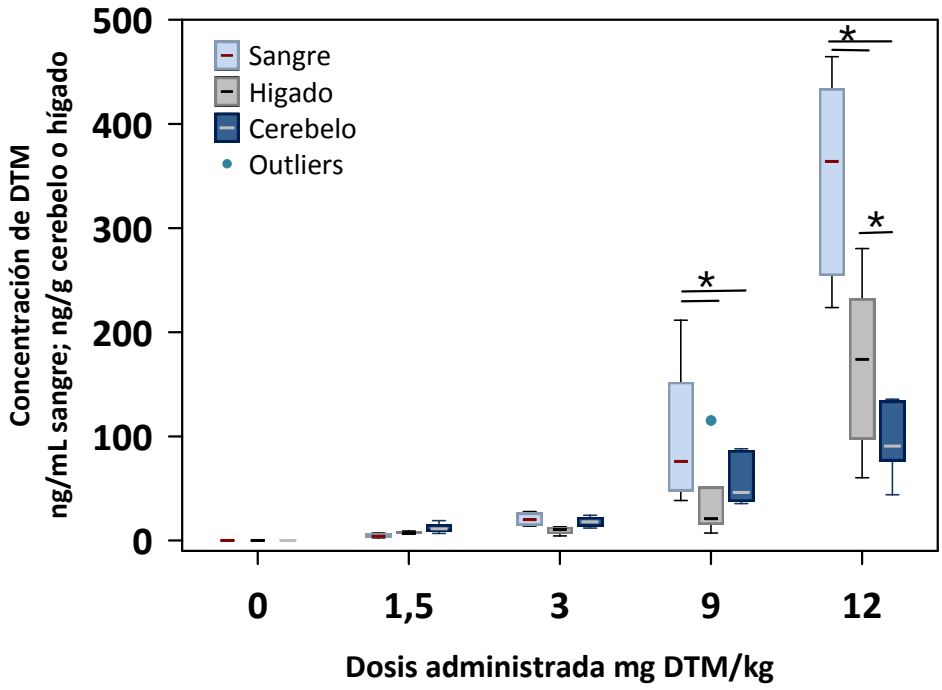


Figura 42. Relación entre la concentración en tejidos y la dosis administrada de Deltametrina. Se muestran los valores de la **concentración de DTM entre el cuartil inferior, la mediana y el cuartil superior en** ng DTM /g (hígado y cerebelo) y ng DTM /mL (sangre). Las diferencias significativas en los niveles de DTM entre los tejidos para cada dosis se marcan con * (Wilcoxon, p <0,05). N = 4, 4, 4, 7 y 6 para las dosis de C, 1,5, 3, 9 y 12 mg/kg respectivamente.

Al realizar el análisis por pares de las dosis administradas en cada uno de los tejidos (prueba de Wilcoxon) se encontró que los niveles de DTM en SG difieren

significativamente entre la dosis de 12 mg/kg respecto a los otros tratamientos (1,5, 3 y 9 mg/kg), mientras que la dosis de 9 mg/kg es diferente solamente de 1,5 mg/kg. En el caso de HG, la dosis de 12 mg/kg fue diferente respecto a 1,5 y 3 mg/kg. En CE las significancia estadística se presentó al comparar las concentraciones de los tejidos de la dosis de 12 mg/kg con el grupo tratado con 1,5 mg/kg ($p < 0,05$) (Fig. 43).

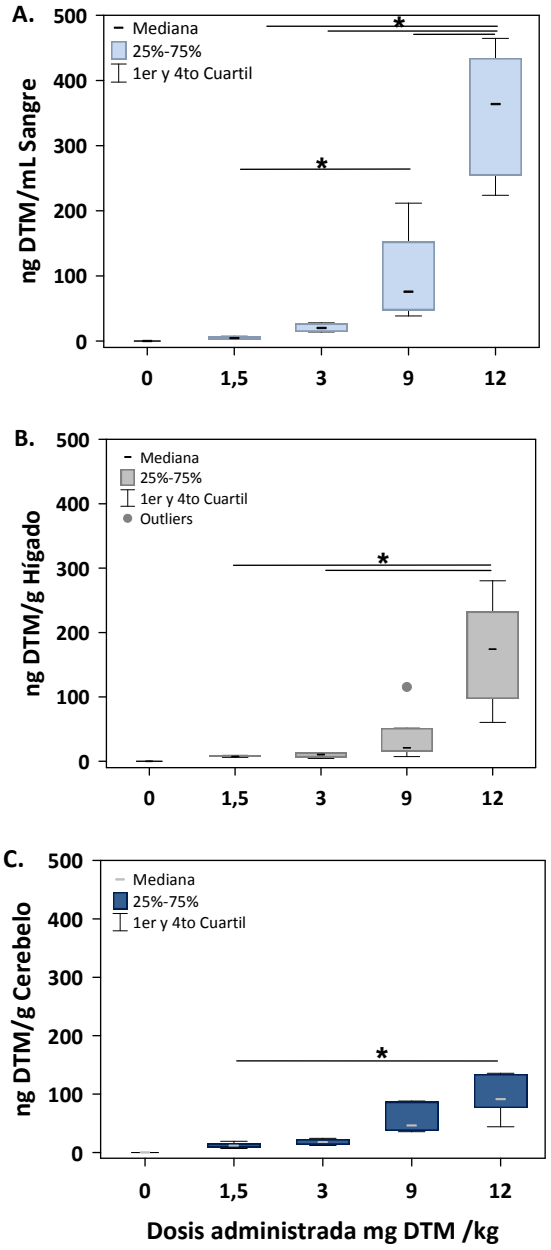


Figura 43. Concentración de Deltametrina en los tres tejidos. Se muestran los valores de la concentración de DTM entre el cuartil inferior, la mediana y el cuartil superior en sangre, hígado y cerebelo (paneles A, B y C, respectivamente). Se marcan las diferencias significativas * ($p < 0,05$). N = 4, 4, 4, 7 y 6 para las dosis de C, 1,5, 3, 9 y 12 mg/kg respectivamente.

Usando un modelo de regresión lineal simple se determinó la relación entre la dosis administrada de DTM y su concentración en cada tejido, obteniéndose valores positivos de R^2 para SG, HG y CE (0,65, 0,49 y 0,74 respectivamente) (p < 0,0001 en todos los casos).

La fuerza de la asociación entre la concentración de DTM en SG y la concentración en CE y HG se evaluó aplicando el modelo de correlación de Spearman. Los resultados mostraron un buen ajuste a este modelo (para SG vs HG, r_s = 0,92; para SG vs CE, r_s = 0,95; p < 0,00001) si bien la función lineal tuvo una pendiente más alta para el caso de la relación entre SG e HG (ver Figura 44). Esto último implica que por cada aumento de 1 ng DTM/mL en SG, ~6 h luego de la administración la concentración en HG fue casi el doble que en CE independientemente de la concentración en SG.

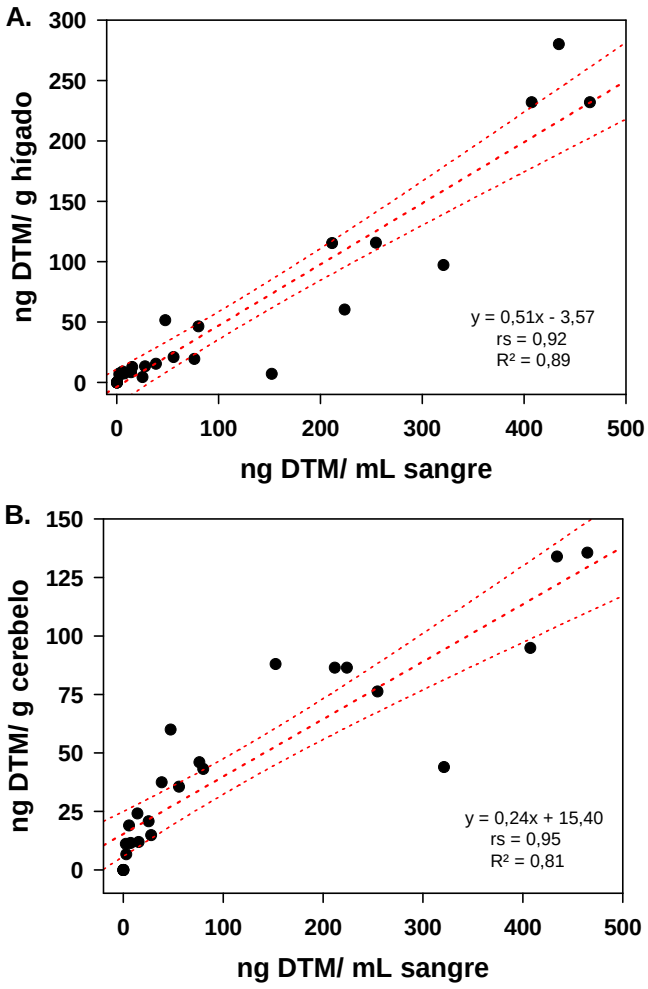


Figura 44. Relación entre la concentración de Deltametrina en hígado y cerebelo con los niveles en sangre. Se muestra la correlación entre las concentraciones de HG *vs* SG

(A) y de CE *vs* SG (B). En los dos casos se obtuvo una correlación alta y significativa ($r_s \geq 0,92$; $p < 0,01$). Cada punto representa la relación de concentraciones en cada animal para los tejidos estudiados.

El análisis de la relación [CE]/[SG] en función del tratamiento administrado muestra una dependencia estadísticamente significativa ($F_{3,17} = 19,42$; $p = 0,00001$) (Fig. 45). Un hallazgo relevante fue que dentro del rango de dosis más bajas (1,5 - 3 mg/kg) se observó un cambio importante en la relación [CE]/[SG]. En cambio, al aumentar la dosis este cociente tendió a estabilizarse a un valor de cercano a 1.

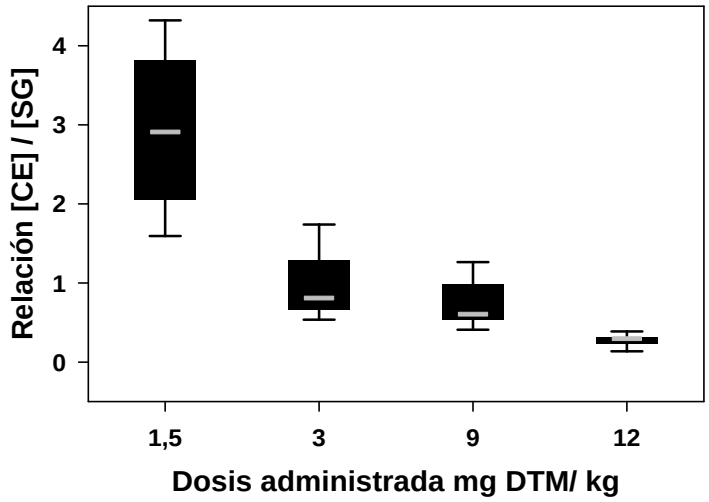


Figura 45. Concentración relativa de Deltametrina en cerebelo respecto a la concentración en sangre en función de la dosis administrada. Para cada nivel de dosis se muestran los valores de la relación [CE]/[SG] entre el cuartil inferior, la mediana y el cuartil superior. N= 4, 4, 4, 7 y 6 para las dosis de C, 1,5, 3, 9 y 12 mg/kg, respectivamente.

7.2.3. Relación entre dosis administrada, concentración en los tres tejidos y efecto sobre la Tsc

7.2.3.1. α-Cipermetrina

El tratamiento con α-CPM (0,5 - 12 mg/kg) influyó sobre la concentración presente en los tejidos (SG, HG y CE; t = ~6 h; Fig. 37 - 38) y el efecto en ΔTsc (Fig. 32 - 33). La Fig. 46 muestra la relación entre dosis administrada, concentración en tejido y efecto sobre la Tsc para α-CPM tomando los tiempos donde se produce el máximo efecto (2,5, 3, 3,5 y 4 h). Durante el período de 2,5 - 4 h se observó la mayor

disminución de Tsc (~1,5 °C) cuando se administraron las dosis más altas 9 y 12 mg/kg. En este rango de dosis el incremento de la concentración de α-CPM en los tejidos fue también evidente. De los 3 tejidos, CE fue el que presentó la mayor concentración de α-CPM en todos los tratamientos (Fig. 46D).

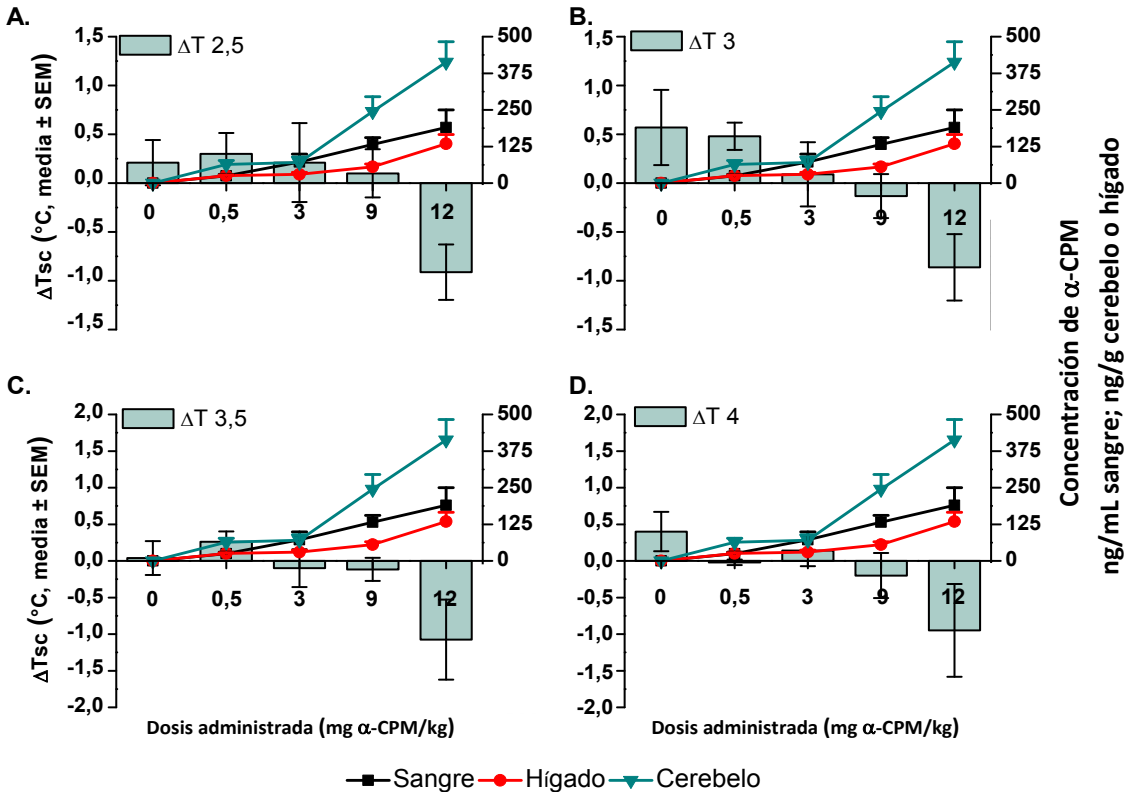


Figura 46. Relación entre la dosis administrada de α-Cipermetrina, la concentración en los tres tejidos y el efecto sobre la Tsc. La relación entre ΔTsc y la concentración en tejidos (ejes Y de la izquierda y derecha, respectivamente) fueron dependientes de la dosis de α-CPM administrada. Se muestran los datos correspondientes al tiempo de máximo efecto (2,5, 3, 3,5 y 4 h post-tratamiento, A – D respectivamente). La concentración en tejidos y ΔTsc se expresan como promedios ($\overline{X}$±SEM).

7.2.3.2. Deltametrina

La relación entre dosis administrada de DTM, su concentración en tejidos y ΔTsc se muestra en la Fig. 47 A - D dentro de los tiempos donde se presentó la mayor variación de Tsc respecto del valor basal (2, 2,5, 3 y 3,5 h) (Figs. 34 y 35). Se observó que, si bien el efecto sobre ΔTsc y la concentración en tejidos variaron conforme lo hace la dosis administrada, el efecto hipotérmico (~ -2,5 °C) y los niveles de DTM en SG, HG y CE se incrementaron en los grupos tratados con las dosis más altas (9 y 12

mg/kg). Para las concentraciones más bajas (1,5-3 mg/kg) los niveles de DTM en los tejidos HG y CE fueron bajos, y el valor de ΔTsc mostró un patrón similar al del grupo control. Si bien el efecto de 1,5 mg/kg sugería un incremento leve en Tsc entre 2 y 3,5 h (~0,3 - 0,5 °C sobre el grupo control) no alcanzó significancia estadística (Fig. 47; $p > 0,05$).

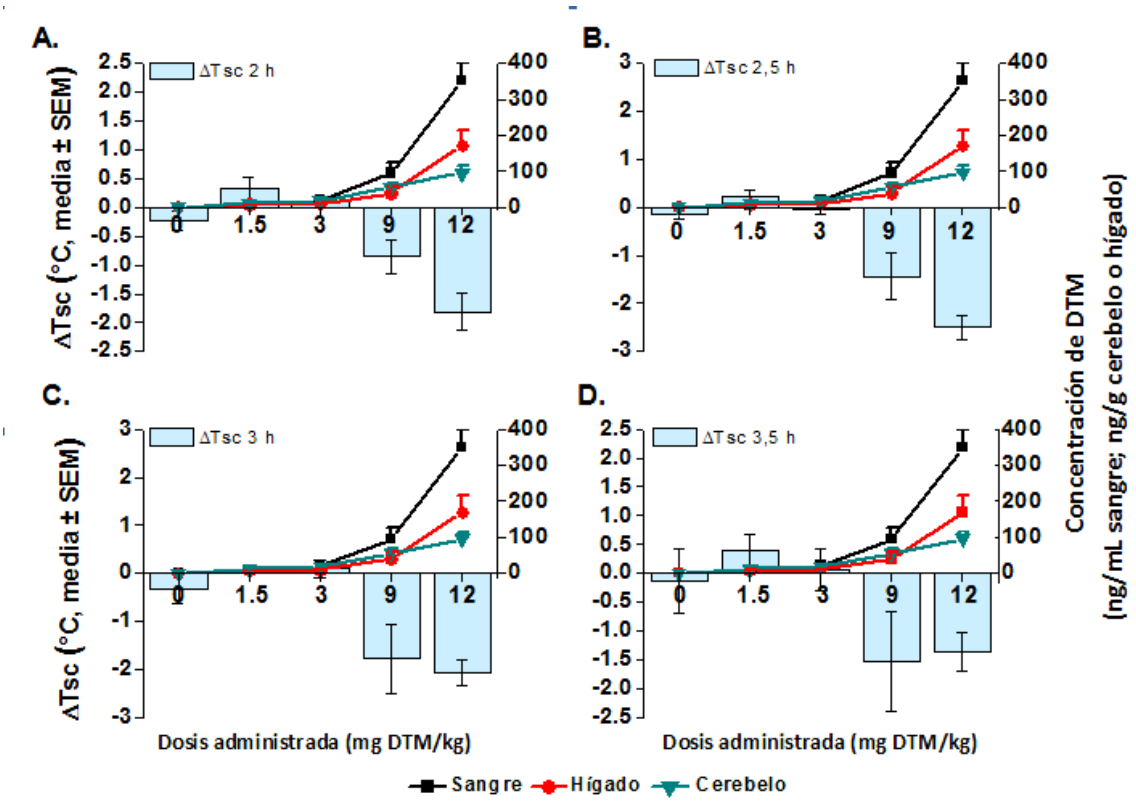


Figura 47. Relación entre la dosis administrada de Deltametrina, la concentración en los tres tejidos y el efecto sobre la Tsc. La relación entre ΔTsc y la concentración en tejidos (ejes Y de la izquierda y derecha, respectivamente) fueron dependientes de la dosis de DTM administrada. Se muestran los datos correspondientes a los tiempos de máximo efecto (t = 2, 2,5, 3 y 3,5 h post-tratamiento). La concentración en tejidos y ΔTsc se expresaron como promedios ($\overline{X}$±SEM).

8. Relación entre dosis administrada, dosis interna, dosis en tejido y efecto sobre la Tsc de la mezcla cuaternaria de los PIRs

8.1. Estimación de la dosis BMD_{30} de cada PIR – Composición de la mezcla cuaternaria

Con el fin de verificar la hipótesis de este trabajo de tesis mediante la aplicación del modelo de dosis aditiva, se seleccionó uno de los PIRs, TEF, como Indice Químico (IQ) y se eligieron las concentraciones equitóxicas de los PIRs que integraron la solución stock de la mezcla cuaternaria (BIF, TEF, α-CPM y DTM) de acuerdo a lo señalado en el capítulo de "Métodos" (sección 5.2.3). Para cada PIR se estimó BMD_{30} utilizando el sistema de modelado BMDS (USEPA). Como ejemplo se muestra el modelado de los datos del experimento de exposición simple a TEF. Las dosis de TEF seleccionadas para el cálculo de la BMD_{30} fueron: 0,1, 3, 6,75 y 7,5 mg/kg (excluyendo la dosis de 9 mg/kg que causaba intoxicación severa) y se estimó un BMD_{30} [TEF] = 5,22 mg/kg (BMD_{30}-L [límite inferior] = 4,61 mg/kg, IC 95%) para el tiempo t = 1,54 h, que coincidió con el tiempo en el que se presentó el efecto máximo sobre la Tsc de este PIR (ver Fig. 18). La Fig. 48 muestra los ajustes para cada animal y cada dosis de TEF a lo largo del período de monitoreo de Tsc, obtenidos como resultado del programa de modelado (ver sección de métodos 5.2.3 y Tabla 6).

Tomando como premisa que los estudios no pretendían usar dosis que separadamente provocaran signos de neurotoxicidad evidentes se seleccionó una dosis (la mitad de BMD_{30}). De acuerdo a la variabilidad intra-grupo del punto final examinado (Tsc), esta fracción de BMD_{30} fue considerada una dosis subtóxica que administrada de manera individual no causaba cambios en Tsc claramente distinguibles respecto a lo observado en el grupo control ni tampoco signos de intoxicación específicos de los síndromes de PIRs tipo I y II (temblores musculares generalizados, hiper-salivación o coreoatetosis). Una vez seleccionadas las dosis de acuerdo a lo señalado en materiales y métodos, se realizó el estudio dosis-efecto de la mezcla.

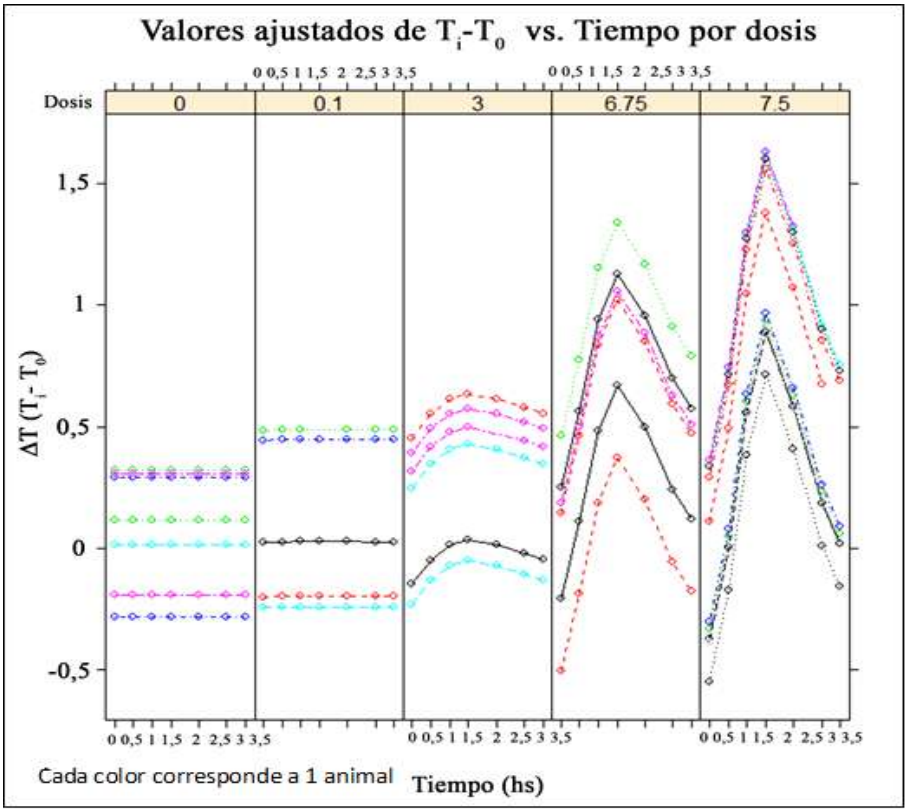


Figura 48. Estimación de la BMD_{30} para el efecto de TEF sobre la Tsc. Se muestran los patrones obtenidos luego del modelado de los datos de Tsc de cada animal monitoreado (líneas punteadas). Además de BMD_{30} se estimó el tiempo (t_{max}) al cual se presentó la mayor diferencia respecto al grupo control. Para TEF, BMD_{30} = 5,2 mg/kg, y t_{max} = ~1,5 h (N = 5 - 8 por grupo de dosis).

