



**Universidad Nacional del Comahue
Centro Regional Universitario Bariloche**

**IMPACTO DEL PLAGUICIDA ORGANOFOSFORADO METILAZINFOS
SOBRE EL METABOLISMO DE POLIAMINAS EN EL DESARROLLO
EMBRIONARIO DEL SAPO COMÚN (*Rhinella arenarum*)**

Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctor en Biología

Lic. Cecilia Inés Lascano

Director: Dr. Andrés Venturino

Co-Directora: Dra. Ana Ferrari

2012

La zona del Alto Valle de Río Negro y Neuquén se caracteriza por una intensiva producción frutícola, por lo que se aplican anualmente elevadas cantidades de plaguicidas organofosforados, particularmente metilazinfos. Los organismos no-blanco pueden verse afectados por dicho plaguicida no sólo a nivel nervioso sino por su impacto sobre otras vías metabólicas. Particularmente, los embriones de anfibios que habitan los cuerpos de agua de la zona productiva durante el periodo de aplicación de metilazinfos pueden resultar afectados durante su desarrollo embrionario. El metabolismo de poliaminas es clave para la progresión del desarrollo normal, de manera que el presente trabajo de tesis tiene como objetivo estudiar el impacto del plaguicida metilazinfos sobre la vía metabólica de poliaminas durante el desarrollo embrionario del sapo común, *Rhinella (Bufo) arenarum* (Hensel, 1867).

El metabolismo de poliaminas fue afectado por el insecticida metilazinfos, provocando un incremento de Put y un descenso en los niveles de espermidina (Spd) y espermina (Spm) sobre el final del desarrollo embrionario, junto con un incremento de la actividad de ornitina decarboxilasa (ODC; síntesis de Put) y de diamino oxidasa (DAO; degradación de Put) a partir de estadios de desarrollo intermedios. Los niveles del factor de transcripción c-Fos se vieron incrementados en núcleo de embriones expuestos a metilazinfos en dichos estadios, en concordancia con el incremento de actividad de ODC, mientras que en estadios tempranos c-Fos fue sólo detectado en embriones control. El sistema de defensa antioxidante de los embriones expuestos a metilazinfos también resultó alterado. Los embriones tempranos evidenciaron una respuesta protectora frente a la toxicidad del plaguicida, caracterizada por el incremento de la actividad de glutatión-S-transferasa (GST) y glutatión reductasa (GR), mientras que la actividad de superóxido dismutasa (SOD) fue inhibida. A medida que transcurrió el desarrollo embrionario, la respuesta protectora de GST y GR desapareció mientras que a la inhibición de SOD se le sumó la de la actividad glutatión peroxidasa Se-dependiente (SeGPx), lo que deja en evidencia la incapacidad de los embriones para lidiar con una situación de estrés prolongada en el tiempo. Finalmente, en el último estadio de desarrollo embrionario, los individuos sufrieron una disminución de los niveles endógenos del antioxidante celular glutatión reducido (GSH) además de la inhibición de SOD. La actividad de la enzima colinesterasa (ChE) sólo se vio afectada por exposición a metilazinfos sobre el final del desarrollo embrionario, siendo muy baja su actividad en estadios tempranos e intermedios. Además, se observó un incremento en el porcentaje de embriones malformados por exposición a metilazinfos, que alcanzó un 100% en aquellos individuos expuestos a la mayor concentración del insecticida. Las alteraciones morfológicas observadas incluyen atrofia de branquias, acortamiento axial, curvatura dorsal de la aleta caudal, edema abdominal y epitelial y un arresto generalizado del desarrollo embrionario. Se observó una buena correlación entre el

incremento en los niveles de Put y la aparición de alteraciones morfológicas en los embriones expuestos a metilazinfos.

Se concluye que el insecticida metilazinfos altera el metabolismo de poliaminas al incrementar la síntesis de Put a través de la vía c-Fos - ODC para compensar la disminución de Spd y Spm, lo que a su vez conduce a un aumento de la degradación de Put a través de DAO. Esto provoca una alteración en el estado redox celular, que acompañaría a la provocada por el organofosforado *per se*, lo que conduce a la aparición de alteraciones en el desarrollo embrionario. Además, debido a que la actividad de las enzimas SOD y GST y los niveles del factor de transcripción c-Fos se vieron alterados en estadios tempranos de desarrollo y a bajas concentraciones de metilazinfos, a diferencia de ChE, su respuesta puede ser utilizada como marcador de exposición temprana a dicho insecticida.

Palabras clave: metilazinfos; anfibios; poliaminas; ornitina decarboxilasa; c-Fos; defensas antioxidantes; teratogénesis.

The intense fruit production that characterizes the region of the Alto Valle de Río Negro y Neuquén leads to the annual utilization of great quantities of organophosphorus pesticides, particularly azinphos methyl. Non-target species can be affected by azinphos methyl due to its impact not only on the nervous system but also on other metabolic pathways. For instance, amphibians that develop in water bodies of the productive region during the application period of azinphos methyl can be affected in critical developmental periods. Polyamine metabolism is crucial to the progression of normal development; hence, the objective of this thesis is to study the impact of azinphos methyl on polyamine metabolism during embryonic development of the common toad, *Rhinella (Bufo) arenarum* (Hensel, 1867).