8.2. Estudios dosis-efecto de la mezcla cuaternaria de PIRs

La administración oral aguda de la mezcla de PIRs no causó signos de intoxicación grave ni mortalidad. A continuación se presentan los resultados del estudio dosis-respuesta.

8.2.1. Relación entre dosis oral y perturbación de la Tsc

En general, la Tsc previa al tratamiento osciló entre 36,1 - 36,5 °C (36,3 ± 0,5 °C). La Fig. 49 muestra los valores de ΔTsc para todos los grupos experimentales a lo largo del periodo de monitoreo. Se observó que hubo diferencias significativas en ΔTsc en el grupo D3 respecto al grupo control y aparente relevancia biológica dentro del periodo comprendido entre ~1,5 - 4 h. Este rango de tiempo incluyó casi en su totalidad todos los períodos de efecto máximo observados en los experimentos de administración

simple (ver el periodo de máximo efecto experimental de cada PIR en Figs. 16, 18, 32 y 34) y el t_{max} estimado por medio del modelado realizado con el programa BMDS.

La dosis D3 (mezcla stock = 1X) incrementó la Tsc. Los grupos tratados con dosis más bajas (D1 y D2, 0,1 y 0,5X, respectivamente) no mostraron diferencias claras en ΔTsc respecto al grupo control, si bien la dosis intermedia D2 (4,48 mg mezcla/kg) pareció mostrar una tendencia a un leve aumento de Tsc entre 1,5 y 2,5 h, en aparente paralelismo al aumento observado en el grupo D3. El efecto sobre la Tsc fue evidente para el grupo de animales D3 previo al momento del sacrifico.

El análisis estadístico (ANOVA de medidas repetidas) mostró que el Tiempo tuvo una influencia sobre ΔTsc que no alcanzó significancia estadística (p = 0,06), mientras que el factor dosis arrojó diferencias entre individuos (p = 0,04). Además, no se encontró un efecto de la interacción Dosis*Tiempo (p = 0,23).

Al observar los valores de ΔTsc para cada grupo de dosis, se encontró que el tratamiento con D3 provocó un ligero incremento en la Tsc entre 0,5 y 1,5 h. Sin embargo, a las 2,5 h se observó que el valor de ΔTsc fue similar al del control. Lo anterior fue debido a que uno de los animales tratados con esta dosis presentó un comportamiento atípico comparado con el resto del grupo, ya que su temperatura disminuyó en casi 1,5 °C en vez de aumentar como los otros animales de este grupo. Al excluir este valor se observó que el efecto general provocado por la dosis D3 tiende hacia una hipertermia moderada obteniendo un valor pico de diferencia en ΔTsc de 2 °C respecto al valor basal de este grupo experimental, y algo más de 1 °C respecto al ΔTsc del grupo control (Fig. 49). El análisis estadístico se realizó nuevamente luego de excluir al animal con respuesta tóxica atípica del grupo de dosis D3. El ANOVA de Medidas Repetidas (MR) mostró que el efecto del factor TIEMPO (9 niveles) contribuía significativamente como determinante de los cambios en ΔTsc (p = 0,006). Posteriormente al aplicar ANOVA multifactorial (Tiempo - intra-sujeto) y factores sin medidas repetidas (dosis – entre sujetos) el efecto principal DOSIS fue significativamente explicativo del efecto medido (p = 0,001), mientras que la interacción TIEMPO*DOSIS no lo fue (p=0,069). Esto último confirma que la Tsc varió en función de la dosis de mezcla administrada independientemente del tiempo en el cual se monitoreó el efecto.

Posteriormente se realizó el análisis por pares (*post hoc* Tuckey UNEQUAL N HSD) "tiempo *vs* ΔTsc" para cada dosis, como resultado, solamente se presentaron diferencias significativas en el valor de ΔTsc entre 2,5 y 4 h únicamente para la dosis D3. Por su parte, los promedios de ΔTsc en los grupos de dosis D1 y D2 no presentaron significancia estadística en ninguno de los tiempos de monitoreo de Tsc respecto al grupo control.

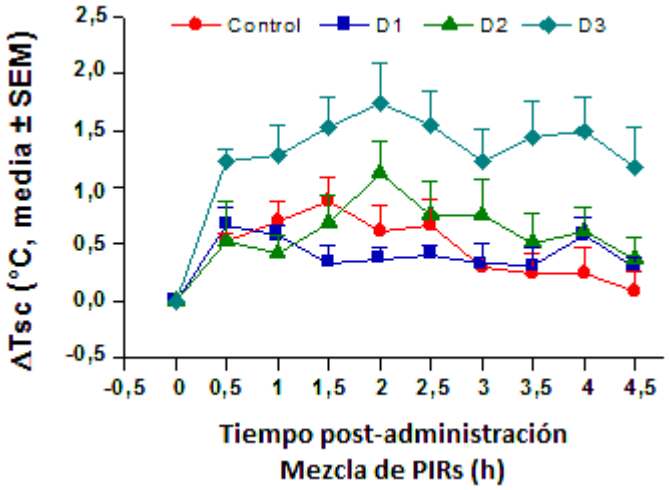


Figura 49. Relación tiempo-dosis-respuesta para la mezcla cuaternaria de PIRs. Monitoreo de Tsc ($\overline{X}$±SEM) entre t 0 y 4,5 h luego de la administración de la dosis de la mezcla cuaternaria de PIRs (BIF, TEF, α-CPM, DTM), en tres concentraciones: D1 (0,895 mg/kg), D2 (4,475 mg/kg) y D3 (8,95 mg/kg).

En resumen, la dosis D1 no provocó cambios en el valor de la ΔTsc respecto al grupo control, mientras que hubo una tendencia a un ligero incremento al administrar D2, por lo cual se podría interpretar que D2 se encuentra dentro del rango de dosis de mínima efectividad de la mezcla cuaternaria examinada.

8.2.2. Observaciones clínicas

Respecto a los cambios observados luego de la administración de la mezcla, las dosis más altas D2 y D3 provocaron signos leves a moderados de neurotoxicidad en la mayoría de los animales. Se observaron episodios transitorios de comportamientos esterotipados, tales como rascado, aseo, sacudidas de cabeza y de todo el cuerpo, y masticación. Estos signos clínicos comenzaron 0,5 - 1 h después de la administración, llegando a extenderse hasta 1,5 - 2 h. Los animales ya no mostraron diferencias

relevantes con los controles en t = 3,5 h. Además, dentro del rango de dosis de mezcla examinado en ningún caso se observó una manifestación clara de los signos de neurotoxicidad que han sido propuestos para la clasificación diferencial de los síndromes que causan dosis altas de PIRs en ratas adultas (tipo T, CS y T/CS), como coreoaterosis, salivación, temblores generalizados notorios y prolongados, agresividad o marcha del tipo "crawling" (*) (McDaniel y Moser, 1993; Soderlund y col., 2002; Wolansky y Harrill, 2008). La ausencia de signos evidentes de intoxicación asociados a la clasificación neurotoxicológica diferencial de los subtipos de PIRs se mostró coherente con la ausencia de cambios marcados en ΔTsc en el rango de dosis D1 - D2. En los animales administrados la dosis mas alta de mezcla (8,95 mg/kg) los cambios en ΔTsc, en comparación al grupo control, fueron en promedio del orden 0,7 - 1,1 °C (Fig. 49).

*Cawling = Locomoción horizontal tipo reptil, con el cuerpo arrastrándose, y los miembros anteriores y posteriores extendidos.

8.3. Concentración en tejidos

La Fig. 50 muestra los cromatogramas de los extractos de muestras obtenidas en el estudio de la mezcla. El t_r relativo de cada analito en la mezcla se mantuvo dentro del mismo rango que el del proceso de validación y lo estimado en los experimentos de administración simple (t_r relativo TEF = 0,76; BIF = 1,67; α-CPM = 2,42 y DTM = 2,87). Durante la identificación y cuantificación, no se presentaron efectos de superposición de picos. La concentración se calculó por el método de la curva de calibración (ver sección Métodos).

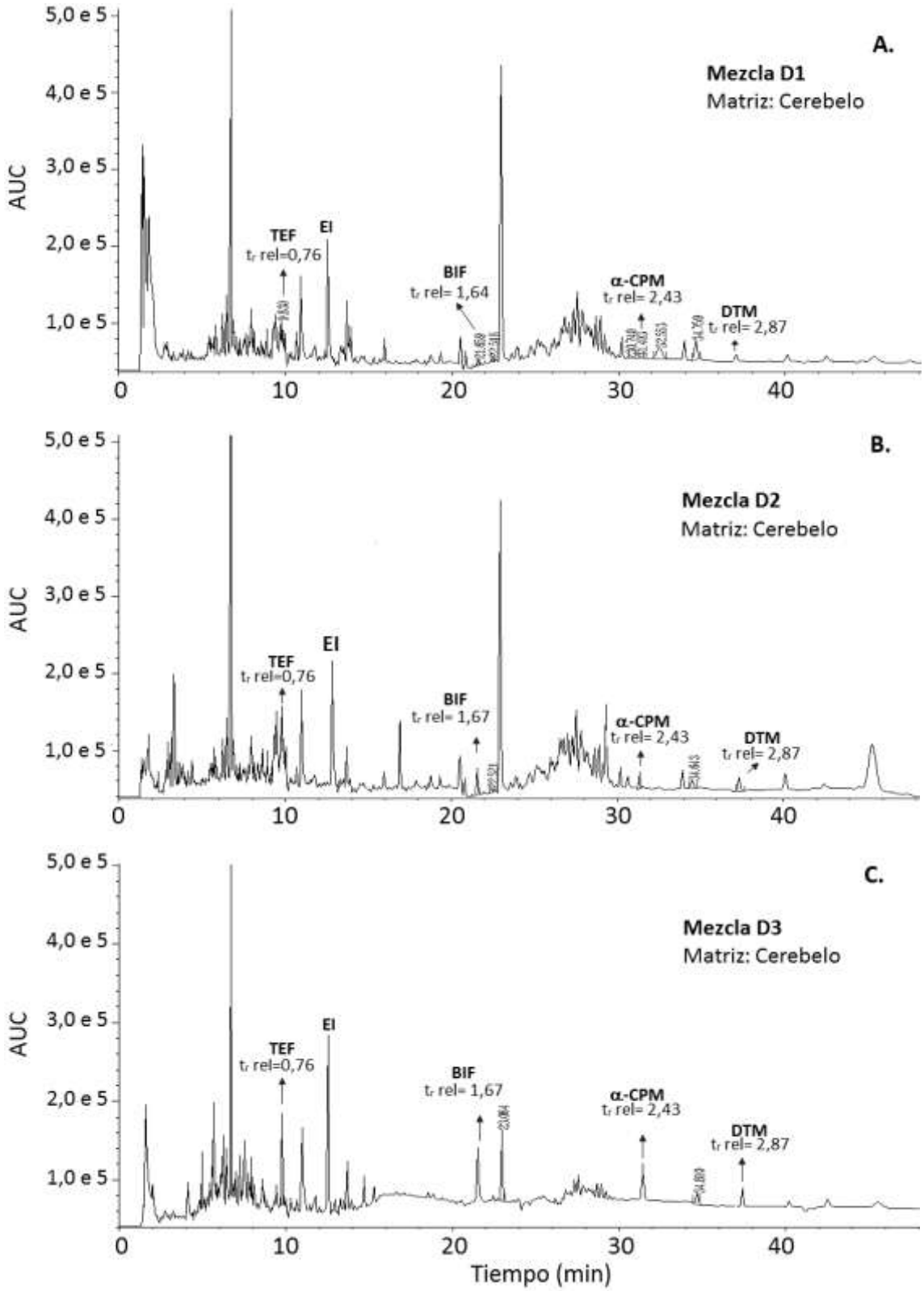


Figura 50. Comatogramas de los extractos de cerebelo luego del tratamiento con diferentes dosis de la mezcla de PIRs. Los paneles A, B y C muestran los cromatogramas correspondientes a los extractos de cerebelo de animales administrados las dosis D1, D2 y D3, respectivamente.

Las concentraciones de insecticidas PIRs en los extractos de los tejidos extraídos de los animales del grupo D1 fueron mayores al LDC. La concentración de PIRs en los tejidos aumentó conforme lo hizo la dosis administrada de la mezcla. Dado que en algunos casos no se cumplieron los criterios de normalidad y homogeneidad de la varianza, se aplicaron pruebas no paramétricas. Para cada tejido, la concentración de PIRs fue dependiente de la dosis administrada (ANOVA de Friedman, $p < 0{,}001$ en SG, HG y CE).

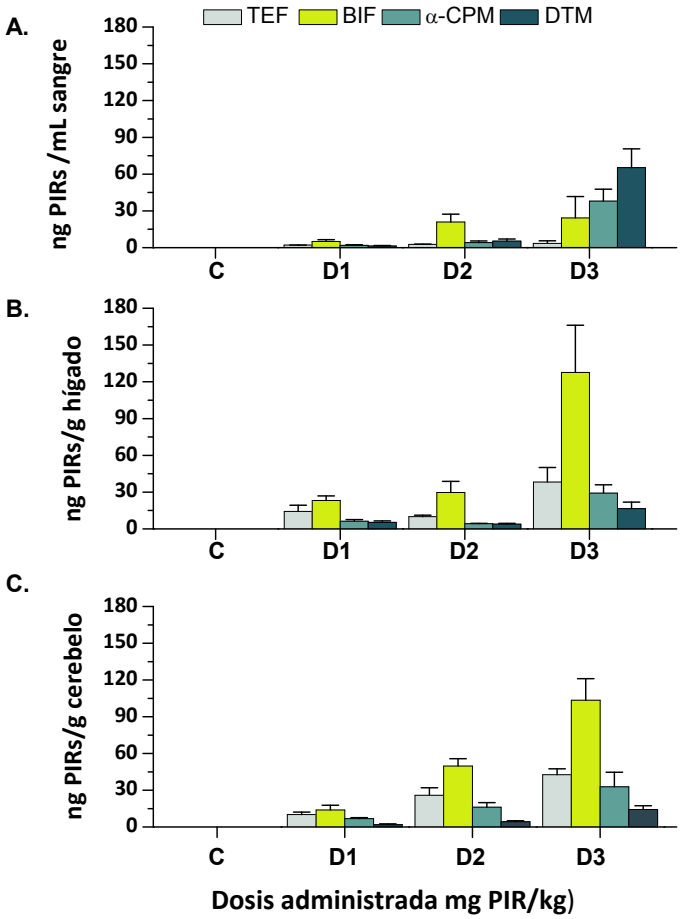


Figura 51. Relación entre las concentraciones de los PIRs en los tres tejidos y las dosis administradas de la mezcla. Se muestran los valores de concentración de los 4 PIRs que integran la mezcla cuaternaria (BIF, TEF, α-CPM y DTM) en los 3 tejidos de ratas tratadas con 3 dosis: D1, D2 y D3. Los resultados se expresan como ($\overline{X}$±SEM) en ng/mL sangre o ng/g tejido.

En la Fig. 51A se observa que para todos los PIRs la concentración promedio en SG fue baja para D1. En el caso de TEF, para todas las dosis de mezcla examinadas la SG fue el tejido donde se encontró menor concentración en comparación a los otros

PIRs. Por otra parte, los niveles de BIF aumentaron ~5 - 6 veces en CE e HG al comparar las dosis D1 y D3 (10 veces más alta que D1). Algo similar fue observado para TEF. En el caso de los ciano-PIRs DTM y α-CPM el aumento en función de la dosis administrada estuvo dentro del mismo rango. Sin embargo, al observar los valores absolutos para todas las dosis, BIF fue el PIR con mayor concentración tanto en HG como en CE, seguido de TEF (paneles B y C).

La concentración de cada PIR en los tejidos varió en función de la dosis administrada (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$), como se podía esperar de acuerdo a lo observado en los estudios de administración simple. A continuación se presentan los resultados:

- **TEF y BIF:** Se encontró que los niveles de TEF fueron menores en SG que en HG y CE, para todas las dosis administradas. Este PIR se encontró en mayor concentración en HG al administrar la D3, mientras que el tratamiento con D2 mostró niveles de TEF en HG más bajos que para D1. Por su parte, la concentración de TEF en CE fue mayor que en el HG para todo el rango de dosis. En el caso de BIF, la concentración en los tres tejidos fue dependiente de la dosis administrada. Para todos los tratamientos se encontró que el tejido con menores concentraciones fue SG, y no hubo diferencias significativas a lo largo de todo el rango de dosis entre CE e HG.

Los resultados de las concentraciones de BIF y TEF coincidieron con las concentraciones de ambos PIRs encontradas en los estudios de administración simple (ver puntos 7.1.2.1 y 71.2.2 en la sección Resultados). De esta manera, para los dos no ciano PIRs que integran la mezcla cuaternaria, la dosis administrada tuvo efectos significativos en la concentración hallada en los tres tejidos (ANOVA de Kruskal-Wallis; $p < 0,05$).

- **α-CPM y DTM:** Para α-CPM, la mayor concentración hallada fue en CE cuando se administraron las dosis D1 y D2, mientras que para la dosis D3 se incrementaron los niveles en SG. En el caso de DTM, no se observaron diferencias entre los tejidos para las dosis D1 y D2, sin embargo, en el caso de la D3 la concentración en SG superó en casi 3 veces la de HG y CE. Este último hallazgo fue sorpresivo a juzgar por los antecedentes, teniendo en cuenta las tendencias que se observaron para α-CPM y DTM en los experimentos de administración simple (Fig. 38 y 43), y la relación dosis

administrada *vs* concentración de DTM en tejidos en el estudio de la mezcla (Fig. 52). La estructura de DTM sólo difiere de α-CPM en 2 halógenos en la porción ácida del éster (Fig. 5) (ver Discusión).

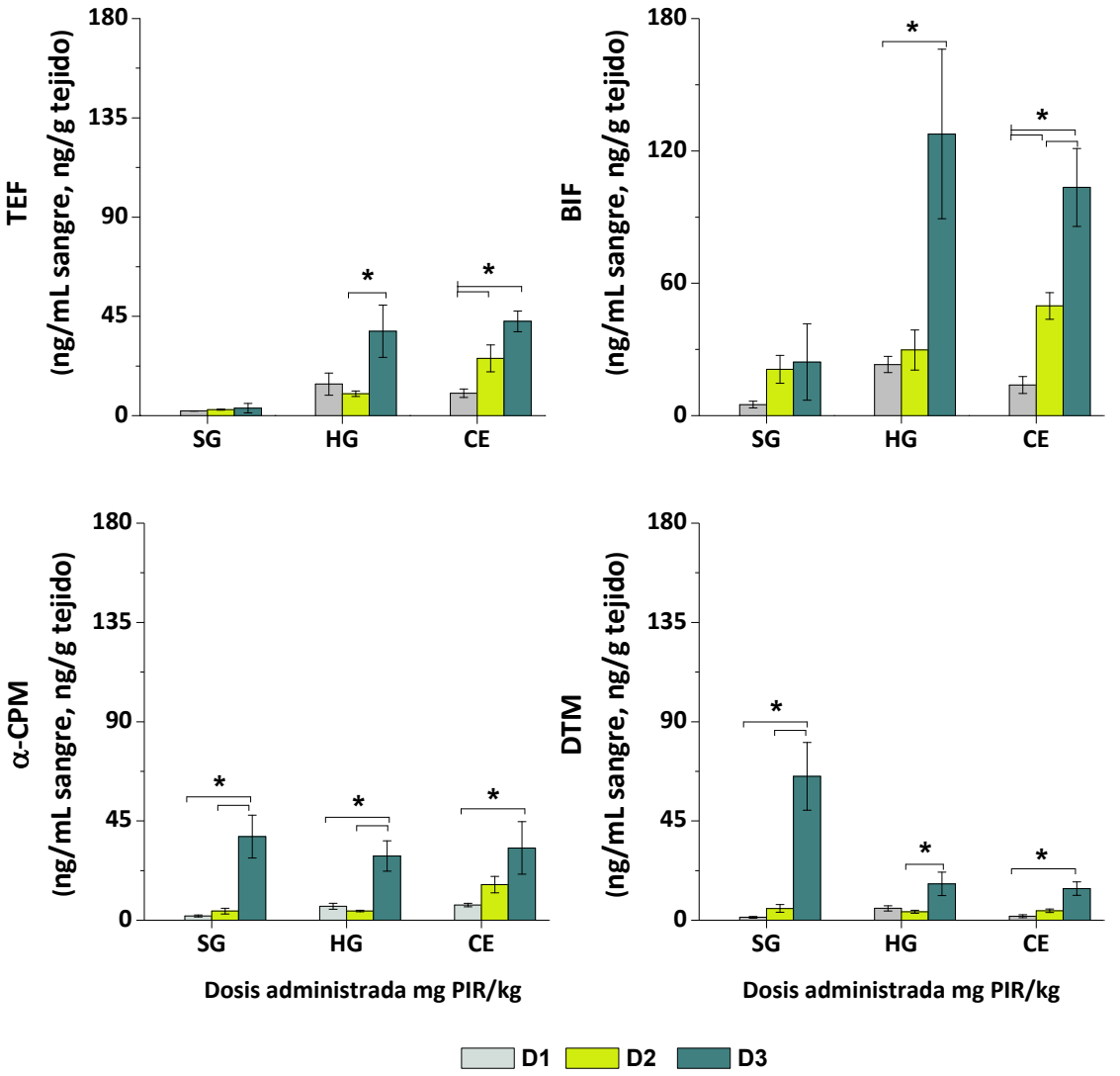


Figura 52. Distribución de PIRs en los tejidos (sangre, hígado y cerebelo) en función de la dosis administrada de la mezcla cuaternaria. Se muestran los niveles de concentración de cada PIR en los tejidos estudiados para 4 tratamientos: (D1, D2 y D3). Los resultados se expresan como la media de concentración (ng/mL sangre, ng/g tejido) ($\overline{X}$±SEM). Las diferencias significativas de los niveles de PIR entre los tejidos para cada dosis se marcaron con * ($p < 0,05$).

El análisis por pares se realizó para cada tejido por separado usando la prueba Wilcoxon. En el caso de TEF y BIF, se presentaron diferencias entre las concentraciones determinadas en HG y CE al comparar D1 vs D2, si bien esto no

alcanzó significancia estadística en algunos casos. Además, BIF pero no TEF (Fig. 52, paneles superiores derecho e izquierdo, respectivamente) mostró tendencia clara a una mayor concentración en los tejidos HG y CE que en SG en el grupo D1. Por su parte, las concentraciones de α–CPM y DTM mostraron aumentos estadísticamente significativos ($p < 0,05$) en el grupo de la dosis D3 respecto al grupo de las dosis más bajas (D1) en los tres tejidos. También para la dosis mas alta, en SG se presentaron niveles mayores de estos ciano-PIRs en comparación a TEF y BIF (Fig. 52, comparar paneles superiores *vs* inferiores).