Polyamine metabolism was affected by azinphos methyl. Putrescine (Put) levels were increased while spermidine (Spd) and spermine (Spm) levels decreased on late embryonic development. An increase in the activities of both ornithine decarboxylase (ODC; Put synthesis) and diamine oxidase (DAO; Put catabolism) were observed from intermediate developmental stages on. Similarly, c-Fos protein levels were increased in the aforementioned embryonic stages, which coincided with the increase in ODC activity, while early embryos exposed to azinphos methyl did not show any detectable c-Fos protein levels. The antioxidant defense system was also altered in embryos exposed to azinphos methyl. Early embryos displayed a protective response towards insecticide toxicity, characterized by the increase in the activities of glutathione S-transferase (GST) and glutathione reductase (GR), while superoxide dismutase (SOD) was inhibited. As embryonic development progressed, the protective response of GST and GR disappeared and Se-dependent glutathione peroxidase (SeGPx) was also inhibited, along with SOD inhibition. These alterations demonstrate that the embryos are unable to deal with a prolonged stress situation. Finally, at the end of embryonic development, SOD inhibition continued and the endogenous levels of reduced glutathione (GSH), the cellular antioxidant, were depleted. Cholinesterase (ChE) activity was low at early and intermediate stages and it was only affected by azinphos methyl at the end of embryonic development. Besides, an increase in the percentage of malformed embryos was observed at the end of embryonic development. 100% of the embryos exposed to the highest concentration of azinphos methyl were malformed. The morphological alterations commonly detected included gill atrophy, axial shortening, dorsal curvature of the caudal fin, abdominal and epithelial edema and generalized developmental arrest. The malformations observed in embryos exposed to azinphos methyl were correlated to the increase in Put levels.

We can conclude that the insecticide azinphos methyl alters polyamine metabolism by increasing Put synthesis through c-Fos - ODC in order to compensate for the decrease in the higher polyamines, Spd and Spm. This situation leads to an increase in Put degradation through

DAO, which alters redox cellular status through the production of reactive species. Metabolisation of azinphos methyl also alters redox cellular status and both circumstances lead to the alteration of embryonic development. Besides, SOD and GST activities as well as c-Fos levels, (modified by low concentrations of azinphos methyl at early developmental stages, unlike ChE), could be employed as biomarkers of early exposure to the insecticide.

Keywords: azinphos methyl; polyamines; ornithine decarboxylase; c-Fos; antioxidant defenses; teratogenesis.

Al Dr. Andrés Venturino, por darme la posibilidad de realizar el doctorado dentro de su grupo de trabajo.

A la Dra. Ana Ferrari, por haber accedido a ser mi Co-Directora (y mi segunda mamá...).

A Lili, Moni y Jime por iniciarme en el camino de la *extensión*, que me resulta tan gratificante.

A Mardi, porque juntas hacemos un gran equipo de trabajo y ha sido vital en la última fase de mi trabajo en el laboratorio.

A todos mis amigos y colegas del laboratorio que siempre me ayudaron cuando lo necesité.

A mi familia, por su paciencia, su ayuda y su apoyo incondicional.

A la Universidad Nacional del Comahue y a CONICET, por haberme brindado posibilidades concretas de seguir aprendiendo y enseñando.

A mi marido y a mi hija,

a mi mamá

y a mis abuelos Coco y Memé.

Índice de Contenidos

1. Introducción	1
1.1. Los plaguicidas, el ambiente y los anfibios	2
1.1.1 El sapo <i>Rhinella (Bufo) arenarum</i> (Hensel, 1867): características reproductivas y desarrollo embrionario	5
1.2. Plaguicidas	10
1.2.1. Insecticidas	11
1.2.1.1. Insecticidas organofosforados	13
1.2.1.1.1 Mecanismo de acción de los insecticidas organofosforados	15
1.2.1.1.2 Biotransformación de insecticidas organofosforados	18
1.2.1.1.2.1. Enzimas de Fase I	20
i. Citocromo P450	20
ii. NADPH-P450 reductasa	21
iii. Flavina monooxigenasas	22
1.2.1.1.2.2. Enzimas de Fase II	23
i. Esterasas	23
ii. Glutación S-transferasas	23
1.3. Insecticida metilazinfos	25
1.4. Poliaminas	27
1.4.1. Vía metabólica de las poliaminas	27
1.4.2. Regulación de los niveles de poliaminas	30