En resumen, se observó que a medida que la dosis administrada de la mezcla se incrementó, la concentración de BIF en HG y CE (ambos tejidos ricos en lípidos) aumentó más rápido (~4 - 6 veces) que en SG (~3 - 4 veces). Si bien esto ocurrió también con los otros PIRs estudiados, la magnitud de la concentración en CE no fue tan pronunciada en esos casos. En el caso de BIF alcanzó una concentración de ~105 ng/g en CE, mientras que los otros PIRs llegaron a una concentración máxima de 14 - 43 ng/g tejido (Fig. 52).

8.4. Comparación entre los resultados de los estudios de administración simple *vs* mezcla

8.4.1. Ajuste del efecto sobre la Tsc a partir del cálculo de las potencias relativas y equivalentes de TEF en función de la BMD_{30}

Luego de aplicar el modelo de potencias relativas (Dinse y Umbach 2013; USEPA 2003) para cada PIR de la mezcla se calcularon los equivalentes de TEF (EQ_{TEF}) (Tabla 12) aplicando la ecuación 2. El valor de EQ_{TEF} para D3 corresponde a:

$$EQ_{TEF}\ D3 = [2,61\ mg/kg*1] + [3,41\ mg/kg*0,76] + [2,03\ mg/kg*1,29] + [0,90\ mg/kg*2,90]$$

$$EQ_{TEF}\ D3 = 10,44\ mg/kg$$

Los valores de EQ_{TEF}, tanto para los PIRs individuales como los de la mezcla se consignan en la Tabla 12.

Tabla 12. Concentraciones de las dosis en el experimento de mezcla (D1, D2 y D3) y sus correspondientes equivalentes de TEF (EQ_{TEF}) calculados a partir de la BMD_{30}. Las dosis de cada PIR, BMD_{30} y EQ_{TEF} se expresan como mg/kg.

PIR	BMD_{30} mg/kg	Potencia relativa	½ BMD_{30} mg/kg D3	EQ_{TEF} mg/kg	¼ BMD_{30} mg/kg D2	EQ_{TEF} mg/kg	$^1/_{20}$ BMD_{30} mg/kg D1	EQ_{TEF} mg/kg
TEF	5,22	1,00	2,61	2,61	1.31	1,31	0,26	0,26
BIF	6,82	0,76	3,41	2,61	1,71	1,31	0,34	0,26
α-CPM	4,06	1,29	2,03	2,61	1,02	1,31	0,20	0,26
DTM	1,80	2,90	0,90	2,61	0,45	1,31	0,09	0,26
EQ_{TEF} mg/kg	**17,9**		**8,95**	**10,44**	**4,48**	**4,49**	**0,89**	**1,04**

Mediante la interpolación en la curva dosis-respuesta de TEF en t = 2 h (ver Fig. 18) se calcularon los ΔTsc teóricos correspondientes a cada valor del EQ_{TEF} obtenido mediante la conversión de cada dosis D1, D2 y D3 de la mezcla en mg/kg de EQ_{TEF}. Luego, usando un ajuste exponencial (f = y0 + a * exp (b * x), *p*=0,77) se compararon los valores de ΔTsc teóricos con los valores experimentales de ΔTsc obtenidos en el estudio de la mezcla cuaternaria. El ajuste se realizó tomando como concentración máxima 9 mg/kg ya que en la curva dosis-respuesta ajustada el valor de EQ_{TEF} = 10,44 mg/kg, correspondiente a la dosis D3, quedaba fuera del rango examinado en el estudio de administración simple.

En la Fig 53 se observan los ΔTsc teóricos-predictivos (círculos de color rojo) y experimentales, encontrándose que el valor experimental es levemente mayor al predictivo (pero sin significancia estadística dado que la diferencia está dentro del rango de variabilidad biológica dentro y entre grupos) para los 3 niveles de dosis de EQ_{TEF} estudiados (1,044 – 10, 44 mg/kg). Sin embargo el ΔTsc correspondiente a la dosis de 9 mg/kg del IQ TEF fue mayor que el ΔTsc observado luego de administrar la dosis D3 de la mezcla (que contenía 10,4 mg/kg de EQ_{TEF}). Así, la administración de la mezcla cuaternaria de PIRs causó un aumento leve a moderado de Tsc, con prevalencia aparente del efecto de BIF y TEF (aumento de Tsc, típico de PIRs sin grupo ciano) cuando se considera t = 2 h luego de administración, este tiempo se seleccionó como relevante dentro del período de efectos máximos tanto para los efectos simples de los PIRs como para la mezcla. Como se mencionó en el párrafo anterior, la dosis 9 mg/kg de EQ_{TEF} se consideró una aproximación aceptable para el valor calculado de EQ_{TEF} 10,44 mg/kg correspondiente a la dosis D3 de la mezcla.

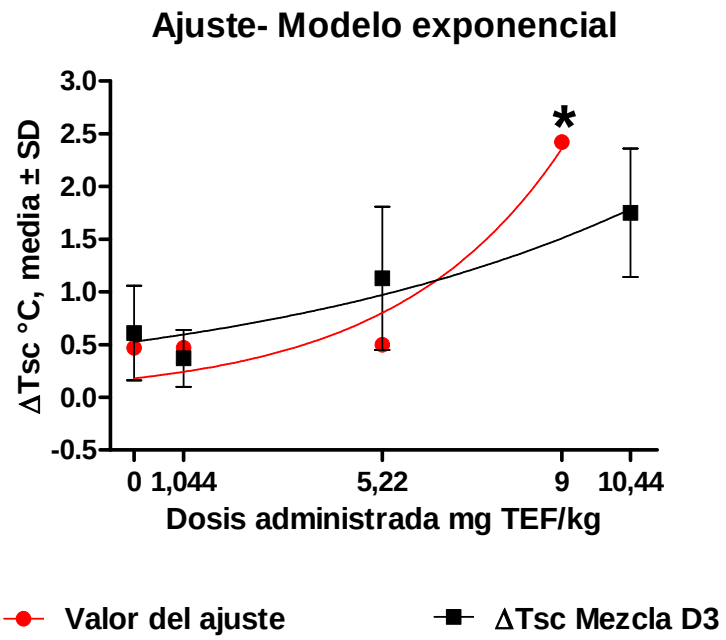


Figura 53. Comparación de los valores de ΔTsc experimentales obtenidos en el estudio de la mezcla y cada ΔTsc teórico-predictivo correspondiente a los de EQ_{TEF} en t = 2 h aplicando un modelo exponencial. La curva con círculos describe los ΔTsc obtenidos por interpolación a partir de la curva dosis-respuesta de TEF (administración simple), usando como valores del eje X las dosis de EQ_{TEF} (1,04, 5,22 y 10,44* mg/kg) calculadas para cada dosis de mezcla.

* marca el ΔTsc correspondiente a la dosis 9 mg/kg de EQ_{TEF}. A partir del ajuste de los datos se obtuvieron los parámetros: **y0= 0,47 a= 0,00009 b= 1,10; R^2 =0,52.**

8.4.2. Concentración y porporción de los PIRs en los tejidos. Comparación entre los resultados de los estudios de administración simple *vs* mezcla

Una vez determinada la concentración de los PIR en los tejidos estudiados en el experimento de la mezcla, se calculó la proporción en la que cada uno se encontraba y se comparó con la fracción masa/masa que aporta cada PIR a la mezcla administrada. En la Fig. 54 se observa que las proporciones entre dosis administrada y concentración en tejido tienden a mantenerse para todos los tratamientos en HG y CE independientemente de la dosis de mezcla considerada. Sin embargo, en SG se presentaron variaciones mayores de los porcentajes de los PIRs respecto a la composición de la mezcla, especialmente en la dosis D3. En el caso de BIF, puede observarse la tendencia a mantener la mayor proporción en los todos los tejidos y en

todos los tratamientos, a excepción de la D3 en SG, en el cual DTM se encuentra en un 50% respecto al 18% de BIF.

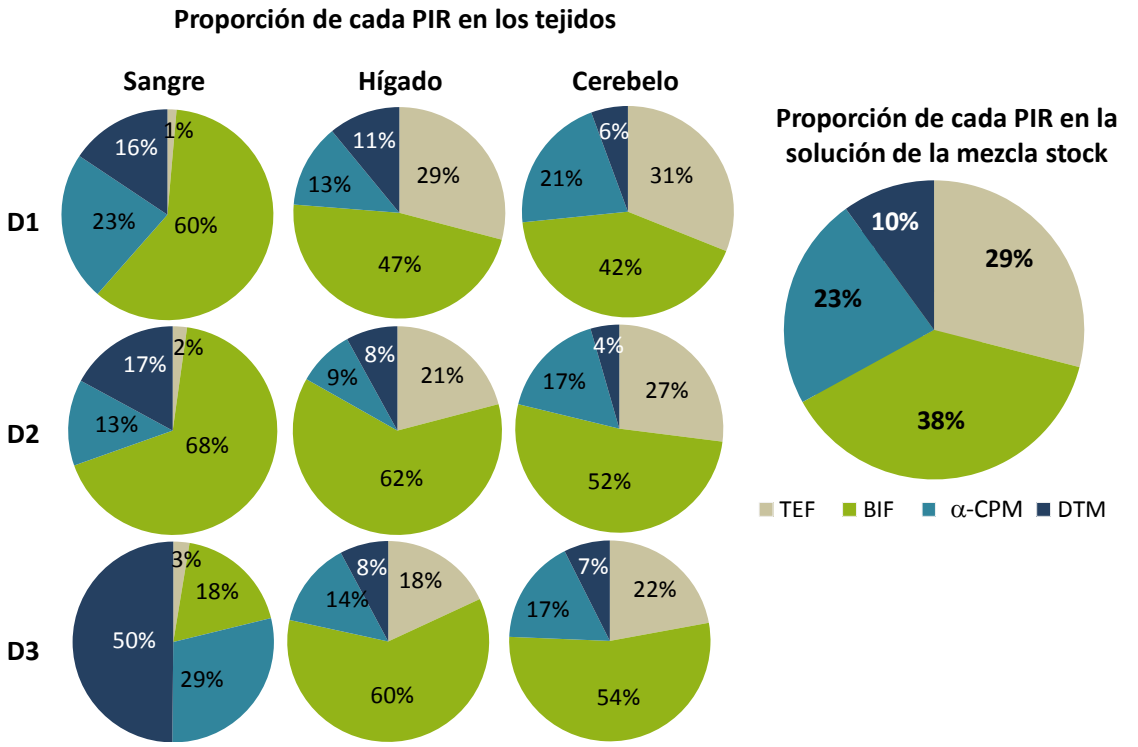


Figura 54. Comparación entre las proporciones de los PIRs en la solución administrada y su distribución en los tejidos luego de administrar la mezcla.

Tomando estos resultados se puede interpretar que la concentración de cada PIR en HG y CE puede estimarse con cierta aproximación a partir de las proporciones en la que los PIRs se encuentran en la mezcla. El sistema nervioso (en este caso representado por el cerebelo) es el tejido blanco primario. Por eso, la similitud de proporciones es un hallazgo importante dado que parece sugerir que conociendo un escenario determinado de coexposición ambiental o alimentaria uno podría anticipar cuánto se va a hallar en tejidos susceptibles. Sin embargo, el conocimiento sobre la fracción de cada PIR en la mezcla no informa sobre la concentración absoluta que se mantiene en el tejido, y si esos ng/g superan los niveles mínimos que generan neurotoxicidad. En consecuencia, en este trabajo de tesis fue relevante comparar las concentraciones de los PIRs presentes en CE luego de la coadministración de los mismos (estudio de la mezcla) con las concentraciones que se habían medido luego de administrar cada PIR separadamente (estudios de administración simple). Previo a la comparación *administracion simple vs*

mezcla se debía disponer de valores de dosis administrada en cada estudio de administración simple idénticos a los valores combinados en las 3 dosis examinadas en el estudio de la mezcla. Al no presentarse coincidencia entre las dosis empleadas en ambos estudios, fue necesario ajustarlas a partir de las curvas de los experimentos de administración simple (Figs. 21, 26, 38 y 43). Las concentraciones estimadas en los tejidos (interpolando mediante el ajuste matemático aplicado a cada caso) para cada dosis de cada PIR corresponden a la dosis individual que cada uno aporta en la mezcla (Tabla 14). El ajuste matemático con mejor ajuste fue el de regresión polinomial de segundo orden. Aplicado la ecuación 4 se calcularon las concentraciones teóricas en CE.

$$y = y0 + ax + bx^2 \quad (4)$$

Donde:

y = Concentración teórica en ng/g
$y0$ = Concentración cuando x es = 0
a = Coeficiente de x
b = Coeficiente de x^2

Para este análisis comparativo, la matríz biológica más relevante era el sistema nervioso central dada su relación etiológica al mecanismo de toxicidad aguda de los PIRs en rata (Soderlund y col. 2002; Krieger 2010). Las comparaciones entre los valores teóricos y experimentales para los 4 PIRs en CE se muestran en la Fig. 55. Como resultado del ajuste se obtuvo que las concentraciones esperadas (las ajustadas a partir de los resultados de los estudios de administración simple) de TEF y BIF fueron menores que las observadas para todas las dosis de mezcla evaluadas, lo cual fue más evidente para TEF (Fig. 55 A - B). Por su parte, los ciano PIRs mostraron menores niveles en CE respecto a los valores teóricos-esperados. Esto parece sugerir que TEF y (especialmente) BIF fueron los PIRs que mayor contribución tuvieron a la acción de la mezcla sobre Tsc en los últimos tiempos monitoreados (t = 2 - 5 h) antes del sacrificio de los animales (t = 6 h).

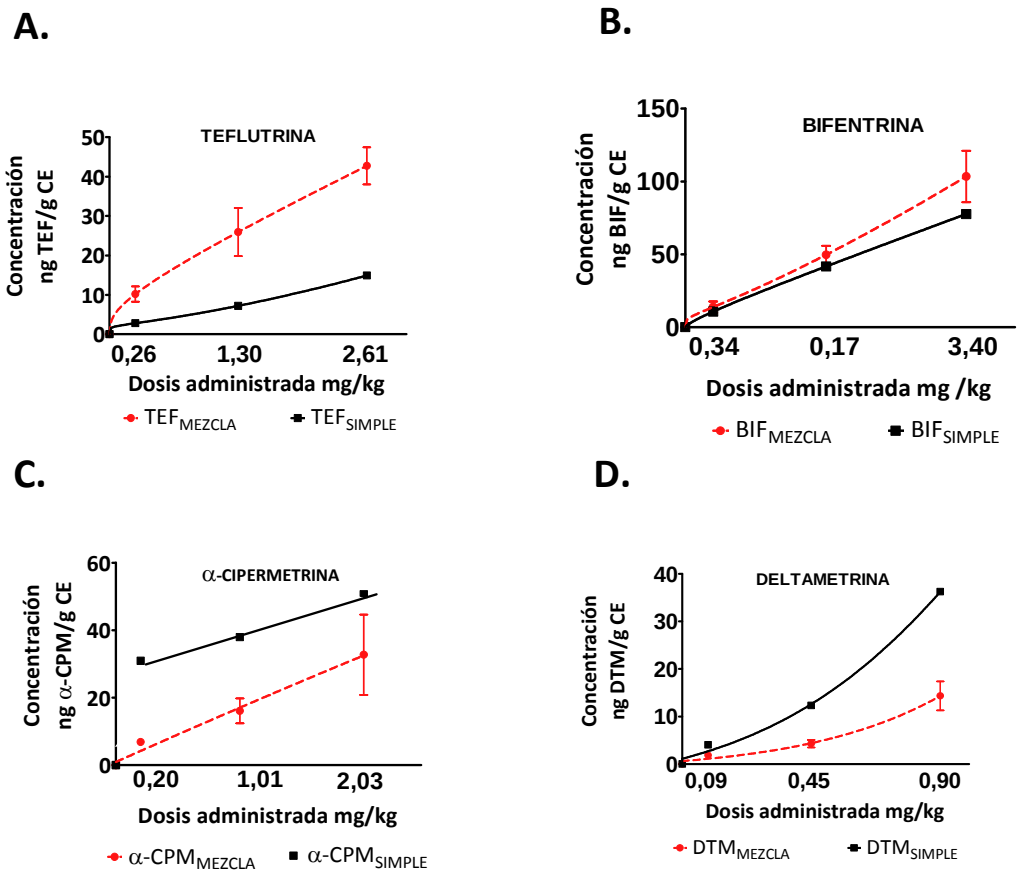


Figura 55. Análisis comparativo entre las concentraciones de los PIRs en cerebelo luego de la administración simple (uno a la vez) y la administración simultánea (mezcla) (Figs. 21, 26, 38 y 43). Los valores en X corresponden a la dosis que aporta cada PIR en cada dosis examinada de la mezcla cuaternaria (Tabla 12). Las concentraciones observadas en el estudio de la mezcla se expresan como $\overline{X}$±SEM.

Adicionalmente se calcularon las proporciones teóricas para los 3 tejidos para la dosis de mayor concentración de la mezcla D3, aplicando el mismo criterio antes mencionado. Los resultados se muestran en la Fig. 56. Al realizar la comparación entre las concentraciones obtenidas experimentalmente con los valores esperados (predicción teórica estimada aplicando ajuste polimomial) se observó que en SG el único PIR que no presentó variación en la proporción entre el estudio de la mezcla y el de administración simple fue TEF. En el caso de BIF y α-CPM las proporciones en el experimento fueron la mitad de las estimadas teóricamente, mientras que en el caso de DTM se presentó un aumento desproporcionado (~7 veces).

En HG se observaron incrementos en la proporción experimental de TEF, α-CPM y DTM respecto a los valores teóricos esperables según los resultados de los

experimentos de exposición simple. Este hecho vino acompañando de la disminución de la proporción de BIF.

Por su parte en CE la proporción de BIF no mostró diferencias entre el estudio del experimento de la mezcla y el de administración simple. Para TEF y DTM en cambio se observaron aumentos moderados y α-CPM presentó la mitad de la proporción esperable según el estudio de exposición simple.

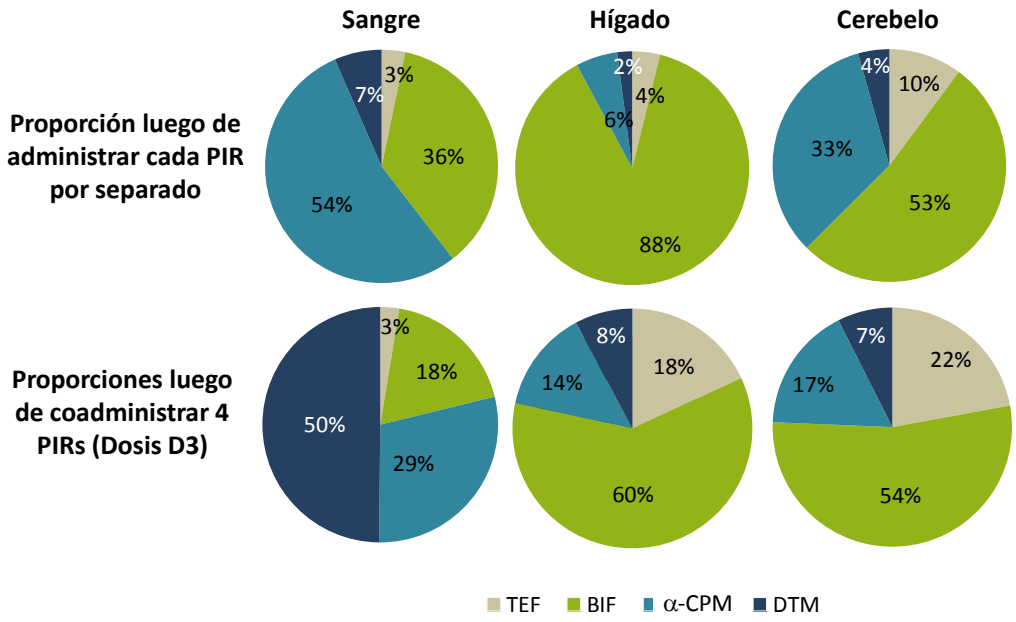


Figura 56. Concentración porcentual de los PIRs en los tejidos en los estudios de administración simple *vs* combinada. La figura muestra una comparación entre el experimento de coadministración de los 4 PIRs (dosis D3 de la mezcla) y los valores que resultaron al administrar las mismas dosis de cada PIR pero separadamente.

DISCUSIÓN

9. DISCUSIÓN

9.1. Importancia de los estudios de mezclas de plaguicidas – Administración simultánea de múltiples PIRs

Los seres humanos estamos expuestos diaria y simultáneamente a una multiplicidad de sustancias químicas que tienen distintas propiedades fisicoquímicas, distinta estabilidad dentro de los organismos vivos y diferentes mecanismos de acción. Entre estas sustancias se encuentran los PIRs, una clase de insecticidas, cuyo efecto neurotóxico agudo ha sido extensamente investigado usando diversos marcadores de efecto y evaluaciones toxicocinéticas (Soderlund y col 2002, 2012; Wolansky y Harrill, 2008; Wolansky y Tornero-Velez, 2013; Krieger, 2010). Un acercamiento a la definición de los efectos que causan los PIRs en mamíferos (incluyendo al hombre) son los estudios *in vivo* de administración simple que han permitido caracterizar la acción tóxica de muchos de estos insecticidas (principalmente en rata y ratón). Es importante enfatizar que muchos de esos estudios usaron vías de administración que no son las de mayor relevancia para la población general (administración intracerebral, intraperitoneal o intravascular). Por otro lado, las investigaciones en animales de laboratorio de los años 70's - 80's utilizaron dosis que causaban intoxicaciones agudas moderadas-severas que extrapoladas a escenarios de exposición humana serian tan altas que resulta improbable que ocurran bajo condiciones ambientales, ocupacionales o alimentarias realistas, salvo en situaciones de exposición accidental o de intentos de suicidio. Por ejemplo, una dosis oral aguda de DTM de 9 mg/kg es suficiente para causar signos neurotóxicos típicos de los PIRs tipo II en ratas adultas jóvenes (Wolansky y col., 2006; Wolansky y Harrill, 2008), pero en personas de 20 – 60 kg significaría una ingesta oral aguda en pocos minutos de 180 - 540 mg/kg de DTM, y mucho más si se tiene en cuenta que en los productos plaguicidas comerciales los ingredientes activos representan solo un porcentaje menor de la formulación. Los estudios de exposición simple a dosis intermedias-altas tampoco permiten determinar lo que ocurriría si existieran condiciones de exposición combinada ya sea generando fenómenos de aditividad, antagonismo o sinergia. Por eso, la información obtenida en estudios de exposición simple a dosis relativamente altas en animales de laboratorio es solo un primer paso en la evaluación del riesgo por exposición a PIRs.

Los aportes del presente trabajo que contribuyen al estudio de mezclas de PIRs fueron:

a. Obtener descripciones de la relación entre el efecto sobre la Tc y la distribución de PIRs en tejidos que no habían sido estudiados previamente en rata luego de la administración oral aguda de dosis subletales (en el caso de TEF y α-CPM), o que no habían sido evaluados en estudios de mezclas (en el caso de BIF, TEF y α-CPM).

b. La selección de 4 PIRs para formar la mezcla que se ha documentado que podrían estar simultáneamente en un mismo ambiente de concurrencia humana (Tulve y col., 2006), y que además se ubican entre los más potentes de la clase PIR con valores de $DL_{50\ oral/rata}$ entre 20 - 100 mg/kg (WHO, 2010).

c. La concentración de cada compuesto en la mezcla seleccionada representa un caso extremo de coexposición a 4 de los PIRs más tóxicos, cada uno en dosis individualmente bajas (desde 0,9 a 3,4 mg/kg según lo combinado en la mezcla stock, o aún menos en las dosis D1 - D2) que no causan signos de intoxicación severa según todos los estudios disponibles de administración oral en rata (Soderlund y col., 2002; Wolansky y Harrill, 2008; Krieger, 2010). En el estudio dosis-efecto **la dosis más baja de la mezcla cuaternaria evaluada fue 10 veces menor que la dosis de la mezcla stock, por lo cual el rango de dosis examinado se extendió hasta valores más bajos, 0,09 a 0,34 mg/kg**.

d. Hasta el momento de iniciado este trabajo, solo se habían evaluado 2 mezclas de dosis bajas de PIRs en condiciones similares de exposición oral aguda que indicaban la ocurrencia de lo que se denomina aditividad (Wolansky y col., 2009; Starr y col., 2012). En esta investigación se exploró: i) si se mantenía el efecto aditivo al utilizar otro indicador de efecto dependiente del tipo de PIR examinado como es el control de la Tc, y ii) si la absorción y captación en tejidos de cada PIR se alteraba por el solo hecho de ser co-administrado junto a otros PIRs, es decir, si había alguna sugerencia de interacción a nivel toxicocinético.

9.2. Piretroides seleccionados

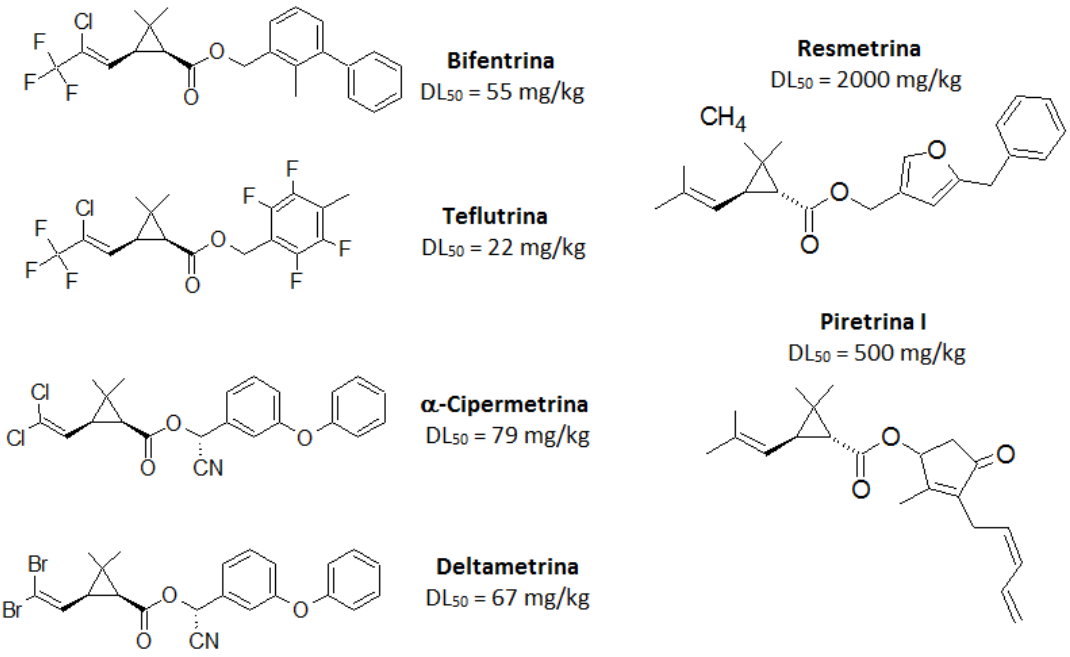
De los 4 PIRs seleccionados, solamente para DTM se han realizado estudios similares de administración simple y en mezcla que evaluaron la relación entre dosis oral administrada, concentración en tejidos y efectos tóxicos, lo cual representó un antecedente relevante para el diseño experimental de esta tesis (ver Tabla 17). Para TEF, BIF y α-CPM no existían trabajos previos de evaluaciones de la relación entre dosis administrada, concentración en tejidos y efectos tóxicos luego de la administración de una mezcla que incluyera a estos PIRs. En el caso de α-CPM lo más cercano son los estudios desarrollados para Cipermetrina (Starr y col., 2012; 2014). Para BIF, en los últimos años se han publicado algunos trabajos estudiando los determinantes toxicocinéticos en caso de exposición oral (Scollon y col., 2011; Hughes y col., 2016a; Gammon y col., 2015) y dermal (Hughes and Edwards, 2016).

Todos los PIRs examinados tienen carbonos quirales que determinan la existencia de proporciones variables de isómeros *cis* y *trans* en las preparaciones comerciales (Soderlund y col., 2002). Los PIRs TEF, BIF, α-CPM y DTM contienen una alta proporción del isómero *cis* cuyo efecto tóxico en general es más potente que la configuración *trans* (Soderlund y col., 2002; Wolansky y Harrill, 2008). Estas diferencias han sido bien estudiadas y caracterizadas por diversos autores en roedores (por ejemplo, Lawrence y Casida, 1982; Ghiasuddin y Soderlund, 1984) en donde la diferencia de toxicidad (DL_{50}) entre los isómeros de un mismo PIR puede llegar a ser hasta 20 veces (WHO, 2005; Wolansky y Tornero Velez, 2013). Por otro lado, se ha determinado que los PIRs con configuración *cis* se hidrolizan más lentamente que los *trans*. Estas diferencias metabólicas podrían contribuir a su mayor toxicidad (Anadón y col., 1991, 1996, 2006; Soderlund y Casida 1977). Los únicos estudios de mezclas de PIRs que existían al momento de iniciada la tesis (Wolansky y col., 2009; Marshall y col., 2013) habían evaluado 2 mezclas cuya composición masa/masa de más del 50% de los PIRs empleados eran compuestos racémicos, es decir, solo una fracción de la mezcla correspondían a isómeros *cis*. En cambio, aquí se combinaron 4 preparaciones de PIRs ricas en los isómeros más activos (Fig. 57A).

Resulta pertinente enfatizar la diversidad estructural que han ido presentando los PIRs durante su historia de investigación y desarrollo. Al comparar las estructuras de los 4 PIRs modernos estudiados con la de la Piretrina I (el compuesto más potente como

insecticida de los derivados naturales del piretro) y con los PIRs sintéticos más antiguos como la Resmetrina (Fig. 57A), se observan varios cambios en la fracción alcohólica de la molécula y en la del ácido ciclopropanocarboxílico. La incorporación de sustituyentes aromáticos y grupos halógenos incrementaron la estabilidad química de estos compuestos, así como también su actividad y efecto en los sitios principales de acción en las plagas que se buscaba controlar (Katsuda, 1999). De la misma manera, en paralelo a la expansión de la divergencia estructural entre los PIRs se verifica una tendencia marcada a valores de DL_{50} considerablemente menores que el de los PIRs sintéticos desarrollados en los años 50's - 60's (Wolansky y Harrill, 2008). Los compuestos estudiados se encuentran entre los más tóxicos sintetizados en su clase (Fig. 57B).

A.



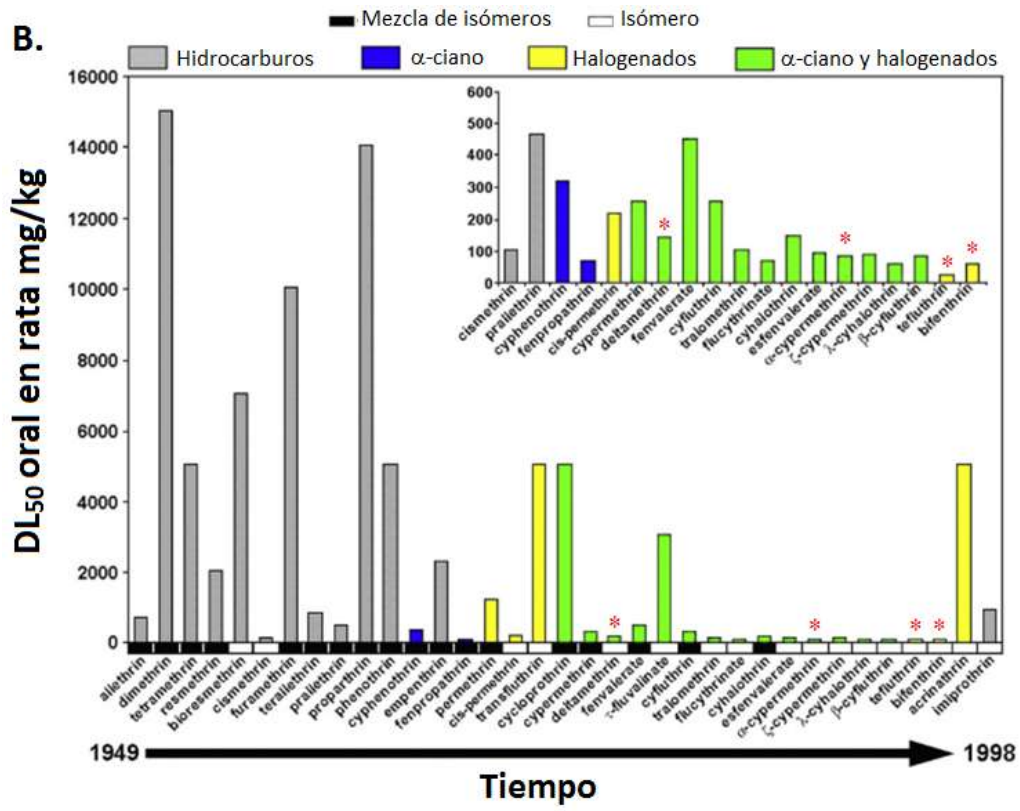


Figura 57. Diversidad estructural y toxicológica entre PIRs. Estructuras químicas de los PIRs modernos examinados, la piretrina natural Piretrina I y uno de los primeros PIRs sintéticos, Resmetrina. Se muestra la divergencia estructural entre piretrinas y PIRs por incorporación de sustituyentes arómaticos y halógenos (A) y el amplio rango de DL_{50} que se ha estimado en ratas adultas (B). En el panel B se marcan en blanco los PIRs (Por ejm. TEF) que son comercializados como preparaciones ricas en 1 – 2 de los isómeros mas activos de cada compuesto quiral (tomado de Wolansky y Harrill, 2008).

9.3. Medida de efecto

El efecto evaluado fue Tsc. Los mamíferos tienen la capacidad de mantener la homeostasis a través de mecanismos de regulación de la temperatura corporal (Tc) (Gordon 2005; Blumberg y Sokoloff, 1997). Una leve variación en Tc puede provocar cambios fisiológicos vitales. Este parámetro ha demostrado ser sensible al tratamiento de ratas adultas dosificadas oralmente con PIRs. Se han reportado varios estudios que muestran claramente cambios en la Tc, ya sea rectal, subcutánea o intraperitoneal, dependientes de la dosis aguda administrada y la edad de los animales (Wolansky y Harrill, 2008; Wolansky 2007a; Bardullas y col., 2015; Gordon, 2005). Los PIRs provocan una respuesta diferencial sobre la Tc. Dosis intermedias-altas de la mayoría de los ciano-PIRs causan hipotermia; en cambio, la mayoría de los PIRs sin grupo ciano producen hipertermia.

Se han propuesto distintas explicaciones para evaluar los efectos diferenciales de los PIRs en el control de la Tc (Hainsworth, 1967; Soderlund y col., 2002; Gordon; 2005; Gordon y col., 2008). La acción tremorigénica potente (temblores musculares), especialmente en los PIRs sin grupo ciano, podría deberse a una actividad metabólica y neuromuscular exacerbada que en paralelo provoca calor. Si fuera así, la mayor actividad motora inicial y la ocurrencia de temblores corporales puede registrarse midiendo adecuadamente la Tc y la superficial. En los ciano-PIRs las dosis bajas causan un aumento transitorio leve a moderado de la movilidad y la temperatura corporal (Wolansky y col. 2007a). En cambio, cuando las dosis administradas son relativamente altas se propone que la acción central sería tan intensa que la actividad neuronal llega a "agotarse" en menos de 90 min hasta el punto de ya no poder sostener el metabolismo energético y el tono muscular basal. Además, como fuera demostrado para ciano-PIRs como DTM y cipermetrina, las dosis intermedias-altas causan hiper-salivación que podría asociarse a pérdida de calor por vía oral al mismo tiempo que la caída de la temperatura superficial por la humedad que se va acumulando en gran parte del cuerpo del animal (Hainsworth, 1967). Esto sería el fundamento fisiológico responsable de una caída de la temperatura corporal, si se compara con la temperatura inicial (t_0 de administración).

9.3.1. Medición de la Tsc

Como se mencionó en la sección de Métodos (5.2.4), en este trabajo se utilizaron microchips subcutáneos que han demostrado eficiencia en varios estudios de toxicología. Entre las ventajas que tiene el uso de microchips comparado con otros métodos se puede mencionar: 1) atenúa la influencia del estrés generado durante la medición lo cual afecta la temperatura, 2) su implante no requiere anestesia general y se realiza en pocos minutos, 3) la recuperación del animal es casi inmediata y hay baja probabilidad de infección post-implante (en nuestro caso no se manifestó ningún caso de infección de los más de 200 animales que se usaron), 4) mayor simpleza y rapidez en la realización de las pruebas y registro de datos, y 5) es relativamente económico si se contrasta con el sistema de transmisores intra-peritoneales.

Al evaluar el efecto sobre la Tsc en los experimentos de administración simple las ratas tratadas con las dosis más altas (> 6 mg/kg) de los PIRs sin grupo ciano TEF y BIF mostraron una clara respuesta hipertérmica. En el caso de los ciano-PIRs α-CPM y

DTM las dosis más altas provocaron hipotermia. Estos resultados mostraron consistencia con los antecedentes reportados en rata adultas jóvenes dosificadas con BIF y DTM (Soderlund y col., 2002; Pato y col., 2011; Wolansky y col., datos no publicados). También fue comparable a 2 estudios de cipermetrina, uno realizado en ratas adultas (McDaniel y Moser, 1993) y el otro en ratas infantes (Bardullas y col., 2015). En el caso de TEF y α-CPM su capacidad para alterar la normotermia no había sido evaluada previamente. De este modo, los estudios de esta tesis no solamente confirman el efecto diferenciado de los cada subtipo de PIR en la Tc usando una estrategia alternativa para monitorear la alteración (microcircuitos implantados a nivel subcutáneo) sino que también representan la primera fuente de información sobre los PIRs modernos TEF y α-CPM que no habían sido estudiados en su acción perturbadora de la Tc hasta el momento que se inició la tesis.

9.4. Estudios de administración simple de PIRs

- **PIRs sin grupo ciano: TEF y BIF**

El tratamiento con TEF tuvo una efectividad relativamente baja para alterar la Tsc dentro del rango de dosis 0,1 – 6 mg/kg. Los tratamientos con 3 - 6 mg/kg causaron alteraciones clínicas leves-moderadas. Solo cuando se administraron dosis que provocaron un síndrome clínico evidente (6,75 - 9 mg/kg) se observaron aumentos importantes de Tsc. En estas dosis más altas el efecto máximo (ΔTsc ~2,5 °C) se manifestó entre 0,5 y 2 h post-administración (Fig. 18). Además, en este rango de dosis varios animales mostraron signos de intoxicación severos, especialmente cuando se trataron con 9 mg/kg, lo cual derivó en el sacrificio ético de muchos animales antes de terminar el período establecido de monitoreo de Tsc.

El tratamiento con BIF mostró el máximo efecto en Tsc entre las 2 y 4 h post-administración (Fig. 16). Al administrar las dosis más altas (9 y 12 mg/kg), en los últimos monitoreos previos al sacrificio la Tsc basal de los animales aún no había llegado a recuperarse completamente. Para este PIR, la dosis mínima efectiva fue 3 mg/kg. Estos hallazgos concuerdan con lo reportado por otros autores (Gammon y col., 2015; Hughes y col., 2016a; McDaniel y Moser 1993; Scollon y col., 2011; Wolansky y col., 2007b, 2006) quienes evaluaron los signos de neurotoxicidad aguda provocados

por BIF utilizando distintos marcadores de efecto (actividad motora, signos clínicos, y en uno de los trabajos T_{rec}).

- **Ciano-PIRs: α-CPM y DTM**

Los tratamientos individuales con los ciano-PIRs α-CPM y DTM causaron una respuesta aparentemente bifásica en la Tsc. Las dosis administradas provocaron cambios mínimos durante la primera hora y media post-administración con tendencia a un aumento de Tsc (ΔTsc ~0,5 - 1 °C; Figs. 32 y 34) respecto a lo observado en el grupo control. Los pocos estudios disponibles de dosis de baja efectividad de PIRs (evaluando actividad motora como medida de efecto) sugieren que los primeros 30 - 60 min post-administración oral los animales presentan un incremento de comportamientos estereotipados (rascado, olfateo, acicalado de cara, lamido del cuerpo, etc.) y aumento de la actividad locomotora (Wolansky y Harrill, 2008; Wolansky y col., 2007a). Este aumento de actividad neuromuscular *per se* podría explicar la generación de calor a nivel subcutáneo en los animales tratados con dosis bajas.

En la segunda fase (en general a partir de 90 min) se observó un efecto hipotérmico notable para estos PIRs, llegando a registrarse valores de ΔTsc de hasta -2,5 °C (Figs. 32 y 34). Para α-CPM, el tratamiento con las dosis de 3 y 9 mg/kg no llegó a causar una clara reducción de Tsc respecto al valor basal. En cambio, en esta segunda fase, la dosis de 12 mg/kg de α-CPM provocó una caída evidente en ΔTsc de hasta -2 °C. En este grupo experimental el efecto hipotérmico se mantuvo hasta 4 h post-administración. Lo anterior concuerda con el efecto hipotérmico reportado en estudios previos para cipermetrina tanto en ratas adultas (McDaniel y Moser, 1993) como en infantes (Bardullas y col., 2015). En la comparación con este antecedente hay que tener en cuenta que existe una diferencia de ~3 veces en las estimaciones de DL_{50} reportadas para α-CPM y cipermetrina (Wolansky y Harrill, 2008). Probablemente eso explica que la dosis de cipermetrina de 20 mg/kg evaluada por McDaniel y Moser (1993) en ratas adultas causó un aumento leve y transitorio, pero estadísticamente significativo de T_{rec}, y el efecto hipotérmico lo observaron cuando administraron 60 mg/kg. La comparación de ese estudio de cipermetrina que usó sonda de T_{rec} con los resultados obtenidos con α-CPM en este trabajo doctoral sugieren la sensibilidad aceptable del sistema de monitoreo seleccionado (microcircuitos subcutáneos) para

cuantificar el efecto de los PIRs en la temperatura corporal. La Fig. 58 muestra visualmente esta comparabilidad de los hallazgos en uno y otro estudio: aumento leve de T_{rec} y Tsc en las dosis 20 y 3 mg/kg, respectivamente, e hipotermia luego de la administración de 60 y 12 mg/kg (ver paneles A y B respectivamente). En ambos casos se mantiene una diferencia entre las dosis que demostraron efectividad de ~5-6 veces (20/3 y 60/12).

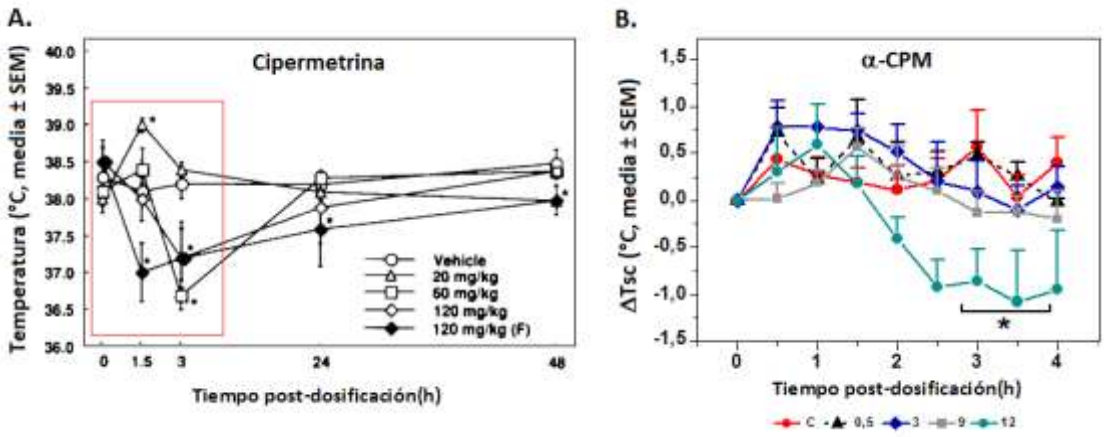


Figura 58. Comparación de los cambios en temperatura rectal y subcutánea en experimentos de administración oral aguda a cipermetrina y α-CPM. En el panel A se observan cambios de T_{rec} en t=1,5-3 h luego de la administración de 20 y 60 mg/kg de cipermetrina que parecen corresponderse con las alteraciones de Tsc que se muestran en esta tesis al administrar 3 y 12 mg/kg de α-CPM, respectivamente (comparar con panel B y Fig. 32). Además, mientras la dosis de 12 mg/kg de α-CPM causó un claro efecto hipotérmico (B), en el estudio de McDaniel y Moser (1993) esta acción se hizo evidente con dosis de cipermetrina (con menor concentración de isómeros activos) ≥ 60 mg/kg (A).

En el caso de DTM el efecto hipotérmico fue notable para las dosis de 9 y 12 mg/kg (ΔTsc -2 °C), y aunque éste se mantuvo hasta terminar el monitoreo de Tsc, la tendencia de la mayoría de los animales fue la de recuperar el estado basal en todas las dosis al cabo de ~4 - 5 h luego de la administración. La comparación de estos resultados con lo observado previamente en el trabajo de Wolansky y col. (2007a) permiten proponer a la dosis de 3 mg/kg como la mínima dosis efectiva para DTM en cuanto a los efectos sobre Tsc. Además, tomando como base el sistema de modelado utilizado, la dosis BMD_{30} fue estimada en 1,8 mg/kg. Posiblemente la dimensión de la variabilidad biológica y experimental dentro y entre bloques impidió reconocer una dosis mínima efectiva más baja.

9.5. Utilización de los resultados de los estudios de administración simple para construir la mezcla de PIRs evaluada

Los datos obtenidos en los monitoreos de Tsc en los experimentos de administración simple permitieron estimar una dosis de baja efectividad (BMD_{30}) para cada PIR. Para calcular la dosis BMD_{30} se usó el sistema de modelado BMDS. Este sistema permite cuantificar la incertidumbre de los datos e interpolar a lo largo de toda la curva dosis-respuesta, estimando un intervalo de confianza para el valor BMR/BMD de interés luego de un análisis global de los efectos medidos a lo largo de todo el esquema de dosis, lo cual no es posible con los métodos tradicionales de identificación de NOAEL (Ecobichon, 2001).

En este trabajo, la aplicación del sistema de modelado BMDS se usó para determinar la dosis de cada PIR que se combinó con las otras dosis para constituir la mezcla a ser examinada (Tabla 14). Cada una de esas dosis individuales correspondió a la dosis efectiva más baja en lo que respecta a efectos sobre Tsc. Por el procedimiento realizado, se pretendía que la dosis de cada PIR aportada a la mezcla represente una "carga tóxica equivalente". Para cada PIR, la dosis combinada en la mezcla "D3" fue la mitad de BMD_{30}, totalizando 8,95 mg/kg (ver Tabla 14). Para cada PIR la mitad de BMD_{30} se asumía un nivel de dosis sub-efectivo para generar cambios en la Tsc evidentes respecto al grupo control a juzgar por las relaciones tiempo-dosis-efecto obtenidas en los experimentos de administración simple (Figs. 16, 18, 32 y 34), y 2 diluciones (dosis D2 = $^1/_4$ BMD_{30} y D1 = $^1/_{20}$ BMD_{30}).

9.6. Efecto sobre la Tsc – Administración simple de PIRs *vs* mezcla

Los tratamientos con las dosis D1 y D2 de la mezcla no evidenciaron ningún efecto que permita sugerir neurotoxicidad. Incluso al presentarse un incremento moderado en la Tsc de ~1,1 °C (0,5 °C más que lo observado en el grupo control; ver Fig. 49) luego de 2,5 h de haber administrado la dosis D2, la Tsc de los animales retornó a los valores basales y no se diferenció del grupo control. De esta manera puede considerarse que la dosis D1 de la mezcla se comportó como una dosis de no efecto y la dosis D2 como una dosis peri-umbral (cercana a lo que tradicionalmente se denomina LOAEL), siendo consistente con lo reportado por Wolansky y col. (2009) al referirse al efecto de dosis intermedia en estudios de mezclas para actividad motora.