1.4.2.1. Regulación de la actividad y degradación de ornitina decarboxilasa por antizima	31
1.4.2.2. Regulación transcripcional y traduccional de ornitina decarboxilasa	31
1.4.3. Desregulación del metabolismo de poliaminas	36
1.4.3.1. Alteración en la síntesis de poliaminas	36
1.4.3.2. Alteración en el catabolismo de poliaminas	36
1.4.4. Procesos en los que participan las poliaminas	37
1.4.5. Ornitina decarboxilasa en anfibios	40
1.5. Sistema de defensa antioxidante	41
1.5.1. Componentes del sistema de defensa antioxidante	42
1.5.1.1. Glutación reducido	43
1.5.1.2. Enzimas antioxidantes	44
1.5.1.2.1. Enzimas dependientes de Glutación reducido	44
1.5.1.2.1.1. Glutación S-transferasa	44
1.5.1.2.1.2. Glutación peroxidasa Se-dependiente	45
1.5.1.2.1.3. Glutación reductasa	46
1.5.1.2.2. Sistema superóxido dismutasa-catalasa	46
1.5.1.2.2.1. Superóxido dismutasa	46
1.5.1.2.2.2. Catalasa	47
1.5.2. Evolución del sistema antioxidante en <i>Rhinella arenarum</i>	48

1.6. Hipótesis de trabajo	49
1.7. Objetivos	50
1.7.1. Objetivo general	50
1.7.2. Objetivos específicos	50
2. Materiales y Métodos	51
2.1. Materiales	52
2.1.1 Material biológico	52
2.1.2. Material químico	52
2.2. Métodos	52
2.2.1. Obtención de embriones	52
2.2.2. Preparación y control de soluciones estándar de metilazinfos	54
2.2.3. Exposición a metilazinfos	54
2.2.4. Toma de muestras y almacenamiento	55
2.2.5. Determinaciones bioquímicas en embriones de <i>Rhinella arenarum</i>	56
2.2.5.1. Metabolismo de poliaminas	56
2.2.5.1.1. Actividad de ornitina decarboxilasa	56
2.2.5.1.2. Actividad de diamino oxidasa	58
2.2.5.1.3. Niveles de poliaminas libres	58
2.2.5.2. Actividad de enzimas del sistema de defensa antioxidante	60

2.2.5.2.1. Glutación reductasa	60
2.2.5.2.2. Glutación S-transferasa	60
2.2.5.2.3. Glutación peroxidasa Se-dependiente	61
2.2.5.2.4. Catalasa	61
2.2.5.2.5. Superóxido dismutasa	61
2.2.5.3. Actividad de colinesterasa, blanco primario de acción de los organofosforados	62
2.2.5.4. Contenido de glutación reducido	63
2.2.5.5. Determinación de la concentración de proteínas totales	63
2.2.6. Estudios histológicos e inmunohistoquímicos	63
2.2.6.1. Preparación de muestras	63
2.2.6.2. Análisis inmunohistoquímico de ornitina decarboxilasa	64
2.2.6.3. Tinción con hematoxilina-eosina de cortes histológicos	65
2.2.7. Determinaciones moleculares	66
2.2.7.1. Extracción de proteínas nucleares	66
2.2.7.2. Análisis de la expresión de proteínas por SDS-PAGE y Western Blot	67
2.2.7.3. Puesta a punto del análisis de la expresión de las proteínas ODC y c-Fos. Anticuerpos primarios utilizados	69
2.2.7.4. Extracción de ARN	70
2.2.7.5. Verificación de la integridad del ARN extraído	71

2.2.7.6. Retrotranscripción (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar <i>odc</i>	72
2.2.8. Análisis de datos	78
3. Resultados	79
3.1. Efectos de metilazinfos a nivel de la ontogénesis de <i>Rhinella arenarum</i>	80
3.1.1. Mortalidad acumulada durante el desarrollo embrionario	80
3.1.2. Mortalidad respecto de embriones viables del estadio de BC	80
3.1.3. Malformaciones embrionarias	82
3.1.4. Histología de embriones de <i>Rhinella arenarum</i>	88
3.2. Acción de metilazinfos sobre la actividad del blanco primario colinesterasa	89
3.3. Efectos de metilazinfos sobre el metabolismo de poliaminas	90
3.3.1. Niveles de poliaminas libres	90
3.3.1.1. Putrescina	90
3.3.1.1. Espermidina	92
3.3.1.1. Espermina	92
3.3.2. Actividad de ornitina decarboxilasa	94
3.3.3. Análisis de la proporción Poliaminas/ODC	96
3.3.4. Actividad de diamino oxidasa	98
3.3.5. Niveles del factor de transcripción c-Fos como posible regulador de ODC	100