Por su parte, la dosis D3 de la mezcla causó un aumento leve de Tsc respecto del control entre 0,5 y 1 h (Fig. 50A - B). El efecto máximo se observó en dos períodos del monitoreo correspondientes a 1,5 – 2 h y 3,5 – 4 h. Aún después de 4,5 h de la administración no se evidenció con claridad un retorno a los valores de Tsc basales pre-administración. Este efecto puede interpretarse tomando como base los resultados obtenidos en los experimentos de administración simple de BIF y TEF, y también está de acuerdo con los efectos leves que se aprecian en la primera parte de la respuesta bifásica observada para DTM y α-CPM. Si separadamente las dosis examinadas de cada uno de estos PIRs en la dosis D3 de la mezcla "aportaban" (como máximo) un leve incremento en Tsc, **al evaluarlos en forma combinada se esperaba que la acción conjunta, según la hipótesis por defecto de este trabajo (modelo de adición de dosis), fuese también un incremento leve.** Desde un punto de vista teórico-predictivo, este incremento podría manifestarse entre 1 y 2 h debido al efecto rápido que produce la acción de TEF (ver Figs. 18 - 19) y al leve aumento de Tsc observado en 0,5 - 2 h en animales tratados con dosis bajas de los ciano-PIRs examinados (Figs. 32 y 34), y luego entre 2 y 4 h debido al efecto más sostenido de BIF (Fig. 16 y 17). Esta predicción fue consistente con los resultados: la mezcla causó un aumento leve a moderado de Tsc respecto al grupo control, alcanzando un incremento de ~1,5 °C en 4 - 4,5 h post-administración (ver Fig. 49).

9.7. Evaluación de la hipótesis según el modelo de adición de dosis

Para evaluar el cumplimiento de la hipótesis se aplicó el Método de las Potencias Relativas, MPR (Dinse y Umbach 2013; USEPA 2003). La selección de TEF como IQ permitió expresar las dosis de cada PIR como si fueran mg/kg de TEF, y así obtener los EQ_{TEF} (Tabla 14).

La selección de TEF como IQ siguió las siguientes pautas: i) que la relación dosis-efecto para ese compuesto sea monotónica dentro del rango de dosis examinado, ii) que la relación tiempo-dosis-efecto muestre efectos máximos en los mismos periodos de los componentes de la mezcla, y iii) que en lo posible exista información robusta indicando que el mecanismo de toxicidad del IQ es similar al de los otros miembros examinados de la clase química de interés (USEPA, 2000; E.C, 2015). *A priori*, estos criterios excluían a DTM y α-CPM por haber provocado aparentemente efectos

bifásicos sobre la Tsc (Figs. 34 y 36), y a BIF (Fig. 16) debido a que el efecto provocado tuvo una latencia algo mayor respecto a DTM, α-CPM y TEF (Fig. 18).

Al querer comparar los resultados experimentales del estudio de la mezcla con los de administración simple de TEF (según el MPR, transformando cada dosis de la mezcla en unidades de EQ_{TEF}) se observó que el EQ_{TEF} calculado al convertir la dosis D3 en EQ_{TEF} (10,4 mg/kg) era mayor a la dosis mas alta administrada en el estudio dosis-respuesta de TEF (9 mg/kg). En el estudio de TEF (Fig. 18) se observó que el tratamiento con la dosis de 9 mg/kg causó un efecto tóxico severo, obteniéndose valores de ΔTsc superiores a 2,5 °C. Por lo tanto se hubiese esperado que la administración de 10,4 mg/kg de EQ_{TEF} provocara un ΔTsc cercano a 2,5 °C, y que ese nivel de hipertermia se acompañe de otros signos de intoxicación severa. Sin embargo, esto no ocurrió. Dos horas después de administrar la dosis D3 de la mezcla se observó un incremento claramente menor de Tsc (~1,1 °C luego de corregir por el ΔTsc del grupo control; Fig. 49) a lo esperable, a partir de la curva dosis-efecto para la administración de TEF (ΔTsc ~2,25 °C luego de corregir por la respuesta del grupo control correspondiente; Fig.18). Además, en el grupo experimental D3 no se observó ningún animal con intoxicación severa, si bien se presentó un caso particular. La administración de la dosis más alta (D3) provocó en uno de los animales una acción hipotérmica intensa, observándose una caída en la Tsc de 2,1 °C durante un período de 2 h. Sin embargo, esa respuesta particular, no es suficiente para aseverar que tanto la calidad como la fuerza de la respuesta clínica pueden diferir entre los animales.

Para resolver esa divergencia entre las dosis de EQ_{TEF} estimadas a partir de las 3 dosis de la mezcla y los valores de las dosis administradas de TEF que habían sido examinadas en el estudio de administración simple, se realizó un ajuste exponencial (ver sección 8.4) en la curva dosis-efecto (TEF) y se obtuvo por interpolación los valores de ΔTsc correspondientes a cada nivel de EQ_{TEF}. Para realizar el ajuste se tomó 9 mg/kg como concentración máxima ya que en la curva ajustada el valor de EQ_{TEF} correspondiente a D3 (10,44 mg/kg) quedaba fuera del rango examinado (Fig. 18). En la Fig. 53 se muestra la comparación entre lo experimental y lo esperable según el modelo de dosis aditiva. Los resultados del ajuste sugieren que cuando se administran dosis que se encuentran dentro del rango 1,044 – 10,44 mg/kg de EQ_{TEF} de una mezcla que incluyen la combinación de dosis sub-efectivas para la Tc de sustancias tóxicas que

tienen un mismo tejido blanco y un mismo MPdA (en este caso 4 miembros de la clase insecticida PIR), y cada sustancia aporta a la mezcla la misma "carga tóxica potencial" (igual nivel de EQ_{IQ}) **el efecto se puede predecir aceptablemente en función de la dosis total de EQ_{IQ}.** Esto está de acuerdo con trabajos previos (Wolansky y col. 2009) y los consensos actuales (Marshall y col. 2013).

Por su parte, el efecto observado de la dosis D3 de la mezcla sobre ΔTsc fue menor que el teórico-esperado. Este resultado parece sugerir que cuando las dosis combinadas en una mezcla son separadamente cercanas a una dosis efectiva (por ejemplo BMD_{30} o mayor) la acción conjunta deja de comportarse según el modelo de dosis aditiva. La diferencia de casi 1 °C entre lo experimental y lo teórico podría sugerir algún grado de antagonismo. La confirmación de esa tendencia requiere otro diseño de estudio donde se enfoque principalmente el rango de dosis de efectividad baja e intermedia. Si bien se propone que todos los PIRs poseen un mismo MPdA, también existen sitios secundarios de acción alternativos dentro y fuera del sistema nervioso donde podría haber dependencia de la estructura química del PIR (Soderlund y col 2002). Por otra parte, la posibilidad de acciones competitivas y alostéricas sobre los CSDV al exponerse las células a múltiples PIRs ya ha sido propuesto (Motomura y Narahashi., 2001).

En síntesis, los resultados mostraron evidencia en favor de una **acción conjunta de tipo aditiva (modelo de aditividad de dosis) dentro del rango de dosis D1 – D3.**

9.8. Relación entre dosis administrada y concentración en tejidos

De acuerdo al consenso sobre la identidad del tejido blanco y el mecanismo de acción responsable de la respuesta tóxica en mamíferos (Soderlund y col., 2002; Soderlund, 2012), la intoxicación causada por exposición oral aguda a los PIRs está íntimamente correlacionada con la captación de estos insecticidas en el sistema nervioso. En consecuencia, un foco principal de esta investigación fue explorar si la concentración de los PIRs en tejido cerebral y otros tejidos relevantes (SG e HG) mantenía o no un patrón determinado independientemente de que se trate de experimentos de administración simple o combinada. En el contexto de este trabajo, se determinó la concentración de BIF, TEF α-CPM y DTM, mas no de sus metabolitos dado que en todos los casos evaluados hasta el presente no se han encontrado datos de

correlación entre los niveles internos de los metabolitos y alguna acción toxicogénica en los sitios blancos primarios y secundarios identificados en sistema nervioso (Soderlund y col., 2002; Krieger, 2010).

La determinación de la concentración de los PIRs en SG informa, por un lado, la dosis interna que se generó luego de la absorción intestinal de los PIRs administrados por vía oral, y por otro refleja la distribución en los tejidos y su eliminación, dependiendo del momento de la toma de la muestra. Una vez que ingresan a la sangre, por su elevada lipofilicidad, los PIRs se unen a lipoproteínas plasmáticas que son las principales encargadas de distribuirlos a nivel sistémico (Ecobichon y col., 2001). La absorción vía oral de estos insecticidas es del orden 30-70% (Anadón y col., 1991, 1996).

El HG es un tejido altamente lipofílico y con elevado grado de perfusión, por tanto tiene gran capacidad de captar a los PIRs administrados oralmente que se absorben a través del tracto gastrointestinal (Kim y col., 2008). Este tejido es el principal metabolizador de PIRs. En el metabolismo hepático detoxificante de PIRs en rata participan principalmente oxidasas y esterasas (Anadón y col., 2006; Casida y col., 1983). La captación diferencial, la retención transitoria y la rápida formación de metabolitos en HG plantean el impacto potencial de PIRs y probablemente de sus metabolitos, como sustancias hepatotóxicas, como se propone en publicaciones recientes (Aouey y col., 2017; Fujino y col., 2019).

El cerebro tiene un nivel de perfusión sanguínea por debajo del de HG. La captación de sustancias tóxicas lipoides por tejidos de alto contenido lipídico es superior a la de otros tejidos con menor proporción de lípidos y su tiempo de permanencia puede ser mucho más largo. Debido a que la acción toxicogénica de los PIRs es la ejercida en el SNC, se seleccionó una región cerebral representativa. En principio se consideraron dos regiones cerebrales para relacionar los efectos neurotóxicos provocados por los PIRs: el hipotálamo y el cerebelo (CE).

El hipotálamo es una región cerebral fundamental en las funciones que regulan la Tc, pero su pequeño tamaño habría dificultado su extracción y el desarrollo del protocolo analítico (extracción, purificación y cuantificación por GC-ECD). La elección del hipotálamo hubiera requerido el agrupamiento de muchas muestras de tejidos por

tratamiento para su análisis. Por otra parte, algunos trabajos que evaluaron a los PIRs en sistema nervioso, trabajaron con el cerebro total que tiene la ventaja de proveer grandes cantidades de masa.

Se seleccionó CE, el cual tiene una ubicación conveniente dentro del cráneo, su disección es rápida y eficiente (reproducible), su masa permite realizar sin dificultad el procedimiento analítico (en general, ~250 mg por animal experimental) y no se halló literatura que sugiera menores concentraciones de plaguicidas lipofílicos como los PIRs en este tejido respecto a lo reportado para cerebro total. Además, varios autores han indicado que CE es una región cerebral involucrada en la neurotoxicidad causada por PIRs en ratas adultas y en desarrollo (Abdel-Rahman y col., 2001; Dayal y col., 2001; Gray y Rickard, 1982; Shafer y col., 2005; Song y Narahashi, 1996), y contribuye a los mecanismos bioquímicos y moleculares que modulan la actividad motora y de manera indirecta, también la termorregulación.

Al inicio de nuestras investigaciones, de los PIRs examinados, solo para DTM y BIF existía información completa sobre su distribución en tejidos de rata adulta joven luego de una administración oral usando aceite de maíz como vehículo. Entre los tejidos que han sido analizados por otros grupos de investigación se encuentran; SG, cerebro total, HG y grasa (Anadón y col., 1996; Kim y col., 2007, 2008). En algunos casos se exploró la absorción comparando las vías de administración oral e inhalatoria (Gammon y col., 2015) y la intravascular y la oral (Mortuza y col., 2018). En el caso de TEF y α-CPM, es la primera vez que se evalúa la relación entre dosis administrada y concentración en tejidos luego de administración oral (sin contar los estudios regulatorios no publicados en literatura abierta).

9.9. Extracción de PIRs en tejidos biológicos y selección del método analítico

La selección de un método analítico sensible para identificar y cuantificar los PIRs en los tejidos seleccionados fue prioridad en este trabajo de tesis.

Las propiedades fisicoquímicas de los PIRs (analitos) han permitido seleccionar a la cromatografía (liquida y gaseosa) como el método analítico idóneo para su identificación y cuantificación en diversas matrices. La información disponible acerca del análisis de PIRs en muestras biológicas, en su mayoría está relacionada a la extracción a partir de matrices con alto contenido acuoso (vegetales, leche, agua, orina)

Tabla 13. Estudios de extracción y determinación de PIRs a partir de tejidos animales disponibles en la literatura abierta. Se incluyen aquellos estudios que reportan un modelo animal (rata adulta), materiales (pureza, vehículo), condiciones de exposición (vía oral, administración por intubación y en bolo), tejidos comparables a lo utilizado en esta investigación a dosis bajas.

PIRs evaluados	Magnitud de dosis administrada	Tejidos examinados	Técnica cromatográfica	Ref.
Bifentrina	Vía de administración: oral Efecto: Leve-Severo 0,05 - 16 mg/kg	Sangre Cerebro total	HPLC- MS/MS LDC: 0,5 ng/ml	Scollon y col., 2011
Bifentrina	Vía de administración: oral Efecto: Leve 3,1 mg/kg	Plasma Cerebro total	LC – MS/MS LDC: 0,5 ng/mL	Gammon y col., 2015
Bifentrina	Vía de administración: oral Efecto: Leve 0,3 y 3 mg/kg	Sangre Hígado Cerebro total Grasa	LC – MS/MS LDC: 0,3 ng/mL	Hughes y col., 2016a
Deltametrina	Vía de administración: Oral e intravenosa Efecto: Leve y moderado 1,2 y 26 mg/kg	Plasma Cerebelo Hipotálamo	HPLC LDC: 50 ng/g de tejido	Anadón y coll., 1996
Deltametrina	Vía de administración: oral e intravenosa Efecto: Leve y moderado 2 y 10 mg/kg	Sangre Hígado Cerebro total Riñón	HPLC LDC: 50 ng/g de tejido	Kim y col., 2008
Deltametrina	Vía de administración: oral Efecto Leve 0,05 - 5 mg/kg	Plasma	GC-MS LDC: 10 ng/mL	Mortuza y col., 2018
λ–Cialotrina	Vía de administración: oral e intravenosa Efecto: leve a moderado 20 y 3 mg/kg	Plasma Hígado Hipocampo Hipotálamo Cerebelo	HPLC LDC: 5 ng/g de tejido	Anadón y col., 2006
Cipermetrina Deltametrina Esfenvalerato Permetrina β-Cyflutrina ADMINISTRACION DE UNA MEZCLA	Vía de administración: oral Efecto: Leve-Moderado 3,2 - 27,4 mg/kg	Sangre Hígado Cerebro total Grasa	LC –MS/MS LDD: 0,5 ng/mL	Starr y col., 2012; 2014
Teflutrina Bifentrina α-Cipermetrina Deltametrina ADMINISTRACION SIMPLE Y COMBINADA	Vía de administración: oral Efecto: entre leve y severo 0,1 – 12 mg/kg	Sangre Hígado Cerebelo	GC-ECD LDC: 6 -8 ng/g	Este trabajo

(Dagnac y col., 2009; Goulart y col., 2008) y también otros procedimientos en matrices con mayor contenido de grasas como la carne animal para consumo humano (Argauer y col., 1997; Barbini y col., 2007; Kuang y col., 2009). Por otro lado, la información disponible en el estudio de trazas de PIRs en SG, HG y CE a partir de estudios de animales de laboratorio es escasa y requiere de equipos y procedimientos muy específicos. La tabla 13 contiene una síntesis de los estudios de determinación y cuantificación de PIRs realizados en los tejidos biológicos de interés usando rata como animal experimental, los cuales fueron tenidos en cuenta al momento de diseñar el protocolo presentado en la sección Métodos y en la interpretación de los resultados.

La selección del tipo de cromatografía y del detector depende de la sensibilidad que se busque en el proceso, pero sin duda la condición en la que llega el analito para ser identificado en el equipo es un paso clave para su análisis. Los tejidos seleccionados en ese trabajo tienen un alto contenido lipídico y de proteínas, entre muchas otras sustancias, que actúan como interferentes en la detección de los analitos. En consecuencia, su eliminación previa al análisis cromatográfico fue crucial.

Varios autores reportan técnicas analíticas de extracción de PIRs en matrices similares a las de este trabajo (SG, HG y CE) (Anadón y col., 1996; Kim y col., 2006; Marei y col., 1982; Mirfazaelian y col., 2006), requiriendo elevados volúmenes de solventes y múltiples pasos de extracción. Por lo anterior, el protocolo empleado por Scollon y col (2011) fue el que se consideró el de mejor relación costo-beneficio en este trabajo. La puesta a punto indicó que se podía optimizar este protocolo agregando un paso adicional en la extracción de los PIRs: se incorporó solución salina que ayudó a incrementar la recuperación de los analitos, ya que al favorecer el *salting-out* contribuye a separar selectivamente a los PIRs de los ácidos grasos insaturados de cadenas largas, y por otro lado precipita las proteínas. Finalmente, el clean-up del extracto de la matriz biológica se optimizó con el uso de columnas SPE comerciales pre-cargadas con sílice de fase normal. Este paso de la extracción favoreció la separación de los PIRs del resto de componentes del extracto aumentando lo eficiencia y evitando la pérdida de masa del analito.

Al evaluar los antecedentes, los estudios mostraron que las trazas de PIRs en tejidos podían ser cuantificadas idealmente con alta sensibilidad usando un sistema LC/MS-MS, reportando LDC para BIF y DTM de ~1 ng/g para SG, cerebro e HG

(Scollon y col., 2011; Starr y col., 2014). En las determinaciones de PIRs en los tejidos de esta investigación se alcanzaron LDC de entre 4 a 6 ng/g; ng/mL empleando el método analítico GC-ECD. Si bien la sensibilidad alcanzada en este trabajo no llegó a igualar la obtenida por LC/MS-MS fue menor en hasta un orden de magnitud que el reportado en trabajos donde utilizaron HPLC-UV/Vis, en los cuales para DTM el LDD fue 50 ng/g en tejido (Anadón y col., 1996, 2006; Kim y col., 2006) (ver Tabla 15). Por las razones antes mencionadas los sistemas GC y LC MS/MS son los más convenientes en el análisis de PIRs presentes en matrices biológicas, pero ante la imposibilidad de acceder a equipos con detector MS/MS el uso de GC-ECD fue una alternativa adecuada para identificar y cuantificar niveles de trazas (ng/g) de los 4 PIRs tanto individualmente como de manera simultánea en los tejidos estudiados.

9.10. Concentración de PIRs en los tejidos - Estudios de administración simple

En este trabajo la determinación de las concentraciones de los PIRs, tanto en los estudios de exposición simple como en la evaluación de la mezcla cuaternaria, se realizó ~ 6 h después de la administración. Al comparar los resultados obtenidos con otros estudios realizados en similares condiciones, se dispone únicamente de información para experimentos de administración simple de BIF y DTM.

9.10.1. Piretroides sin grupo ciano

- **Bifentrina**

Es uno de los pocos PIRs en los que se ha estudiado en mamíferos (rata) la relación dosis administrada *vs* concentración en tejido (Gammon y col., 2015; Hughes y col., 2016b; Scollon y col., 2011) usando dosis orales que van desde 0,1 a 16 mg/kg y con tiempos de sacrificio similares al utilizado en este trabajo. Los 3 trabajos referenciados determinaron la concentración de BIF en cerebro total, SG y/o plasma; solo Hughes y col. (2016b) evaluaron HG.

En los resultados del presente estudio, la concentración de BIF fue mayor en HG respecto a los otros tejidos, lo que es consistente con lo reportado por Hughes y col (2016b). En términos de concentración, los niveles de BIF en HG (~159 ng/g) llegaron a superar en hasta 8 veces elo hallado en SG (~20 ng/mL) para la dosis de 3 mg/kg. Estos valores equivalen al 60% de la concentración total de BIF determinada en HG y al 8%

de la presente en SG. Respecto a la concentración de BIF en CE, fue triplicada por la de HG (~162 ng/g en CE frente a 519 ng/g en HG) para el tratamiento de 9 mg/kg (Fig. 21). Se ha reportado que BIF se distribuye rápidamente en el HG, llegando incluso a ser detectado 15 min luego de la administración por vía oral (Hughes y col., 2016b), lo cual parece sugerir que los bajos niveles en SG se deban probablemente a la rápida absorción de BIF por los otros tejidos (HG y CE) y al rápido metabolismo de este PIR.

En cuanto a la concentración de BIF en CE, pudo encontrarse que la relación respecto a SG disminuye a medida que la dosis administrada se incrementa. Esta tendencia fue observada por Scollon y col. (2011) incluso para tiempos de sacrificio ligeramente mayores (~7 h) a los estudiados en este trabajo. La relación [CE]/[SG] para BIF fue > 1 para todo el rango de dosis estudiadas. Una de las interpretaciones posibles es que este PIR, luego de atravesar la barrera hematoencefálica, tiende a ser retenido por el SN. Esta interpretación es coherente con los resultados de los estudios antes mencionados (Fig. 24).

A partir de los resultados podría sugerirse que en cada tejido el porcentaje del total de BIF determinado (sumando los 3 tejidos), se mantuvo aproximadamente dentro de un mismo rango para las dosis entre 3 a 12 mg/kg (SG = 8 - 18%; HG = 59 - 65%, CE = 24 - 32%). Esta constancia (por ejemplo, aproximadamente la mitad de concentración en SG que CE) sugiere la utilidad de la concentración en SG como medida predictiva del nivel de exposición a este PIRs en SNC. Esto ya había sido propuesto a partir de los resultados del estudio de BIF reportado por Scollon y col. (2011).

Nota: En el contexto de situaciones de intoxicación oral aguda, el tiempo de ~6 h post-exposición que se usó en esta investigación doctoral está dentro de lo que se puede tardar en llegar a una sala de emergencias toxicológicas y hasta alcanzar las primeras conclusiones preliminares sobre identidad del agente etiológico. Se han propuesto sistemas rápidos de inmunoensayo (Bo y col., 2008) que si bien no tienen alta sensibilidad pueden servir en muchos de estos casos de urgencia.

- **Teflutrina**

Este es el primer estudio de TEF describiendo la relación entre dosis administrada, y concentración en tejidos. Entre los hallazgos más relevantes se pueden citar la dependencia de los niveles detectados en los tejidos (SG, HG y CE) con la dosis

administrada, y los mayores niveles de TEF en CE (50 - 58%) respecto a HG (36 - 42 %) y SG (5 - 8%) en todos los tratamientos (Figs. 26 - 28).

Los bajos niveles en SG (~5 ng/mL) para todas las dosis sugieren una rápida distribución y metabolización de TEF al momento de la disección de tejidos, ~6 h post-administración (Fig. 27a). Además, de los 3 tejidos estudiados, CE tiene mayor porcentaje de lípidos y es menos perfundido que HG. Los niveles de TEF en CE fueron entre 20 y 81 ng/g, aproximadamente la mitad que lo observado para BIF dentro del mismo rango de dosis administrada (3 - 9 mg/kg) (comparar Figs. 21 y 26). Aun con esta diferencia, hubo varios animales con signos de intoxicación severa con TEF y ninguno con BIF. Además de ser dependiente de la dosis que se administró, el mayor efecto relativo de TEF respecto a BIF pudo deberse a:

a. Captación más rápida a tiempos cortos, ya que en el grupo de la dosis más alta de TEF los signos de neurotoxicidad y las condiciones establecidas para sacrificio ético anticipado se presentaron a las 1,5 - 2 h post-administración.

b. Captación más tardía y/o retención más prolongada de BIF dentro del sistema nervioso una vez que atraviesa la barrera hematoencefálica, lo cual explicaría por qué se encontró más concentración de BIF que TEF en CE a las 6 h.

c. Mayor potencia de TEF en el sitio blanco (Tan y Soderlund., 2010).

d. Efectos tóxicos simultáneos de TEF en otros órganos vitales como puede ser el corazón (Spencer y col., 2005).

Del mismo modo, al comparar los niveles de BIF y TEF luego de administrar una dosis entre 3 - 9 mg/kg, la relación [CE]/[SG] para TEF llegó incluso a duplicar la de BIF (comparar Figs. 24 y 29). Esta diferencia en la persistencia dentro de CE podría explicar la rapidez de la ocurrencia de la intoxicación severa en el caso de TEF.

Para confirmar la interpretación antedicha habría que repetir estos experimentos evaluando también tiempos más cortos; por ejemplo, un esquema de sacrificio, disección de tejidos (músculo cardíaco, además de SG y tejido de SNC) y determinación de BIF y TEF 1, 2, 4 y 6 h post-administración de dosis en el rango 3 - 7,5 mg/kg.

9.10.2. Ciano-PIRs

- **α-Cipermetrina**

No existen reportes previos que mencionen la relación entre dosis oral, y concentración en tejidos de α-CPM en mamíferos (ratas). La información más cercana disponible está relacionada con estudios de exposición a mezclas de isómeros de Cipermetrina (Starr y col., 2012, 2014). Como era esperable, la concentración de α-CPM en tejidos fue dependiente de la dosis administrada. Para todo el rango de dosis estudiadas en el CE se encontró mayor proporción de α-CPM (42 - 56%) que en SG (26 - 40%), y el nivel en CE llegó incluso a superar en hasta 3 veces al de HG (13 y 20%). Un hallazgo interesante fue que dentro del rango 3 - 9 mg/kg la concentración de α-CPM en CE fue superior a la observada al administrar TEF, el cual tiene DL_{50} hasta ~4 veces más baja que α-CPM (WHO, 2010; Wolansky y Harrill, 2008; Wolansky y col., 2006). Asumiendo que el sistema nervioso es el tejido blanco primario en la intoxicación aguda de los PIRs en mamíferos (Soderlund y col., 2002), dentro de los factores biológicos que pueden haber atenuado la toxicidad relativa de α-CPM se puede postular: i) la ausencia de efectos periféricos relevantes fuera del sistema nervioso, que sí ha sido reportado para TEF, ii) una mayor proporción de α-CPM que queda retenida en SG e HG en comparación a TEF, y iii) una acción menos intensa/persistente a nivel de la perturbación electrofisiológica en los CSDV.

- **Deltametrina**

Es uno de los PIRs de los cuales se dispone de mayor información toxicocinética, incluyendo estudios de distribución y eliminación de sus metabolitos en SG, en varias áreas cerebrales (Anadón y col., 1996) y en tejidos considerados como reservorios de lípidos, como la piel y el HG (Kim y col., 2008). Al igual que en este trabajo, estos autores encontraron que la concentración calculada de DTM en cada tejido dependía de la dosis administrada.

En nuestra investigación se encontró que luego de ~6 h la concentración de DTM fue mayor en SG (42 - 57%) que en HG (20 - 40%) y en CE (15 - 37%) para todos los tratamientos (Figs. 42 - 44). El nivel en SG luego de administrar 9 - 12 mg/kg (o sea, ~100 - 350 ng/mL considerando promedios; ver Fig. 42) estuvo en el mismo

orden que lo reportado por Kim y col. (2008) en un estudio donde se administró 10 mg/kg DTM y se sacrificaron los animales a distintos tiempos para determinar la captación en tejidos. Considerando que en ese estudio se usaron diferentes condiciones a las usadas en el presente trabajo de tesis como: cepa de ratas, vehículo solubilizante (glicerol formal), volumen de dosis (2 mL/kg) y otro equipamiento (HPLC), los resultados sugieren una concordancia aceptable, ya que se usó un tiempo de sacrificio similar, una misma vía de exposición y un mismo protocolo de preparación de DTM a lo utilizado en este trabajo doctoral, lo cual permite comparar los resultados (Fig. 59).

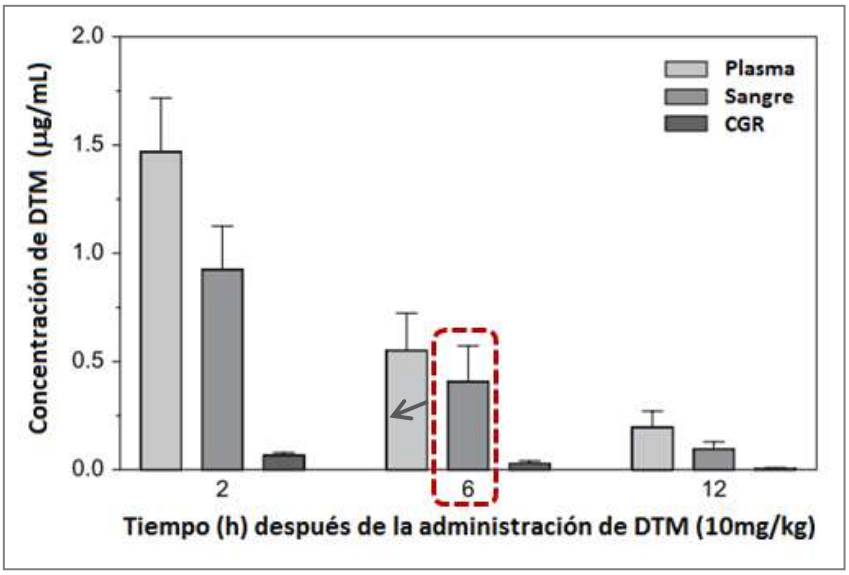


Figura 59. Comparación de los resultados de concentración de DTM en sangre con estudios previos. El recuadro en línea punteada marca el resultado obtenido en sangre total (blood) 6 h luego de administrar 10 mL/kg DTM a ratas adultas. El cuadro en línea contínua marca el rango de concentraciones que se muestra en esta tesis usando dos dosis cercanas (9 y 12 mg/kg) y el mismo tiempo (ver Fig. 42). Tomado de Kim y col. (2008).

Por otro lado, en ese mismo estudio se muestra que 6 h después de la administración de 2 - 10 mg/kg DTM la circulación sanguínea contiene casi 3 veces más concentración que en cerebro total (Kim y col., 2008), lo cual es comparable al nivel ~2 - 3 veces menor encontrado en CE respecto a SG en este trabajo doctoral (Fig. 42). Si bien existe cierta divergencia en la evidencia sobre cómo se comporta la relación de concentraciones (SG *vs* cerebro) para DTM, la mayoría de los trabajos que han usado condiciones experimentales comparables a las descriptas en esta tesis sugieren que DTM se encuentra más concentrado en SG que en sistema nervioso ~6 h luego de su administración oral (Kim y col., 2008; Sudakin, 2006).

Se puede hipotetizar que el mayor contenido de DTM en SG e HG respecto a CE, se debe probablemente a la divergencia entre la velocidad de captación y eliminación de este PIR en los tejidos examinados. La absorción y eliminación de DTM en ratas adultas son relativamente rápidas. El $t_{1/2}$ de eliminación en HG es casi 2 veces el de SG (Anadón y col., 1996; Kim y col., 2008). Esto podría explicar los mayores niveles de DTM encontrados en SG en el rango de dosis administrada 3 - 12 mg/kg comparado a los determinados en HG.

Por su parte, las menores concentraciones en CE (Fig. 44c) parecen sugerir una captación más lenta de DTM por el SNC, consistente con la aparentemente alta metabolización en el HG y la relativamente alta cantidad de DTM que aún permanecía circulando en la SG 6 h luego de la administración. Estos hallazgos coinciden con lo reportado por los autores antes mencionados, ya que el cerebro fue el tejido con menor concentración de DTM. Por su parte, en el trabajo de Anadón y col. (1996) calcularon, en diversos tiempos (2 - 48 h), la concentración de este PIR en SG y en varias áreas cerebrales, reportando los mayores niveles, tanto para DTM como para uno de sus metabolitos primarios (4´-OH-deltametrina), a las 6 h luego de la administración oral. Siguiendo con la comparación de PIRs dentro del rango 3-9 mg/kg, mientras para TEF y BIF los niveles en SG fueron 5 - 10 y 20 - 120 ng/mL, respectivamente, y en el caso de DTM las concentraciones promedio fueron 20 - 90 ng/mL. Efectivamente el perfil de transporte en SG de DTM se acercó más al de BIF, no observándose intoxicación severa en ningún animal.

En resumen, los resultados de exposición simple obtenidos, confirman la captación y/o retención de los PIRs en los tejidos con alta proporción de lípidos (Tabla 14), ya que fue en CE e HG donde se encontraron las mayores concentraciones de TEF, α-CPM y BIF. El metabolismo de los PIRs en mamíferos es relativamente rápido y principalmente realizado en el HG mediante sistemas de oxidasas, y reacciones de conjugación, y también en SG mediante hidrólisis del grupo éster por carboxilesterasas (Soderlund y col., 2002; Krieger, 2010). Aun no se puede explicar en forma conclusiva qué determina la persistencia de PIRs en regiones cerebrales como el CE (aún después de ~6 horas). No se conoce un rol relevante de las oxidasas en la degradación metabólica de estos insecticidas en cerebro. Sin embargo, a partir de estudios en ratón sí se propone que las carboxilesterasas cerebrales podrían tener un rol menor en la

detoxificación en forma complementaria a la metabolización más intensa que ocurre en HG y SG (Ghiasuddin y Soderlund, 1984). Por lo tanto, se puede postular que lo que circula en SG y llega a ingresar al sistema nervioso no encontrará allí capacidades relevantes de detoxificación metabólica (Ross y col., 2006). Además, una vez que atraviesan la barrera hematoencefálica e ingresan al compartimento neuronal del sistema nervioso pueden encontrar múltiples sitios de interacción química y bioquímica específicos (por ejemplo, los canales de sodio) e inespecíficos (fosfolípidos, glucolípidos, cerebrósidos, proteolípidos, etc.) (Soderlund y col., 2002). Respecto a la potencial captación en el tejido adiposo en función de su alta liposolubilidad (si bien la evidencia no sugiere potencial para bioacumulación), para que allí se reduzcan los niveles de PIRs, éstos deberían redistribuirse en la circulación sistémica donde pueden ser hidrolizados por esterasas séricas o absorbidos por el HG y metabolizados por procesos de oxidación, hidrólisis, y conjugación (Soderlund y col. 2002). De este modo, la persistencia de los PIRs y su acción en los sitios blancos dependerán de la tasa metabólica del compuesto y la capacidad de acumulación y retención del tejido.

Tabla 14. Distribución de los PIRs entre los tejidos examinados según lo observado en los estudios de administración simple. Para 3 de los 4 PIRs examinados los tejidos con mayor contenido lípido CE y HG presentaron mayor concentración que en SG.

PIRETROIDE	SANGRE	HÍGADO	CEREBELO
BIF	**+**	**+++**	**++**
TEF	**+**	**++**	**+++**
α-CPM	**++**	**+**	**+++**
DTM	**+++**	**++**	**+**

9.11. Concentración de PIRs en los tejidos - Estudio de la mezcla cuaternaria

Los pocos estudios publicados de mezclas de PIRs usando dosis orales agudas bajas en ratas adultas se han reportado desde el 2009. En el primer estudio (mezcla de dosis subtóxicas de 11 PIRs; Wolansky y col., 2009) sólo se caracterizaron los efectos combinados sobre la AM. Mas tarde, un mismo laboratorio determinó la concentración en tejidos en estudios que examinaron la relación entre dosis administrada, dosis interna, dosis en tejido blanco y efecto a distintos tiempos post-administración. Todos esos estudios que incluyen determinación de concentración en tejidos (Starr y col., 2012, 2014, Hughes y col., 2016b) muestran los resultados de la evaluación de distintas

dosis de una misma mezcla de 5 PIRs disueltos en aceite de maíz. Entre los PIRs examinados estaban DTM y Cipermetrina, los cuales también fueron objeto de estudio en esta tesis, lo cual permite cierta comparabilidad de los hallazgos. En esa serie de publicaciones se muestran concentraciones de los PIRs examinados en SG, HG y cerebro total luego de monitorear efectos (perturbación de actividad motora) a distintos tiempos luego de la administración de la mezcla por intubación intra-gástrica. . En esos estudios se usaron dos niveles de concentración de la mezcla incluyendo concentraciones de DTM aproximadamente comparables a las concentraciones de DTM en las dosis D2 y D3 de la mezcla de nuestro trabajo (0,45 y 0,9 mg/kg respectivamente). Por otro lado, Hughes (2016b) solamente usó un tiempo para calcular las concentraciones de los PIRs en los tejidos (3,5 h), mientras que en los otros estudios usaron diferentes tiempos de sacrificio que van desde las 2,5 h hasta 25,5 h post-administración. Únicamente Starr y col. (2014) determinó concentraciones en tejidos (SG y cerebro total) en un tiempo post-administración cercano (5,5 h) al empleado en este trabajo de tesis, mientras que en un trabajo anterior del mismo grupo (Starr y col., 2012) se muestran concentraciones en tejidos extraídos en el tiempo de máximo efecto en actividad motora, 2,5 h post-administración (Fig. 60). En este último estudio se determinó la relación entre la concentración en cada tejido y la SG ([CB]/[SG] y [HG]/[SG]) a 5,5 h.

A. **Tissue Concentration by Dose Group at 2.5 h After Dosing**

			Mean tissue concentration ± SE (blood ng/ml; brain, fat, liver ng/g)					
Tissue	Dose group	*n*	Cypermethrin	Deltamethrin	Esfenvalerate	*cis*-Permethrin	*trans*-Permethrin	β-Cyfluthrin
Blood	Low	4	141[a] ± 21	25[a] ± 4	12[a] ± 2	52[a] ± 9	5[a] ± 2	15[a] ± 3
	High	4	647 ± 77	115 ± 14	52 ± 12	196 ± 19	46 ± 4	87 ± 19
Brain	Low	6	68[a] ± 9	10[a] ± 1	7 ± 1	122[a] ± 16	11[a] ± 2	28[a] ± 4
	High	3	143 ± 15	19 ± 4	10 ± 3	230 ± 31	32 ± 6	58 ± 9
Fat	Low	6	565 ± 112	83 ± 11	72[a] ± 9	512[a] ± 77	216 ± 37	233 ± 48
	High	3	1076 ± 239	158 ± 51	146 ± 34	908 ± 165	406 ± 93	466 ± 111
Liver	Low	6	140[a] ± 27	26[a] ± 4	25[a] ± 4	95[a] ± 15	18[a] ± 6	38[a] ± 9
	High	3	400 ± 26	71 ± 5	65 ± 5	219 ± 10	64 ± 18	139 ± 14

B. **Concentration of Pyrethroids in Low- and High-Dose Mixtures**

Pyrethroid	Type[a]	Low dose (mg/kg)	High dose (mg/kg)	Percentage of total dose	Relative potency[b]
Cypermethrin	II	3.2	7.9	29	0.235
Deltamethrin	II	0.4	0.9	3	1.000
Esfenvalerate	II	0.3	0.7	3	2.092
cis-Permethrin	I	2.3	5.7	21	0.059[c]
trans-Permethrin	I	3.5	8.6	31	
β-Cyfluthrin	II	1.5	3.5	13	1.136
Total dose		11.2	27.4		

Figura 60. Antecedentes de estudios de administración de mezclas de PIRs. En el panel A se muestran las concentraciones de cada PIRs en los tejidos a 2,5 h luego de

administrar una mezcla. En el panel B se muestra la identidad, clasificación de los PIRs, y las dosis "baja" y "alta" (mg/kg) de cada uno combinada para construir la mezcla. Tomado de Starr y col., 2012.

Los resultados de estos antecedentes se muestran en la Fig. 60A (Starr y col 2012), donde se incluye la concentración de DTM. El origen y la pureza de la DTM, y muchas de las condiciones de preparación de la solución de mezcla en aceite de maíz y del procedimiento de administración oral, fueron similares a las usadas en nuestra investigación. Además, en aquellos estudios también se usaron ratas adultas jóvenes de una edad y peso similar (si bien la cepa en ese caso fue Long Evans). Nótese que mientras las concentraciones de DTM halladas en SG fueron claramente menores a las de esta investigación, **los valores en cerebro total** (ver recuadro rojo) **fueron del mismo orden que lo encontrado en las muestras de CE en este trabajo de tesis** (~10 - 20 ng/g; ver Figs. 43 y 51), lo cual puede explicarse en base a la diferencia entre los tiempos post-administración y la cinética de eliminación más lenta en regiones cerebrales en comparación a SG.

Deltametrina representó un bajo porcentaje (3 - 10%) de la masa total de la mezcla tanto en este trabajo como en los estudios de Starr y col (2012, 2014), lo cual parece descartar este factor como relevante a la hora de explicar diferencias en la concentración de DTM en SG en uno y otro caso. Uno de los factores determinantes fundamentales en los estudios toxicocinéticos de PIRs en modelos animales es el tiempo que transcurre entre la administración oral y el sacrificio de los animales y la extracción de tejidos (Soderlund y col., 2002; Krieger, 2010). En nuestro caso los niveles hallados de DTM en SG tuvieron una mayor proporción a los de la solución de la mezcla (10%) en todas las dosis administradas. En el caso de D1 y D2 este aumento no fue tan marcado (16 y 17% respectivamente) (Fig. 56), sin embargo el tratamiento con la dosis D3 produjo un incremento en la concentración en SG llegando a proporciones del 50% (~65 ng/g). Este resultado llamó la atención debido a la proporción en la que DTM se encontraba en la mezcla (10% frente a 38% de BIF). Por su parte, la concentración de DTM en HG y CE presentó poca variación respecto a la proporción en la mezcla (entre 4 y 11%). Lo anterior coincide con lo reportado por Starr (2014) y Hughes (2016b), ya que estos autores concuerdan en que la concentración para DTM, e incluso cipermetrina

(de similar estructura a DTM), presente en los tejidos puede ser correlacionada con la de la mezcla administrada.

En este trabajo de tesis, de los 4 PIRs de la mezcla, BIF fue el único que se encontró claramente en mayor concentración absoluta y relativa en CE e HG respecto a SG en todo el rango de dosis D1 - D3 (ver Figs. 51- 52), demostrando mayor afinidad y/o retención en tejidos altamente lipofílicos; además BIF fue el PIR que mayor masa aportó a la mezcla (38%).

9.12. Evaluación de la hipótesis – Comparación entre la proporción de los PIRs en los tejidos y la proporción de cada uno en la mezcla administrada

Un punto relevante en este trabajo fue analizar la relación entre las concentraciones relativas combinadas en la solución stock de la mezcla y los niveles relativos de cada PIR determinados en los tejidos luego de transcurridas ~6 h desde la administración. Si la toxicocinética de un PIR no se veía afectada por la toxicocinética de los otros, entonces se esperaría que los niveles relativos de cada uno tampoco se vieran afectados, y los niveles absolutos fueran simplemente una función de la dosis administrada. La Fig. 54 muestra la proporción de los PIRs en los tejidos en el estudio de mezcla. Las proporciones de los 4 PIRs en HG y CE son similares a las observadas en la mezcla stock. En cambio, en SG se observan variaciones marcadas en la proporción de TEF (disminución considerable) y DTM (aumento) respecto a la composición de la solución de mezcla administrada. Una explicación al aumento en los niveles de DTM en SG podría atribuirse a que la carboxilesterasa sérica hidroliza a éste PIR más lentamente que a los otros provocando que permanezca por más tiempo en la circulación sanguínea (Crow y col., 2007). Además es conveniente mencionar que estas variaciones en la distribución de los PIRs en los tejidos, pudieron presentarse por factores experimentales y/o físicoquímicos, ya que aunque los PIRs sean estructuralmente similares existen diferencias en la absorción, distribución, metabolismo y excreción de estos compuestos (Krieger, 2010).

Respecto a las diferencias entre dosis, la Fig. 54 muestra que la mayor divergencia se observó en la dosis D1 respecto a D2 - D3. Aquí es pertinente mencionar que la dosis D1 en algunos casos generó concentraciones en tejidos cercanos al LDC. La amplitud de la variabilidad intra-tratamiento y la divergencia entre SG y los otros

tejidos examinados puede explicarse al menos en parte en la rápida eliminación que ocurre en SG y la capacidad de retención en tejidos ricos en lípidos como CE y HG.

En resumen, si bien se debe continuar y ampliar el estudio de mezclas para este tipo de PIRs seleccionando aquellas combinaciones que tienen más probabilidad de ocurrir en ambientes humanos**, estos resultados parecen sugerir que es posible estimar la concentración de cada uno de estos compuestos en CE e HG a partir de la proporción en la que se encuentran en la mezcla administrada para dosis dentro del rango empleado en este trabajo.** Por su parte, los niveles en SG son más variables en función del tiempo transcurrido entre la administración y la determinación analítica (en el caso de BIF ver Hughes y col., 2016a, y Kim y col., 2008 para DTM), por lo cual pueden no reflejar con fidelidad la composición de una combinación de PIRs. Esto último está de acuerdo a lo que había sido propuesto en el estudio de BIF que comparó la distribución en tejidos administrando distintas concentraciones de una mezcla y distintos tiempos de sacrificio post-exposición (4 y 7 h) que reportara Scollon y col. (2011).

9.13. Análisis de los resultados en el contexto de la hipótesis: ¿Se observaron diferencias en la proporción de los PIRs en los tejidos al comparar la administración simple y la combinada?

Al realizar la comparación de la proporción en la que se encuentran los PIRs de en los 3 tejidos en el estudio de la mezcla y en los experimentos de exposición simple (ver punto 8.4 en la sección Resultados; Fig. 56), se observan grandes diferencias para el tratamiento con la dosis D3 (Tabla 12). Pese a estas diferencias, CE fue el tejido que mostró mayor cercanía con las proporciones de la administración simple. Esto puede observarse al comparar los porcentajes de BIF (53% en la administración simple y 54% luego de administrar la mezcla). En el caso de α-CPM se observó una disminución casi del 50%, mientras de TEF tiende a una mayor concentración en CE cuando se administra junto con otros PIRs (10% administración simple *vs* 22% mezcla). Esta tendencia general al incremento de la concentración en CE, a lo largo de todo el rango de dosis (D1, D2 y D3) (Fig. 55), pudo ser consecuencia de la interacción de los insecticidas, de los cuales dos de los más potentes, TEF y BIF, tuvieron mayor concentración respecto al valor teórico. Lo anterior sugiere interacciones o modificaciones en el mecanismo de distribución por la acción conjunta de estos 4 PIRs.

Por su parte en HG, la proporción de BIF disminuyó (80 a 60%), mientras que en SG únicamente hubo similitud para TEF (3% en las dos situaciones). Cabe aclarar que en los estudios de administración de la mezcla, SG fue el tejido que presentó mayor variación en las concentraciones de BIF, DTM y α-CPM respecto a la dosis administrada, con lo cual podría plantearse que la concentración en SG no representa ni la proporción en la que se encuentran los PIRs en la mezcla administrada como tampoco el porcentaje en la que se encuentran luego de la administración simple.

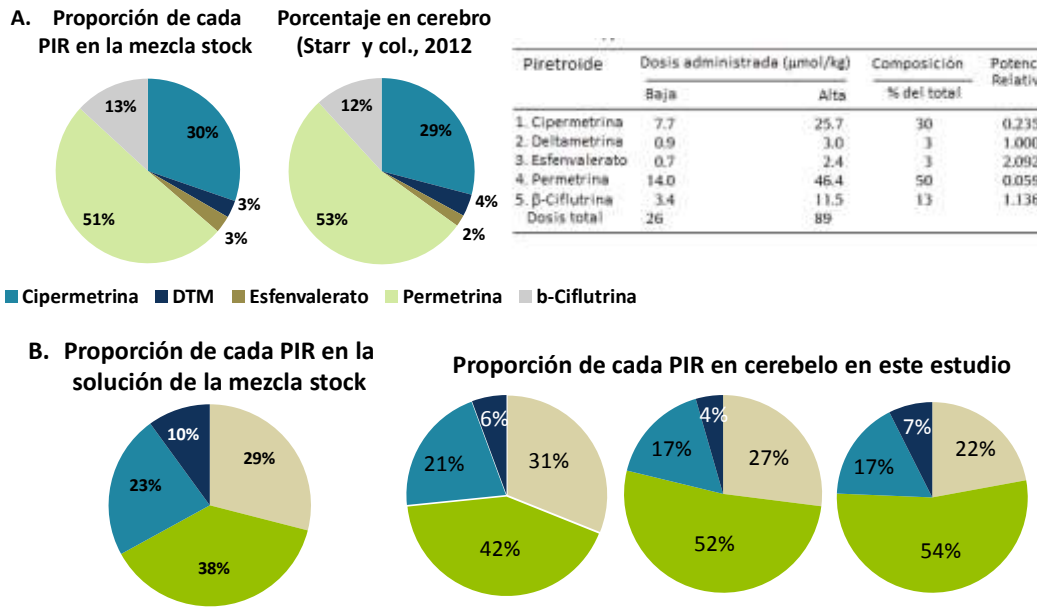
Entre los factores que influyen sobre las variaciones en la disposición de los PIRs en los tejidos entre los estudios individuales *vs* la mezcla, además de considerarse las interacciones entre ellos deben tenerse en cuenta aquellas inherentes a la variabilidad experimental tanto entre animales como también en la aplicación del método analítico para la determinación de cada PIR.