3.3.6. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de ODC en embriones de <i>Rhinella arenarum</i>	102
3.4. Efectos de metilazinfos sobre la actividad de enzimas del sistema antioxidante y sobre GSH en embriones de <i>R. arenarum</i>	103
3.4.1. Catalasa	103
3.4.2. Superóxido dismutasa	104
3.4.3. Glutación reductasa	106
3.4.4. Glutación S-transferasa	107
3.4.5. Glutación peroxidasa Se-dependiente	108
3.4.6. Nivel de glutación reducido	109
3.5. Efectos bioquímicos generales de metilazinfos: Niveles de Proteínas Totales	110
3.6. Análisis de correlación entre aparición de malformaciones, niveles de poliaminas y respuesta del sistema antioxidante	111
4. Discusión	119
4.1. Metabolismo de poliaminas en embriones de <i>Rhinella arenarum</i>	120
4.2. Efectos del plaguicida metilazinfos sobre el metabolismo de poliaminas en embriones de <i>Rhinella arenarum</i>	122
4.3. Respuesta del sistema de defensa antioxidante de embriones de <i>Rhinella arenarum</i> expuestos a metilazinfos	125
4.4. Malformaciones en embriones expuestos a metilazinfos; relación con la actividad colinesterasa, el sistema de defensa antioxidante y el metabolismo de poliaminas	129
4.5. La expresión de protooncogenes y el metabolismo de poliaminas	132

4.6. Análisis integrado de los efectos observados en embriones de <i>Rhinella arenarum</i> por exposición a metilazinfos	135
5. Conclusiones	141
6. Perspectivas Futuras	144
7. Bibliografía	147
8. Trabajos de respaldo	167

Índice de Figuras

Figura 1: Aplicación foliar de plaguicidas en montes frutales del Alto Valle de Río Negro y Neuquén con máquina pulverizadora.	3
Figura 2: Principios activos más utilizados en el Valle de Río Negro y Neuquén, en el año 2004.	5
Figura 3: Fotografías secuenciales de la evolución de las contracciones abdominales de una hembra de <i>R. arenarum</i> previo a la ovoposición.	7
Figura 4: Estructura general de los insecticidas OF.	13
Figura 5: Proceso de activación por desulfuración oxidativa de un insecticida fosforotioato.	14
Figura 6: Mecanismo de hidrólisis de ACh por la enzima AChE.	16
Figura 7: Reacción de la enzima AChE con el OF metilparaoxón.	18
Figura 8: Reacción del insecticida MA con GSH, catalizada por GST.	25
Figura 9: Estructura química del insecticida metilazinfos.	25
Figura 10: Vía metabólica de las poliaminas.	29

Figura 11: Papel desempeñado por antizima y ornitina decarboxilasa en el metabolismo de poliaminas.	32
Figura 12: Papel desempeñado por c-Myc en la transcripción de odc.	33
Figura 13: Relación entre el metabolismo de poliaminas y la expresión de factores de transcripción.	35
Figura 14: Potenciales daños que podrían resultar de la oxidación de poliaminas.	37
Figura 15: Estructura del tripéptido glutatión reducido (GSH).	43
Figura 16: Ovocitos y embriones de <i>Rhinella arenarum</i>.	53
Figura 17: Exposición de embriones de <i>Rhinella arenarum</i> a MA.	55
Figura 18: Fotografía representativa de una membrana de nitrocelulosa teñida con rojo Ponceau S.	70
Figura 19: Fotografía representativa de un gel de integridad de ARN no desnaturizante.	72
Figura 20: Porcentaje de embriones malformados de <i>Rhinella arenarum</i> expuestos a 0 mg/L, 0,5 mg/L, 2 mg/L y 9 mg/L MA desde su fertilización hasta el estadio de OC.	83
Figura 21: Fotografías de embriones de <i>Rhinella arenarum</i> en estadio de brote caudal (16X).	85

Figura 22: Fotografías de embriones de <i>Rhinella arenarum</i> en estadio de boca abierta (4X).	86
Figura 23: Fotografías de embriones de <i>Rhinella arenarum</i> en estadio de opérculo completo (4X).	87
Figura 24: Tinción de hematoxilina–eosina de cortes en el plano frontal de embriones de <i>Rhinella arenarum</i> en estadio de OC.	89
Figura 25: Actividad de ChE en embriones de <i>Rhinella arenarum</i> expuestos a 0 mg/L, 0,5 mg/L, 2 mg/L y 9 mg/L MA desde su fertilización hasta el estadio de OC.	90
Figura 26: Niveles de Put en embriones de <i>Rhinella arenarum</i> expuestos a 0 mg/L, 0,5 mg/L, 2 mg/L y 9 mg/L MA desde su fertilización hasta el estadio de OC.	91
Figura 27: Niveles de Spd en embriones de <i>Rhinella arenarum</i> expuestos a 0 mg/L, 0,5 mg/L, 2 mg/L y 9 mg/L MA desde su fertilización hasta el estadio de OC.	93
Figura 28: Niveles de Spm en embriones de <i>Rhinella arenarum</i> expuestos a 0 mg/L, 0,5 mg/L, 2 mg/L y 9 mg/L MA desde su fertilización hasta el estadio de OC.	94
Figura 29: Actividad de ODC en embriones de <i>Rhinella arenarum</i> expuestos a 0 mg/L, 0,5 mg/L, 2 mg/L y 9 mg/L MA desde su fertilización hasta el estadio de OC.	95
Figura 30: Efecto del plaguicida metilazinfos sobre la proporción poliaminas/ODC en embriones de <i>Rhinella arenarum</i> expuestos a 0 mg/L, 0,5 mg/L, 2 mg/L y 9 mg/L MA desde su fertilización hasta el estadio de OC.	97