9.14. Relación entre dosis administrada, concentración en tejido y efecto sobre Tsc. Comparación entre administración simple y coadministración de PIRs.

En esta investigación se asume que la variación en la Tsc está asociada a la neurotoxicidad que causan los PIRs. El análisis de las diferencias entre las concentraciones de cada PIR en CE luego de cada esquema de administración (simple *vs* conjunta) da la oportunidad de explorar la cuestión siguiente: ¿Podría un episodio de coexposición simultánea puede modificar la proporción de un PIR en el tejido blanco, cuando se compara con lo observado en estudios de cada PIR por separado? Y asociado a la cuestión anterior, ¿podría la relación exposición-dosis-efecto ser influenciada por la coadministración de otros PIRs? Los resultados (Figs. 53 y 55) muestran que, al ser coadministrados dentro de una mezcla, los PIRs sin grupo ciano TEF y BIF presentaron mayor concentración en CE que la que se esperaba en función de los estudios de administración simple. Cabe destacar que el efecto de la dosis D3 de la mezcla fue un incremento en ΔTsc similar a lo observado en los experimentos de administración simple de estos PIRs. Los ciano PIRs mostraron una tendencia en dirección contraria. Las concentraciones de α-CPM y DTM fueron mayores en CE cuando se coadministraron con los otros PIRs. Considerando globalmente lo antedicho, los resultados sugieren que al administrar la mezcla cuaternaria de PIRs el efecto neto sobre la Tsc fue dependiente principalmente de BIF y TEF. Estos dos PIRs reunían 2 condiciones que pueden haber influido en su rol más activo en la acción conjunta de la

mezcla: i) son los de mayor toxicidad intrínseca de la mezcla (menor DL_{50} oral), y ii) son los que aportaron más masa a la mezcla (lo mismo si se convierte mg/mL a nmol/mL en la solución stock de la mezcla). Además, BIF causa un síndrome prolongado que incluye temblores musculares (Soderlund y col., 2002; Wolansky y col., 2007a; Scollon y col., 2011), que a su vez pueden incidir en su capacidad para aumentar la temperatura interna y superficial de los animales tratados (Wolansky y Harrill, 2008). Esto podría explicar por qué aún después de transcurridas 4,5 h desde la administración de la mezcla (que incluía 3,41 mg/kg de BIF), se observó un incremento de ΔTsc (~1,2 °C luego de corregir por el ΔTsc control) similar al cambio inducido luego de la administración simple de 3 mg/kg BIF (Fig. 16). Al analizar las proporciones de cada PIR en la mezcla administrada y en el CE surge que aun varias horas después del pico de máximo efecto sobre la Tsc (se reporta en general que es en 1,5 - 4 h usando 1 mL/kg pc de volumen de dosis) se observó aceptable concordancia (Fig. 54). Esto confirma y extiende un hallazgo similar que reportaron Starr y col., (2014) cuando determinaron concentración en tejidos aun en tiempos más cortos luego de administrar una mezcla de dosis bajas de distinta composición.

Si bien esta investigación puede considerarse de carácter preliminar por el tamaño de muestra evaluado, muestra evidencia que permite confirmar la Hipótesis 2*. "*Si se coadministran distintas concentraciones de PIRs constituyendo una mezcla de dosis bajas se espera que cada PIR se mantenga en los tejidos en la misma proporción en la que se encuentra en la mezcla*." Este hallazgo es comparable a lo reportado por Starr y col. (2012) como se muestra la Fig. 61. En el panel A se observa la proporción en la que se encuentran los PIRs administrados en la mezcla stock, asi como también las potencias relativas de cada uno de ellos, y finalmente la proporción de cada PIR en el tejido blanco (cerebro). Al comparar los resultados del presente trabajo de tesis (panel B) con este estudio previo, si bien la mezcla estudiada tiene distinta composición, en ambos casos DTM se encontró en un porcentaje menor que el de la mezcla stock.



Piretroide	Dosis administrada (µmol/kg)		Composición	Potencia Relativa
	Baja	Alta	% del total	
1. Cipermetrina	7.7	25.7	30	0.235
2. Deltametrina	0.9	3.0	3	1.000
3. Esfenvalerato	0.7	2.4	3	2.092
4. Permetrina	14.0	46.4	50	0.059
5. β-Ciflutrina	3.4	11.5	13	1.136
Dosis total	26	89		

Figura 61. Correspondencia entre sistema nervioso central y la solución de mezcla administrada al comparar las proporciones de cada PIR. Se comparan los resultados observados luego de la administración de una mezcla de dosis bajas de 5 PIRs (Panel A; tomado de Starr y col., 2012) y los resultados mostrados en esta tesis (Panel B).

Si bien hubo concordancia entre las proporciones de PIRs combinadas en la solución de mezcla y lo que se determinó en el tejido blanco primario (CE), el efecto de la dosis alta de la mezcla tuvo menor efecto que el esperable si se cumplía la hipótesis de dosis aditivas (Hipótesis 1 de esta tesis). Encontramos que la dosis D3 causó un efecto menos severo tanto en Tsc como a nivel de los signos de intoxicación general (observaciones clínicas no sistemáticas) que lo esperado. Esto debería ser confirmado en estudios con un N más amplio para interpretar esta tendencia en forma más concluyente. En este trabajo la información generada no permite evaluar en qué grado la relación entre las concentraciones/proporciones en SN y los cambios en Tsc fueron dependientes de fenómenos de interacción competitiva o alostérica de los PIRs a nivel del sitio blanco primario (CSDV) que fueron reportados por Motomura y Narahashi (2001).

Otro aspecto relevante para analizar es la cercanía de la curva dosis-efecto experimental a la teórica-predictiva construida en base a fracciones de BMD_{30} (método de las Potencias Relativas), tanto en los estudios de Starr y col. (2012, 2014) como en esta investigación utilizando 2 medidas de efecto distintas, actividad motora en laberintos y temperatura corporal, respectivamente. Si bien un tiempo después de

iniciado el trabajo de investigación nuestro laboratorio encontró evidencia sugiriendo cierta relación fisiológica y proporcionalidad directa entre la actividad locomotora horizontal y el calor corporal medido con la tecnología de microchips subcutáneos (Pato y col., en preparación), la significancia de la actividad motora y la Tc para la homeostasis de mamíferos resulta muy distinta. Por ejemplo, un pequeño porcentaje de cambio en la Tc fue mucho más trascendente para el mantenimiento de las funciones vitales, que el mismo porcentaje de cambio a nivel de la actividad motora. Por otra parte, todos los PIRs evaluados hasta ahora (~15 en total, incluyendo los subtipos I, II y I/II con y sin grupo ciano, y PIRs con y sin halógenos) utilizando el sistema de evaluación denominado "Laberinto en forma de 8" (Figure-8 maze) (Wolansky y Harrill, 2008) han causado disminución en la actividad motora en forma dependiente de la dosis administrada. O sea, el mecanismo de acción que se relaciona a este efecto no parece depender de la estructura del PIR. En cambio, existen 3 efectos posibles para las dosis intermedias-altas de PIRs: en general hipertermia para los tipo I, hipotermia para los tipo II, y cuando se examinan dosis de baja efectividad (~1 - 6 mg/kg para los PIRs de esta tesis) todos los compuestos causan un leve aumento de temperatura corporal (Wolansky y Harrill, 2008; Wolansky y col., 2007a). Esta dependencia de la estructura química y la dosis parece indicar la participación de sitios moleculares de acción alternativos a nivel neuronal, no sólo de los canales CSDV, como propuso Soderlund y col. (2002). Aun con estas diferencias fisiológicas y toxicológicas en el rol y la susceptibilidad de la actividad motora y el control de temperatura corporal, en los estudios usando la mezcla de 5 PIRs y actividad motora de Wolansky y col. (2009), Starr (2012, 2014), y Hughes y col. (2016b) y esta investigación (mezcla cuaternaria y Tsc) se encontraron resultados coherentes con el modelo de dosis aditivas bajas.

Por último, es pertinente mencionar que este es uno de los pocos estudios de mezclas de este tipo que se han reportado a nivel mundial, y al momento de iniciar este trabajo representaba en nuestro país la primera prueba que utiliza el MPR el cual fuera propuesto por consenso internacional para la evaluación de riesgo acumulativo de intoxicación luego de exposición a mezclas de dosis bajas de plaguicidas y otros contaminantes en humanos (Chen y col., 2001; Lipscomb y Rice, 2014) con un mismo modo de acción (ya utilizado para PIRs, carbamatos, y OFs) a fin de proponer Límites Máximos de Residuos (LMR). Los procedimientos aplicados podrían servir como una aproximación a fin de evaluar los riesgos de combinaciones en las dietas o en el

ambiente. Para una única dosis de cada componente, el número de grupos posibles de 4 compuestos tomados a partir de total de compuestos combinables (~40 en el caso de PIRs) alcanza un número de mezclas imposible de evaluar adecuadamente por las capacidades de los laboratorios de todo el mundo en un tiempo razonable. A su vez ese número se ve potenciado porque cada componente puede existir dentro de un rango determinado de concentraciones. Por eso, la primera instancia para una aproximación económica y eficiente es la selección de mezclas en concentraciones a niveles bajos. Y con las combinaciones que presenten *a priori* mayor potencial tóxico (utilizando paradigmas modernos de priorización en matrices peligro-exposición-riesgo) utilizar la aproximación metodológica descripta en este trabajo para evaluar si existe evidencia que anticipe la posibilidad de interacciones sinérgicas. Aquellas combinaciones que no muestran potencial para potenciación sinérgica pueden luego ser manejadas con las metodologías tradicionales de evaluación regulatoria (predicción de riesgo conjunto en función del riesgo asociado a cada componente de la mezcla). Como una limitante a la extrapolación de los resultados de los estudios de mezclas disponibles (Wolansky y col., 2009; Starr y col., 2012, 2014; Bardullas y col., 2015; Hughes y col., 2016b; y esta investigación) se debe mencionar que todos los datos reportados hasta ahora corresponden a estudios de exposición oral aguda. Si las conclusiones de esos trabajos son aplicables al caso de exposiciones por otras vías (dermal, inhalatoria) y/o repetidas/crónicas a mezclas de PIRs es una cuestión que amerita ser investigada. Al presente, sólo existe una única publicación que propone ausencia de efectos acumulativos en la función locomotora luego de la exposición diaria repetida durante un mes completo en ratas adultas jóvenes a dosis de baja efectividad de 2 mg/kg de DTM (ciano-PIR) o 6 mg/kg de cismetrina (PIR sin grupo ciano) (Crofton y Reiter, 1984), lo cual indicaría que la exposición repetida no causa un daño creciente en la función motora. Si esto fuera confirmado para otros PIRs y para otras combinaciones de 2, 3 y 4 PIRs, entonces los resultados observados en modelos experimentales que usan paradigmas de exposición oral única (en bolo) a mezclas (como en esta investigación) podrían ser considerados en casos de exposición repetida.

CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS

10. Conclusiones y Perspectivas

10.1. Conclusiones finales

Se confirma que la temperatura subcutánea es un marcador de efecto adecuado para caracterizar la perturbación de la homeostasis del calor corporal en mamíferos, luego de la exposición a PIRs en estudios dosis-efecto diseñados para evaluar mezclas de interés. Según el caso puede requerirse hacer ajustes a la metodología para reducir la variabilidad intra- e inter-grupo.

- **Experimento administración simple**

La calidad y la magnitud del efecto máximo sobre la temperatura subcutánea y la relación tiempo-efecto dependieron de la estructura del PIR, lo cual está de acuerdo con múltiples estudios previos.

- **Experimento de administración de la mezcla de PIRs**

En general, el efecto provocado por los PIRs cuando se administraron en conjunto fue similar al esperado según el Modelo de Dosis Aditiva dentro del rango de dosis más bajas (0,09 a 1 mg/kg de cada PIR). Por su parte la dosis evaluada más alta (D3, con ~0,9 - 1,9 mg/kg de cada PIR) causó signos leves a moderados de neurotoxicidad y alteraciones leves del control térmico corporal. Sin embargo al convertir los mg/kg de cada PIR en la dosis de EQ_{TEF} (usando el Método de la Potencias Relativas) el efecto conjunto fue menor que el esperable según el modelo de dosis aditivas. La evidencia parece sugerir que a medida que las dosis individuales se acercan a niveles de baja efectividad (como BMD_{30}), el efecto conjunto de la mezcla de esos niveles deja de cumplir con el modelo de dosis aditivas. Para confirmar esto último se requieren estudios diseñados específicamente con ese fin.

- **Método Analítico para Mezclas de PIRs**

El protocolo de extracción, purificación, análisis y cuantificación desarrollado para esta investigación doctoral permitió determinar concentraciones en tejidos > 4 ng/g; ng/mL utilizando la infraestructura y equipamiento disponible, lo cual fue suficiente para cumplir los objetivos principales de esta tesis, y evaluar PIRs por primera vez en el caso de TEF y α-CPM en el contexto de estudios dosis-efecto. Parte

de esta experiencia podría ser útil en trabajos futuros con otras mezclas de plaguicidas modos de acción similares o distintos.

- **Relación dosis administrada, efecto y concentración en tejidos – Ensayos de mezcla de PIRs**

Las proporciones de los PIRs en CE (que representa sistema nervioso donde se genera la respuesta tóxica) y en HG (donde se concentra la mayor capacidad metabólica detoxificante) fueron similares a las combinadas en la solución de la mezcla administrada. La evidencia parece sugerir que en mezclas de dosis bajas la toxicodinamia es un determinante más relevante que la toxicocinética al momento de predecir la acción conjunta de una mezcla.

En este trabajo se generó evidencia que permite sugerir que, al menos a las ~6 h post-administración de la mezcla cuaternaria, la distribución de cada PIR en los tejidos no se vió afectada por la coadministración de otros compuestos pertenecientes a la misma familia de plaguicidas. En el tiempo examinado (~6 h), la SG no presentó concentraciones que puedan ser aceptablemente correlacionadas con las proporciones en la mezcla administrada y en el tejido blanco (CE). Si bien esto pudo haber sido influenciado en algunos casos por el N por grupo experimental y por otros factores experimentales, ya había sido propuesto que la SG tiene utilidad limitada para predecir concentración en sistema nervioso central debido a la rápida absorción/ metabolización/ eliminación para algunos PIRs y la variabilidad de la toxicocinética entre PIRs (por ejemplo comparando DTM y BIF).

De los 4 PIRs que conformaron la mezcla administrada, BIF pareció ser el que generó el principal efecto sobre la ΔTsc (leve hipertermia). Además su nivel en CE tanto en masa como en proporción pareció estar asociado con los hallazgos experimentales.

Se generó información que permitió establecer por primera vez la relación entre la dosis administrada, el efecto en temperatura subcutánea y la concentración en tejido blanco (CE) para TEF y α-CPM.

10.2. Perspectivas Futuras

- En un estudio complementario se podría incluir en el proceso de validación del método analítico la identificación y cuantificación de otros PIRs, así como también otros insecticidas con diferente mecanismo de acción (como los OFs), utilizando grupos independientes de animales para evaluar la concentración en tejidos a distintos tiempos post-administración. Esto permitiría tener más información acerca de mezclas simples y complejas de plaguicidas, especialmente en el caso de plaguicidas para los cuales existe poca información toxicológica en la literatura.

- Un aspecto muy importante que amerita ser evaluado es la relación entre dosis administrada, dosis interna, concentración en tejido/s blanco/s y efecto para mezclas de plaguicidas con diferentes MPdT. Para ello la hipótesis por defecto que deberá ser evaluada dependerá del caso (modelo de suma de efectos para mezclas constituidas con plaguicidas de distinto MPdA; modelo de dosis aditivas para mezclas de plaguicidas con un mismo MPdA). Luego de casi 100 años de síntesis, desarrollo y aplicación de plaguicidas orgánicos sintéticos (llegando actualmente a más de 1500 ingredientes activos), y la constatación desde hace décadas que cotidianamente co-ocurren niveles bajos (en general menores a los LMR) de varios plaguicidas en los alimentos y de los compartimentos ambientales tanto en zonas urbanas como suburbanas, parece oportuno incrementar las capacidades de estudios de mezclas simulando diferentes situaciones de exposición en animales.

Estos resultados a futuro podrían ser útiles a fin de establecer límites regulatorios más precisos a fin de ayudar a preservar la salud humana.

Química. Mónica Elizabeth Mosquera Ortega

Tesista Doctoral

Dr. Marcelo J. Wolansky

Director de Tesis

Dra. Edda Villaamil Lepori

Codirectora de Tesis

BIBLIOGRAFÍA

11. BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Daim, M.M., Abuzead, S.M.M., Halawa, S.M., 2013. Protective Role of Spirulina platensis against Acute Deltamethrin-Induced Toxicity in Rats. PLoS One 8.

Abdel-Rahman, A., Shetty, A.K., Abou-Donia, M.B., 2001. Subchronic Dermal Application of N,N-Diethyl m-Toluamide (DEET) and Permethrin to Adult Rats, Alone or in Combination, Causes Diffuse Neuronal Cell Death and Cytoskeletal Abnormalities in the Cerebral Cortex and the Hippocampus, and Purkinje Neuron Loss in the cerebellum. Exp. Neurol. 172, 153–171.

Alan Wood. Alan Wood's Compendium of Pesticide Common Names: Classified Lists of Pesticides.

Alzogaray, R., 2003. El control quimico de Triatoma infestans en Argentina. RETEL. SERTOX. 9, 1-18.

Anadón, A., Martínez, M., Martínez, M.A., Díaz, M.J., Martínez-Larrañaga, M.R., 2006. Toxicokinetics of lambda-cyhalothrin in rats. Toxicol. Lett. 165, 47–56.

Anadón A, Martínez-Larrañaga MR, Diaz MJ, Bringas P.,1991. Toxicokinetics of permethrin in the rat. Toxicol Appl Pharmacol 110, 1-8.

Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M., Fernández-Cruz, M., Diaz, M., Fernandez, M., Martinez, M., 1996. Toxicokinetics of Deltamethrin and Its 4′-HO-Metabolite in the Rat. Toxicol. Appl. Pharmacol. 141, 8–16.

Aouey, B., Derbali, M., Chtourou, Y., Bouchard, M., Khabir, A., Fetoui, H., 2017. Pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin and its metabolites induce liver injury through the activation of oxidative stress and proinflammatory gene expression in rats following acute and subchronic exposure. Environ. Sci. Pollut. Res. 24, 5841–5856.

Aprea, C., Colosio, C., Mammone, T., Minoia, C., Maroni, M., 2002. Biological monitoring of pesticide exposure: A review of analytical methods. J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 769, 191–219.

Argauer, R.J., Lehotay, S.J., Brown, R.T., 1997. Determining Lipophilic Pyrethroids and Chlorinated Hydrocarbons in Fortified Ground Beef Using Ion-Trap Mass Spectrometry. J. Agric. Food Chem. 45, 3936–3939.

ATSDR., 2003. Toxicological Profile: Pyrethrins and Pyrethroids. https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=787&tid=153.

Aumann, T.D., Horne, M.K., 1996. Ramification and termination of single axons in the cerebellothalamic pathway of the rat. J. Comp. Neurol. 376, 420–430.

Barbini, D.A., Vanni, F., Girolimetti, S., Dommarco, R., 2007. Development of an analytical method for the determination of the residues of four pyrethroids in meat by GC-ECD and confirmation by GC-MS. Anal. Bioanal. Chem. 389, 1791–1798.

Bardullas, U., Sosa-Holt, C.S., Pato, A.M., Nemirovsky, S.I., Wolansky, M.J., 2015. Evidence for effects on thermoregulation after acute oral exposure to type I and type II pyrethroids in infant rats. Neurotoxicol. Teratol. 52, 1–10.

Berenbaum, M.C., 1989. What is synergy? Pharmacol. Rev.41, 93-141.

Bloomquist, J.R., 1996. Ion Channels as Targets for Insecticides. Annu. Rev. Entomol. 41, 163–190.

Blumberg, M.S., Sokoloff, G., 1997. Dynamics of brown fat thermogenesis in week-old rats: Evidence of relative stability during moderate cold exposure. Physiol. Zool. 70, 324–330.

Bo, L., Hai-Yan, S., Ming-Hua, W., 2008. An Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Detection of Bifenthrin. Chinese J. Anal. Chem. 36, 34–38.

Casey, M., Gennings, C., Carter, W.H., Moser, V.C., Simmons, J.E., 2004. Detecting interaction(s) and assessing the impact of component subsets in a chemical mixture using fixed-ratio mixture ray designs. J. Agric. Biol. Environ. Stat. 9, 339–361.

Casida, J.E., 1980. Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides. Environ. Health Perspect.34, 189–202.

Casida, J.E., Quistad, G.B., 1998. Golden Age of Insecticide Research: Past, Present, or Future? Annu. Rev. Entomol. 43, 1–16.

Casida, J.E., Gammon, D.W., Glickman, A.H., Lawrence, L.J., 1983. Mechanisms of Selective Action of Pyrethroid Insecticides. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 23, 413–438.

Chen, J.J., Chen, Y.J., Rice, G., Teuschler, L.K., Hamernik, K., Protzel, A., Kodell, R.L., 2001. Using dose addition to estimate cumulative risks from exposures to multiple chemicals. Regul. Toxicol. Pharmacol. 34, 35–41.

Class, T.J., Kintrup, J., 1991. Pyrethroids as household insecticides: analysis, indoor exposure and persistence. Fresenius. J. Anal. Chem. 340, 446–453.

Crow JA, Borazjani A, Potter PM, Ross MK. 2007. Hydrolysis of pyrethroids by human and rat tissues: examination of intestinal, liver and serum carboxylesterases. Toxicol Appl Pharmacol. 221(1),1–12.

Crofton, K.M., Reiter, L.W., 1984. Effects of two pyrethroid insecticides on motor activity and the acoustic startle response in the rat. Toxicol. Appl. Pharmacol. 75, 318–28.

Crofton, K.M., Reiter, L.W., 1988. The effects of type I and II pyrethroids on motor activity and the acoustic startle response in the rat. Fundam. Appl. Toxicol. 10, 624–34.

Crump, K.S., 1984. A new method for determining allowable daily intakes. Fundam. Appl. Toxicol. 4, 854–71.

Dagnac, T., Garcia-Chao, M., Pulleiro, P., Garcia-Jares, C., Llompart, M., 2009. Dispersive solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass

spectrometry for the multi-residue analysis of pesticides in raw bovine milk. J. Chromatogr. A 1216, 3702–3709.

Dayal, M., Parmar, D., Ali, M., Dhawan, A., Dwivedi, U.N., Seth, P.K., 2001. Induction of rat brain cytochrome P450s (P450s) by deltamethrin: regional specificity and correlation with neurobehavioral toxicity. Neurotox. Res. 3, 351–7.

De Souza Pinheiro, A., de Andrade, J.B., 2009. Development, validation and application of a SDME/GC-FID methodology for the multiresidue determination of organophosphate and pyrethroid pesticides in water. Talanta 79, 1354–1359.

Dinse, G.E., Umbach, D.M., 2013. Quantifying relative potency in dose-response studies, en: Lecture Notes in Statistics. Springer Science and Business Media, LLC, pp. 315–331.

E.C., 2015. Proposed Approach for Cumulative Risk Assessment of Certain Phthalates under the Chemicals Management Plan. Health Canada, Environment Canada. https://www.ec.gc.ca/ese-ees/723C9007-1CBE-427D-BC20-755F25013B53/Approach_Phthalates%20%28CRA%29_EN.pdf. pp. 20

Ecobichon, D.J., 2001. Toxic effects of pesticides. In Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons., 6th Ed. McGraw-Hill, New York.

Edwards, R., Millburn, P., Hutson, D.H., 1986. Comparative toxicity of cis-cypermethrin in rainbow trout, frog, mouse, and quail. Toxicol. Appl. Pharmacol. 84, 512–22.

EFSA Scientific Committee, Hardy, A, Benford, D, Halldorsson, T, Jeger, MJ, Knutsen, KH, More, S, Mortensen, A, Naegeli, H, Noteborn, H, Ockleford, C, Ricci, A, Rychen, G, Silano, V, Solecki, R, Turck, D, Aerts, M, Bodin, L, Davis, A, Edler, L, Gundert-Remy, U, Sand, S, Slob, W, Bottex, B, Abrahantes, JC, Marques, DC, Kass, G and Schlatter, JR, 2017. Update: Guidance on the use of the benchmark dose approach in risk assessment. EFSA Journal 2017; 15(1):4658, p41.

Elliott, M., Farnham, A.W., Janes, N.F., Needham, P.H., Pulman, D.A., 1974. Synthetic insecticide with a new order of activity. Nature 248, 710–711.

Elliott, M., Farnham, A.W., Janes, N.F., Needham, P.H., Pulman, D.A., 1973. Potent pyrethroid insecticides from modified cyclopropane acids. Nature 244, 456–457.

FDA, 1994. Reviewer Guidance - Validation of chromatographic methods. CDER. Cent. Drug Eval. Res. 22, 1–30.

FDA, 2001. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM).

Forshaw, P.J., Lister, T., Ray, D.E., 2000. The Role of Voltage-Gated Chloride Channels in Type II Pyrethroid Insecticide Poisoning. Toxicol. Appl. Pharmacol. 163, 1–8.

Fujino, C., Watanabe, Y., Sanoh, S., Nakajima, H., Uramaru, N., Kojima, H., Yoshinari, K., Ohta, S., Kitamura, S., 2019. Activation of PXR, CAR and PPARα by pyrethroid pesticides and the effect of metabolism by rat liver microsomes. Heliyon 5, e02466.

Gaines, T.B., 1969. Acute toxicity of pesticides. Toxicol. Appl. Pharmacol. 14, 515–534.

Gammon, D., Liu, Z., Chandrasekaran, A., Elnaggar, S., 2015. The pharmacokinetic properties of bifenthrin in the rat following multiple routes of exposure. Pest Manag. Sci. 71, 835–841.

Gan J., Spurlock F., Hendley P., D., W., 2008. Synthetic pyrethroids use patterns, properties, and environmental effects., en: Society, A.C. (Ed.), American Chemical Society. Washington, D.C., pp. 3–25.

Ghiasuddin, S.M., Soderlund, D.M., 1984. Hydrolysis of pyrethroid insecticides by soluble mouse brain esterases. Toxicol. Appl. Pharmacol. 74, 390–396.

Glickman, A.H., Casida, J.E., 1982. Species and structural variations affecting pyrethroid neurotoxicity. Neurobehav. Toxicol. Teratol. 4, 793–9.

Gordon, C.J., 2005. Temperature and toxicology : an integrative, comparative, and environmental approach. Taylor & Francis.

Gordon, C.J., Spencer, P.J., Hotchkiss, J., Miller, D.B., Hinderliter, P.M., Pauluhn, J., 2008. Thermoregulation and its influence on toxicity assessment. Toxicology 244, 87–97.

Goulart, S.M., de Queiroz, M.E.L.R., Neves, A.A., de Queiroz, J.H., 2008. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. Talanta 75, 1320–1323.

Gray, A.J., 1985. Pyrethroid structure-toxicity relationships in mammals. Neurotoxicology 6, 127–37.

Gray, A.J., Rickard, J., 1982. Toxicity of pyrethroids to rats after direct injection into the central nervous system. Neurotoxicology 3, 25–35.

Haber, L.T., Dourson, M.L., Allen, B.C., Hertzberg, R.C., Parker, A., Vincent, M.J., Maier, A., Boobis, A.R., 2018. Benchmark dose (BMD) modeling: current practice, issues, and challenges. Crit. Rev. Toxicol. .

Hainsworth, F.R., 1967. Saliva spreading, activity, and body temperature regulation in the rat. Am. J. Physiol. 212, 1288–1292.

Hughes, M.F., Edwards, B.C., 2016. In vivo dermal absorption of pyrethroid pesticides in the rat. J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A Curr. Issues 79, 83–91.

Hughes, M.F., Ross, D.G., Edwards, B.C., DeVito, M.J., Starr, J.M., 2016. Tissue time course and bioavailability of the pyrethroid insecticide bifenthrin in the Long-Evans rat. Xenobiotica 46, 430–438.

Hughes, M.F., Ross, D.G., Starr, J.M., Scollon, E.J., Wolansky, M.J., Crofton, K.M., DeVito, M.J., 2016. Environmentally relevant pyrethroid mixtures: A study on the correlation of blood and brain concentrations of a mixture of pyrethroid insecticides to motor activity in the rat. Toxicology 359–360, 19–28.

INTA., 2016. Principales características de los insecticidas utilizados en el cultivo de soja.https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-insecticidas_utilizados_ en_soja-_caractersticas.pdf

Jardim, A.N.O., Caldas, E.D., 2012. Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food - Results from 2001 to 2010. Food Control 25, 607–616.

Katsuda, Y., 1999. Development of and future prospects for pyrethroid chemistry. Pestic. Sci. 55, 775–782.

Kim, K.B., Anand, S.S., Kim, H.J., White, C.A., Bruckner, J. V., 2008. Toxicokinetics and tissue distribution of deltamethrin in adult Sprague-Dawley rats. Toxicol. Sci. 101, 197–205.

Kim, K.B., Bartlett, M.G., Anand, S.S., Bruckner, J. V, Kim, H.J., 2006. Rapid determination of the synthetic pyrethroid insecticide, deltamethrin, in rat plasma and tissues by HPLC. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 834, 141–8.

Kim, K.-B., Anand, S.S., Muralidhara, S., Kim, H.J., Bruckner, J. V., 2007. Formulation-dependent toxicokinetics explains differences in the GI absorption, bioavailability and acute neurotoxicity of deltamethrin in rats. Toxicology 234, 194–202.

Kirby, C., 1980. The hormone weedkillers : a short history of their discovery and development. BCPC Publications.

Kirchhoff, L., 1998. Tripanosomiasis, en: Mc Graw Hill. Interamericana de España, S.A.. (Ed.), Harrison. Principios de medicina interna. Madrid, pp. 1367–1371.

Klaassen, C.D., 2008. Cassarett and Doull´s. Toxicology. The basic science of poisons, 7th ed, Casarett E Doull's - Toxicology: The basic science of poisons. New York.

Kort, W.J., Hekking-Weijma, J.M., Tenkate, M.T., Sorm, V., VanStrik, R., 1998. A microchip implant system as a method to determine body temperature of terminally ill rats and mice. Lab. Anim. 32, 260–269.

Kienzler, A., Bopp, S.K., van der Linden, S., Berggren, E., Worth, A., 2016. Regulatory assessment of chemical mixtures: Requirements, current approaches and future perspectives. Regul. Toxicol. Pharmacol.

Krieger, R. 2010. Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology. 3ra Ed. Elsevier. 2317p.

Kris Andrews, Shelly McErlane, 2015. Oral Dosing (Gavage) in Mice and Rats SOP, UBC Animal Care Guidelines.

Kuang, H., Miao, H., Hou, X.L., Zhao, Y.F., Shen, J.Z., Xu, C.L., Wu, Y.N., 2009. Determination of Pyrethroid Residues in Pork Muscle by Immunoaffinity Cleanup and GC-ECD. Chromatographia 70, 995–999.

Laskowski, D.A., 2002. Physical and chemical properties of pyrethroids. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 174, 49–170.

Leng, G., Gries, W., 2009. Determination of Pyrethroids in Blood Plasma and Pyrethroid/Pyrethrin Metabolites in Urine by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and High-Resolution GC-MS. Pestic. Protoc. 19, 17–33.

Lipscomb, J.C. and Rice, G.E. Rice, 2014. Uncertainty in Mixtures and Cumulative Risk Assessment. EFSA Scientific Colloquium #21, Harmonisation of human and ecological risk assessment of combined exposure to multiple chemicals. https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/assets/140911-p06.pdf

Lyles, R.H., Poindexter, C., Evans, A., Brown, M., Cooper, C.R., 2008. Nonlinear model-based estimates of IC(50) for studies involving continuous therapeutic dose-response data. Contemp. Clin. Trials 29, 878–86.

Marei, A.E.S.M., Ruzo, L.O., Casida, J.E., 1982. Analysis and persistence of permethrin, cypermethrin, deltamethrin and fenvalerate in the fat and brain of treated rats. J. Agric. Food Chem. 30, 558–562.

Marshall, S., Gennings, C., Teuschler, L.K., Stork, L.G., Tornero-Velez, R., Crofton, K.M., Rice, G.E., 2013. An empirical approach to sufficient similarity: Combining exposure data and mixtures toxicology data. Risk Anal. 33, 1582–1595.

McDaniel, K.L., Moser, V.C., 1993. Utility of a neurobehavioral screening battery for differentiating the effects of two pyrethroids, permethrin and cypermethrin. Neurotoxicol. Teratol. 15, 71–83.

McLaughlin, G.A., 1973. History of pyrethrum. In: Casida, J.E. (ed.) Pyrethrum the Natural Insecticide. Academic Press, New York.

Mekebri, A., Crane, D.B., Blondina, G.J., Oros, D.R., Rocca, J.L., 2008. Extraction and analysis methods for the determination of pyrethroid insecticides in surface water, sediments and biological tissues at environmentally relevant concentrations. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 80, 455–460.

Mirfazaelian, A., Kim, K.-B., Anand, S.S., Kim, H.J., Tornero-Velez, R., Bruckner, J. V., Fisher, J.W., 2006. Development of a Physiologically Based Pharmacokinetic Model for Deltamethrin in the Adult Male Sprague-Dawley Rat. Toxicol. Sci. 93, 432–442.

Miyamoto, J., 1976. Degradation, metabolism and toxicity of synthetic pyrethroids. Environ. Health Perspect. 14, 15–28.

Morgan, M.K., 2012. Children's exposures to pyrethroid insecticides at home: a review of data collected in published exposure measurement studies conducted in the United States. Int. J. Environ. Res. Public Health 9, 2964–2985.

Mortuza, T., Chen, C., White, C.A., Cummings, B.S., Muralidhara, S., Gullick, D., Bruckner, J. V, 2018. Toxicokinetics of Deltamethrin: Dosage Dependency, Vehicle Effects, and Low-Dose Age-Equivalent Dosimetry in Rats. Toxicol. Sci. 162, 327–336.

Motomura, H., Narahashi, T., 2001. Interaction of tetramethrin and deltamethrin at the single sodium channel in rat hippocampal neurons. Neurotoxicology 22, 329–339.

MSAL, 2007. AAMMA. La problemática de los agroquímicos y sus envases, su incidencia en la salud de los trabajadores, la población expuesta por el ambiente. 1 Ed. Buenos Aires: Ministerio de Salud, Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable. 312 p.

MSAL, 2010. GUIA PARA CONTROL VECTORIAL CHAGAS. Programa Nacional de Chagas. Ministerio de Salud de la Nacion. República Argentina. Disponible en: http://www.anlis.gov.ar/compras/wp-content/uploads/2018/05/GUIA-PARA-CONTROL-VECTORIAL-CHAGAS.pdf.

Narahashi, T., 1996. Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. Pharmacol. Toxicol. 79, 1–14.

NRC, 2011. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. Washington, DC: The National Academies Press. http://nap.edu.

Niewiadowska, A., Kiljanek, T., 2010. Determination of pyrethroid residues in meat by gas chromatography with electron capture detection. Bull Vet Inst. 595–599.

Ortiz-Pérez, M.D., Torres-Dosal, A., Batres, L.E., López-Guzmán, O.D., Grimaldo, M., Carranza, C., Pérez-Maldonado, I.N., Martínez, F., Pérez-Urizar, J., Díaz-Barriga, F., 2005. Environmental health assessment of deltamethrin in a malarious area of Mexico: Environmental persistence, toxicokinetics, and genotoxicity in exposed children. Environ. Health Perspect. 113, 782–786.

Pang, G.F., Cao, Y.Z., Zhang, J.J., Fan, C.L., Liu, Y.M., Li, X.M., Jia, G.Q., Li, Z.Y., Shi, Y.Q., Wu, Y.P., Guo, T.T., 2006. Validation study on 660 pesticide residues in animal tissues by gel permeation chromatography cleanup/gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1125, 1–30

Pato, A.M., Sosa Holt, C., Wolansky, M.J., 2011. Time, dose, and structure dependent actions of pyrethroid insecticides on rat thermoregulation. Toxicol. 120, 1346.

Pronk, M.E.J., Speijers, G.J.A., Wouters, M.F.A., Ritter, L., 1996. Insecticides: Cypermethrin and α-Cypermethrin.Toxicol. Eval. Certain Vet. drug residues food.

Pulikanti, R., Peebles, E.D., Gerard, P.D., 2011. Physiological responses of broiler embryos to in ovo implantation of temperature transponders. Poult. Sci. 90, 308–313.

Radcliffe, E.B., Hutchison, W.D., Cancelado, R.E., 2008. Integrated Pest Management, Integrated Pest Management: Concepts, Tactics, Strategies and Case Studies. Cambridge University Press, Cambridge.

Ramesh, A., Ravi, P.E., 2004. Electron ionization gas chromatography-mass spectrometric determination of residues of thirteen pyrethroid insecticides in whole blood. J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 802, 371–376.

Ray, D.E., Fry, J.R., 2006. A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. Pharmacol. Ther. 111, 174–193.

Roell, K.R., Reif, D.M., Motsinger-Reif, A.A., 2017. An introduction to terminology and methodology of chemical synergy-perspectives from across disciplines. Front. Pharmacol. 8,158.

Romero, D.M., 2014. Desarrollo de un Sistema Exploratorio in vitro para la Caracterización de los Efectos Adversos Producidos por Insecticidas y Mezclas Relevantes de los Mismos. Tesis Doctoral. Director: Dr. M. Wolansky; Co-Directora: Dra. M. Kotler. FCEN. Universidad de Buenos Aires.

Ross, M.K., Borazjani, A., Edwards, C.C., Potter, P.M., 2006. Hydrolytic metabolism of pyrethroids by human and other mammalian carboxylesterases. Biochem. Pharmacol. 71, 657–669.

Saillenfait, A.M., Ndiaye, D., Sabaté, J.P., 2015. Pyrethroids: Exposure and health effects - An update. Int. J. Hyg. Environ. Health.

Sand, S., Victorin, K., Filipsson, A.F., 2008. The current state of knowledge on the use of the benchmark dose concept in risk assessment. J. Appl. Toxicol. 28, 405–421 .

Santos, M.A.T., Rodrigues, M.V.N., Áreas, M.A., Reyes, F.G.R., 2011. Deltamethrin and permethrin in the liver and heart of wistar rats submitted to oral subchronic exposure. J. Braz. Chem. Soc. 22, 891–896.

Scollon, E.J., Starr, J.M., Crofton, K.M., Wolansky, M.J., DeVito, M.J., Hughes, M.F., 2011. Correlation of tissue concentrations of the pyrethroid bifenthrin with neurotoxicity in the rat. Toxicology 290, 1–6.

Shafer, T.J., Meyer, D.A., Crofton, K.M., 2005. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. Environ. Health Perspect. 113, 123–36.

Silins, I., Högberg, J., 2011. Combined toxic exposures and human health: Biomarkers of exposure and effect. Int. J. Environ. Res. Public Health.

Soderlund, D.M., 2012. Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. Arch. Toxicol. 86, 165–181.

Soderlund, D.M., Casida, J.E., 1977. Effects of pyrethroid structure on rates of hydrolysis and oxidation by mouse liver microsomal enzymes. Pestic. Biochem. Physiol. 7, 391–401.

Soderlund, D.M., Clark, J.M., Sheets, L.P., Mullin, L.S., Piccirillo, V.J., Sargent, D., Stevens, J.T., Weiner, M.L., 2002. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. Toxicology 171, 3–59.

Song, J.H., Narahashi, T., 1996. Modulation of sodium channels of rat cerebellar Purkinje neurons by the pyrethroid tetramethrin. J. Pharmacol. Exp. Ther. 277, 445–53.

Spencer, C.I., Sham, J.S.K., 2005. Mechanisms Underlying the Effects of the Pyrethroid Tefluthrin on Action Potential Duration in Isolated Rat Ventricular Myocytes. J. Pharmacol. Exp. Ther. 315, 16–23.

Starr, J.M., Graham, S.E., Ross, D.G., Tornero-Velez, R., Scollon, E.J., DeVito, M.J., Crofton, K.M., Wolansky, M.J., Hughes, M.F., 2014. Environmentally relevant mixing ratios in cumulative assessments: A study of the kinetics of pyrethroids and their ester cleavage metabolites in blood and brain; and the effect of a pyrethroid mixture on the motor activity of rats. Toxicology 320, 15–24.

Starr, J.M., Scollon, E.J., Hughes, M.F., Ross, D.G., Graham, S.E., Crofton, K.M., Wolansky, M.J., DeVito, M.J., Tornero-Velez, R., 2012. Environmentally relevant mixtures in cumulative assessments: An acute study of toxicokinetics and effects on motor activity in rats exposed to a mixture of pyrethroids. Toxicol. Sci. 130, 309–318.

Sudakin, D., 2006. Pyrethroid insecticides: Advances and challenges in biomonitoring. Clin. Toxicol.

Swadlow, H.A., Waxman, S.G., Weyand, T.G., 1981. Effects of variations in temperature on impulse conduction along nonmyelinated axons in the mammalian brain. Exp. Neurol. 71, 383–389.

Tan, J., Soderlund, D.M., 2010. Divergent actions of the pyrethroid insecticides S-bioallethrin, tefluthrin, and deltamethrin on rat Nav1.6 sodium channels. Toxicol. Appl. Pharmacol. 247, 229–237.

Todd, D., Wohlers, D., Citra, M., 2003. Toxicological Profile for Pyrethrins and Pyrethroids. U.S. Dep. Heal. Hum. Serv. Agency Toxic Subst. Dis. Regist.

Tomlin, C.D.S., 2000. The Pesticide Manual - World Compendium., en: Surrey (Ed.), The Pesticide Manual. World Compendium. The British Crop Protection Council, U.K., p. 878.

Tornero-Velez, R., Davis, J., Scollon, E.J., Starr, J.M., Setzer, R.W., Goldsmith, M.-R., Chang, D.T., Xue, J., Zartarian, V., De Vito, M.J., Hughes, M.F., 2013. A Pharmacokinetic Model of cis- and trans-Permethrin Disposition in Rats and Humans With Aggregate Exposure Application. Toxicol. Sci. 130, 33–47.

Tornero-Velez, R., Mirfazaelian, A., Kim, K.-B., Anand, S.S., Kim, H.J., Haines, W.T., Bruckner, J. V., Fisher, J.W., 2010. Evaluation of deltamethrin kinetics and dosimetry in the maturing rat using a PBPK model. Toxicol. Appl. Pharmacol. 244, 208–217.

Tsuji, R., Yamada, T., Kawamura, S., 2011. Mammal Toxicology of Synthetic Pyrethroids, en: Topics in current chemistry. pp. 83–111.

Tulve, N.S., Jones, P. a, Nishioka, M.G., Fortmann, R.C., Croghan, C.W., Zhou, J.Y., Fraser, A., Cavel, C., Friedman, W., 2006. Pesticide measurements from the first national environmental health survey of child care centers using a multi-residue GC/MS analymethod. Environ. Sci. Technol. 40, 6269–74.

Ueyama, J., Hirosawa, N., Mochizuki, A., Kimata, A., Kamijima, M., Kondo, T., Takagi, K., Wakusawa, S., Hasegawa, T., 2010. Toxicokinetics of pyrethroid metabolites in male and female rats. Environ. Toxicol. Pharmacol. 30, 88–91.

USEPA, 1975. DDT, a Review of Scientific and Economic Aspects of the Decision to Ban Its Use as a Pesticide. NEPIS. US EPA. https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/910128JF.txt?

USEPA, 2000. Supplementary Guidance for Conducting Health Risk Assessment of Chemical Mixtures. Washington, DC.

USEPA, 2003. Developing Relative Potency Factors for Pesticide Mixtures: Biostatistical Analysis of Joint Dose-Response. United States Environmental Protection Agency, National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Cincinnati, OH.

USEPA, 2008. https://www.epa.gov/pesticides/pesticides-and-public-health#regulation

USEPA, 2012. http://www.epa.gov/opp00001/cumulative/

USEPA, 2017. Pyrethrins and Pyrethroids. https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/pyrethrins-and-pyrethroids

Verschoyle, R.D., Aldridge, W.N., 1980. Structure-activity relationships of some pyrethroids in rats. Arch. Toxicol. 45, 325–9.

Vijverberg, H.P.M., Van den Bercken, J., 1990. Neurotoxicological Effects and the Mode of Action of Pyrethroid Insecticides. Crit. Rev. Toxicol. 21, 105–126.

WHO, 2005. Safety of pyrethroids for public health use. WHO/Department of Communicable Disease Prevention, Control and Eradication.

WHO, 2017. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255543/9789241512374-eng.pdf.

WHO, 2010. The WHO recommended classification of pesticides by hazard. Guidelines to Classification 2009. International Programme on Chemical Safety. Geneve.

Williams, M.T., Herring, N.R., Schaefer, T.L., Skelton, M.R., Campbell, N.G., Lipton, J.W., McCrea, A.E., Vorhees, C. V, 2007. Alterations in Body Temperature, Corticosterone and Behavior Following the Administration of 5-Methoxy-Diisopropyltryptamine ('Foxy') to Adult Rats: a New Drug of Abuse. Neuropsychopharmacology 32, 1404–1420.

Wolansky, M.J., Gennings, C., Crofton, K.M., 2006. Relative potencies for acute effects of pyrethroids on motor function in rats. Toxicol. Sci. 89, 271–7.

Wolansky, M.J., Mack, C.M., Becker, C.J., Crofton, K.M., Gordon, C.J., 2007. Effects of acute pyrethroid exposure on thermoregulation in rats. Toxicol. 96, 423.

Wolansky, M.J., McDaniel, K.L., Moser, V.C., Crofton, K.M., 2007. Influence of dosing volume on the neurotoxicity of bifenthrin. Neurotoxicol. Teratol. 29, 377-384.

Wolansky, M.J., Tornero-Velez, R., 2013. Critical consideration of the multiplicity of experimental and organismic determinants of pyrethroid neurotoxicity: a proof of concept. J. Toxicol. Environ. Health. B. Crit. Rev. 16, 453–90.

Wolansky, M.J., Harrill, J.A., 2008. Neurobehavioral toxicology of pyrethroid insecticides in adult animals: A critical review. Neurotoxicol. Teratol. 30, 55–78.

Wolansky, M.J., Gennings, C., DeVito, M.J., Crofton, K.M., 2009. Evidence for dose-additive effects of pyrethroids on motor activity in rats. Environ. Health Perspect.117, 1563-1570.

Woollen, B.H., Marsh, J.R., Laird, W.J.D., Lesser, J.E., 1992. The metabolism of cypermethrin in man: differences in urinary metabolite profiles following oral and dermal administration. Xenobiotica 22, 983–991.

Yeatts, S.D., Gennings, C., Wagner, E.D., Simmons, J.E., Plewa, M.J., 2010. Detecting departure from additivity along a fixed-ratio mixture ray with a piecewise model for dose and interaction thresholds. J. Agric. Biol. Environ. Stat. 15, 510–522.