Figura 31: Efecto del plaguicida metilazinfos sobre la proporción poliaminas/ODC respecto del estadio de brote caudal en embriones de <i>Rhinella arenarum</i> expuestos a 0 mg/L, 0,5 mg/L, 2 mg/L y 9 mg/L MA desde su fertilización hasta el estadio de OC.	98
Figura 32: Actividad de DAO en embriones de <i>Rhinella arenarum</i> expuestos a 0 mg/L, 0,5 mg/L, 2 mg/L y 9 mg/L MA desde su fertilización hasta el estadio de OC.	99
Figura 33: Análisis por Western blot del factor de transcripción c-Fos.	102
Figura 34: Detalle de las glándulas cementales de embriones de <i>Rhinella arenarum</i> en estadio de OC.	103
Figura 35: Actividad de CAT, expresada como porcentaje de la actividad control.	104
Figura 36: Actividad de SOD, expresada como porcentaje de la actividad control.	105
Figura 37: Actividad de GR en embriones de <i>Rhinella arenarum</i> expuestos a 0 mg/L, 0,5 mg/L, 2 mg/L y 9 mg/L MA desde su fertilización hasta el estadio de OC.	106
Figura 38: Actividad de GST en embriones de <i>Rhinella arenarum</i> expuestos a 0 mg/L, 0,5 mg/L, 2 mg/L y 9 mg/L MA desde su fertilización hasta el estadio de OC.	107
Figura 39: Actividad de SeGPx en embriones de <i>Rhinella arenarum</i> expuestos a 0 mg/L, 0,5 mg/L, 2 mg/L y 9 mg/L MA desde su fertilización hasta el estadio de OC.	108
Figura 40: Niveles de GSH en embriones de <i>Rhinella arenarum</i> expuestos a 0 mg/L, 0,5 mg/L, 2 mg/L y 9 mg/L MA desde su fertilización hasta el estadio de OC.	109

Figura 41: Niveles de proteínas totales en embriones de <i>Rhinella arenarum</i> expuestos a 0 mg/L, 0,5 mg/L, 2 mg/L y 9 mg/L MA desde su fertilización hasta el estadio de OC.	111
Figura 42: Análisis de componentes principales en la contribución a la variabilidad de la respuesta.	113
Figura 43: Efecto del tercer componente en la explicación de la variabilidad en el análisis de componentes principales.	114
Figura 44: Proyección de estadios embrionarios y tratamientos sobre el plano de los componentes principales de variación.	117
Figura 45: Proyección de estadios embrionarios y tratamientos sobre el espacio 3D de los componentes principales de variación.	118
Figura 46: Resumen de los efectos observados en embriones de <i>Rhinella arenarum</i> expuestos a MA.	138

Índice de Tablas

Tabla 1: Clasificación de plaguicidas de acuerdo a la plaga que controlan.	12
Tabla 2: Reactivos de la mezcla de reacción para la retrotranscripción.	73
Tabla 3: Reactivos de la mezcla de reacción para la PCR.	74
Tabla 4: Secuencias de los cebadores utilizados en las reacciones de PCR y longitud teórica del producto amplificado en pares de bases.	75
Tabla 5: Mortalidad acumulada en embriones de <i>Rhinella arenarum</i> durante su desarrollo.	81
Tabla 6: Mortalidad acumulada de embriones de <i>Rhinella arenarum</i> en estadio de BA y OC respecto a embriones viables en estadio de BC.	82
Tabla 7: Coeficientes de Correlación entre las variables de respuesta al tratamiento con MA a lo largo del desarrollo embrionario de <i>Rhinella arenarum</i>.	116

Abreviaturas

ACh	acetilcolina
AChE	acetilcolinesterasa
ACP	análisis de componentes principales
APAO	acetilpoliamino oxidasa
AZ	antizima
BA	boca abierta
BC	brote caudal
CAT	catalasa
ChE	colinesterasa
DAO	diamino oxidasa
DFMO	difluorometilornitina
DL50	dosis letal 50
ERK	quinasa regulada por señales extracelulares
EROs	especies reactivas de oxígeno
FAD	flavina adenina dinucleótido
FMN	flavina adenina mononucleótido
FMO	flavina monooxigenasas microsomales
GR	glutación reductasa
GSH	glutación reducido
GST	glutación S-transferasa
MA	metilazinfos
OC	opérculo completo
ODC	ornitina decarboxilasa
OF	organofosforado
Put	putrescina
RED	NADPH-P450 reductasa
RT-PCR	retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa

SAMDC	S-adenosilmetionina decarboxilasa
SeGPx	glutación peroxidasa Se-dependiente
SMO	espermina oxidasa
SOD	superóxido dismutasa
Spd	espermidina
Spm	espermina
SSAT	espermidina/espermina N ¹ -acetiltransferasa

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Los plaguicidas, el ambiente y los anfibios

Los plaguicidas son compuestos biológicamente activos destinados principalmente a la eliminación de las poblaciones de plagas, pero su falta de selectividad y determinadas propiedades fisicoquímicas como la persistencia hacen que lo que es una ventaja desde el punto de vista de la efectividad se convierta, finalmente, en la causa de su prohibición (Ecobichon, 1982; Primo Yufera, 1991).

La principal fuente de contaminación del ambiente por plaguicidas es el residuo que resulta de la aplicación de estos químicos para el control de las plagas agrícolas. Después de la aplicación terrestre o aérea de un insecticida, por escurrimiento, percolación o por corrientes de aire, éstos y sus metabolitos son inevitablemente detectados en suelo y agua, siendo absorbidos por constituyentes bióticos y abióticos y transportados a otros lugares donde toman contacto con el hombre, los animales domésticos y la fauna silvestre. Muchas especies son afectadas a su vez por absorción o acumulación de plaguicidas a través de la cadena alimentaria (Figura 1) (Ecobichon, 1982; Matsumura, 1985; Hill, 1991).

Las poblaciones de anfibios se encuentran en descenso por diversas razones, algunas derivadas de la actividad antrópica y otras relacionadas al cambio climático. Según Stuart et al. (2004), más del 30% de las especies de anfibios están calificadas como vulnerables, en peligro o en peligro crítico. En muchos casos las razones se desconocen, aunque se pueden citar la destrucción de hábitat, la contaminación química, la lluvia ácida y las infecciones microbianas (Wake, 1991; Houlihan et al., 2000; Pounds, 2001; Lötters et al., 2009; Becker et al., 2010; Crawford et al., 2010; Pilliod et al., 2010). En algunas ocasiones la contaminación ambiental ha sido implicada en el descenso del número de anfibios (Fellers et al., 2004) a pesar de que aún se desconoce el grado en el cual la misma puede ocasionar descensos a nivel poblacional.



Figura 1: Aplicación foliar de plaguicidas en montes frutales del Alto Valle de Río Negro y Neuquén con máquina pulverizadora (Foto gentileza de INTA Alto Valle).

Los anfibios son particularmente sensibles a la contaminación química debido en parte al delicado equilibrio de sus hábitats y a su susceptibilidad al estrés durante la metamorfosis. Además, es posible encontrar anfibios en hábitats muy diferentes, tales como el desierto y el bosque, en climas variados y a diferentes alturas. Ya que los anfibios pasan sus primeros estadios de vida en ambientes acuáticos y su vida adulta en el terrestre, se encuentran expuestos a una gran variedad de contaminantes. Además, si se tienen en cuenta sus hábitos alimentarios, el hecho de que procesan continuamente agua por sus branquias y su particular sensibilidad a xenobióticos durante su vida acuática, es posible considerarlos como buenos bioindicadores de las condiciones generales del ambiente (Dumpert and Zeitz 1984; Lefcort et al., 1998).

Numerosos artículos alertan sobre la incidencia de malformaciones, disminución en el éxito de la fertilización y

alteraciones en el ciclo de vida del sapo común *Rhinella (Bufo) arenarum*, Hensel (de Llamas et al., 1985, Rosenbaum et al., 1988; Caballero de Castro et al., 1991; Gauna et al., 1991; Venturino et al., 1992; Fonovich de Schroeder y Pechén de D'Angelo, 1995; Anguiano et al., 1994; 2001). El sapo común *R. arenarum* es un organismo autóctono que habita los cuerpos de agua de la zona productiva del Alto Valle de Río Negro y Neuquén. Su época de reproducción coincide con los meses de mayor aplicación de plaguicidas, lo que sugiere un impacto negativo sobre la supervivencia de esta especie. Por lo tanto, sus estadios embrionarios, de vida acuática, podrían encontrarse expuestos a plaguicidas que alterarían la normal progresión de su desarrollo.

La zona del Alto Valle de Río Negro y Neuquén es la principal zona productora de peras y manzanas de Argentina, y las labores culturales llevadas a cabo para mantener la importante actividad productiva traen aparejada la utilización de plaguicidas, principalmente insecticidas, fungicidas y herbicidas (Anguiano y Pechen de D'Angelo, 2007) (Figura 2).

Los sapos, las ranas, las salamandras acuáticas y las salamandras son anfibios que han existido sobre la Tierra desde hace 368 millones de años. No obstante, hay preocupación porque muchas poblaciones de estos animales están desapareciendo completamente o su número está disminuyendo (Shirose et al., 1996). Los anfibios, con su piel húmeda y sensible, sus huevos desprotegidos y el estilo de vida semiacuática, son considerados buenos indicadores biológicos de la salud del medio (Netting, 2000).

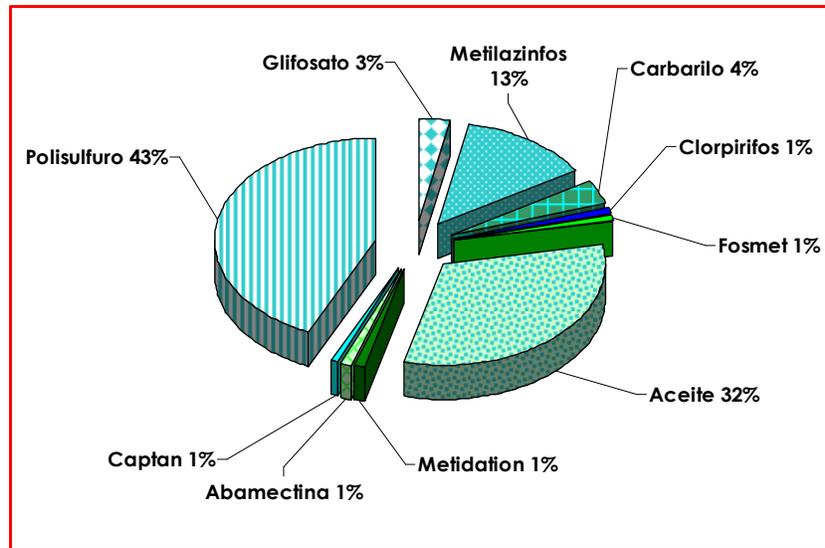


Figura 2: Principios activos más utilizados en el Valle de Río Negro y Neuquén, en el año 2004. Insecticidas: metilazinfos, carbaril, clorpirifós, fosmet, metidación, abamectina. Herbicidas: glifosato. Fungicidas: captán, polisulfuro de calcio (Extraído de Anguiano y Pechen de D'Ángelo, 2007).

1.1.1. El sapo *Rhinella (Bufo) arenarum* (Hensel, 1867): características reproductivas y desarrollo embrionario

La especie *Rhinella arenarum* Hensel se encuentra ampliamente distribuida en todo el territorio sudamericano (Devillers y Exbrayat, 1992), en el país (Valdéz Toledo y Pisanó, 1980) y en la región del Comahue.

Su ciclo de vida abarca dos etapas fundamentales antes de alcanzar el estado adulto: la embrionaria y la larval. Los sapos abandonan la etapa larval mediante un complejo proceso de metamorfosis.

El dimorfismo sexual en los ejemplares adultos se reconoce fácilmente dado que los machos son de menor tamaño, presentan una coloración verde-azulada a la altura del saco vocal, una formación particular en el pulgar de coloración negra o parda llamado "callo

nupcial”, que favorece el abrazo durante el acto sexual, y porque además croan. El callo nupcial posee terminaciones nerviosas que permiten captar las vibraciones latero-abdominales que tanto la hembra como el macho presentan durante el apareamiento (Pisanó y Rengel, 1982).

La hembra realiza la deposición de los huevos (ovocitos) en el agua mientras que el macho los fertiliza abrazado a la hembra mientras nadan, por lo que tanto la fecundación como el desarrollo embrionario son externos. En cada ovoposición pueden contarse de 30000 a 40000 ovocitos que se disponen en forma espiralada en el interior de una sustancia gelatinosa denominada “ganga”. Los ovocitos contienen materiales de reserva (plaquetas vitelinas, gotas de lípidos neutros, gránulos de glucógeno) que han sido almacenados durante la ovogénesis y que permiten sostener el desarrollo embrionario sin necesidad de nutrientes externos (Cantore et al., 1977). Tanto la fertilización como el desarrollo embrionario externos en *R. arenarum* facilitan, desde un punto de vista experimental, su seguimiento y la evaluación de su alteración por diversos factores. Por otra parte, dichas características determinan que los embriones sean blancos accesibles para sustancias contaminantes.

Por todo lo expuesto anteriormente, la fertilización *in vitro* es un proceso fácil de realizar con *R. arenarum* (Véase Sección 2.2.1.) y las condiciones son fácilmente controlables. Una vez que la hembra ha sido estimulada y está lista para la ovoposición, es posible observar una serie de contracciones abdominales cuando los ovocitos son impulsados a través del ovisaco materno (Figura 3).

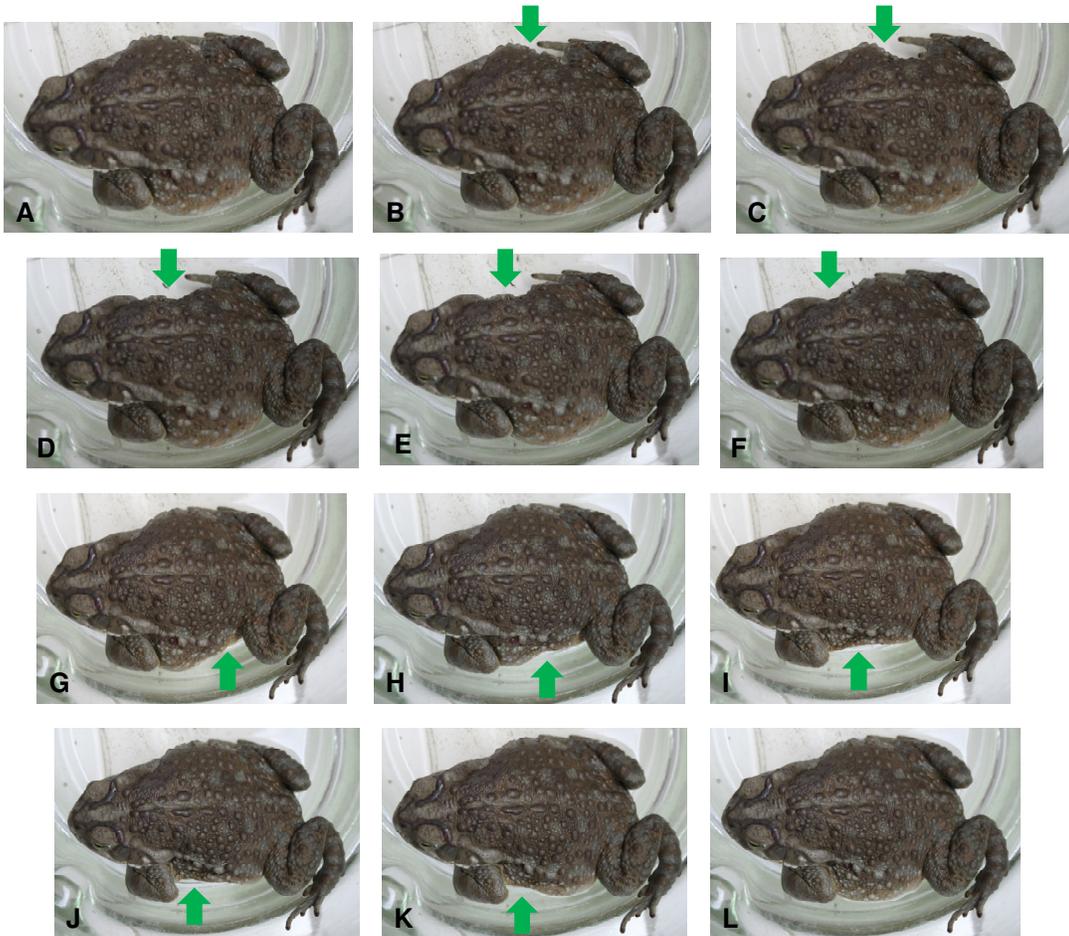


Figura 3: Fotografías secuenciales de la evolución de las contracciones abdominales de una hembra de *R. arenarum* previo a la ovoposición. Las flechas verdes indican la zona donde se visualiza la contracción abdominal.

Los distintos estadios embrionarios que atraviesan los anfibios anuros han sido descritos para diversas especies y comprenden un total de 25 estadios hasta alcanzar la etapa larval. En particular, la serie de referencia de los estadios embrionarios de *Rhinella (Bufo) arenarum* (Hensel, 1867) ha sido descrita por Del Conte y Sirlin (1952).

El primer estadio corresponde a la fertilización del ovocito, que conlleva la rotación del embrión y deja el polo animal hacia arriba. En el segundo estadio se produce la expulsión del segundo glóbulo polar y aparece la media luna gris en el córtex ovular. La media luna gris es

poco visible en *R. arenarum* debido a la coloración oscura propia de los embriones y es la zona donde aparecerá posteriormente el labio dorsal del blastoporo durante la gastrulación.

Los estadios 3 a 9 corresponden a la fase de segmentación hasta la formación de la blástula tardía, con blastómeros cada vez más pequeños y predominio del polo animal sobre el vegetal. En el estadio 10 se inicia la gastrulación y es evidente el labio dorsal del blastoporo; la gastrulación se completa con la invaginación gradual del tapón vitelino (constituido por células del polo vegetal) en los dos estadios siguientes.

La fase de neurulación abarca los estadios 13 a 16 y comienza con la aparición de la placa neural en la región dorsal del embrión. Luego se observa la elongación antero-posterior del embrión y la formación del surco neural. El estadio 15, conocido como rotación debido al movimiento del embrión dentro de la membrana vitelina, presenta un acercamiento paulatino de los pliegues neurales hasta que se contactan. Finalmente, se completa el cierre del tubo neural y el embrión comienza a desarrollar en forma distinguible la cabeza.

Los estadios 17 al 20 se diferencian en base al desarrollo de la aleta caudal y las branquias externas. El estadio 17 es el de *brote caudal* (BC; 3 días post-fertilización). Dichos embriones poseen 4 mm de longitud y es fácil separarlos de su envoltura gelatinosa en el laboratorio. El cuerpo es ovalado y en la porción más caudal se encuentra un esbozo de la futura aleta caudal. La glándula adhesiva comienza a ser visible en este estadio. Los embriones utilizan secreciones pegajosas provenientes de esta glándula transitoria con fines de estabilización, ya que aún no han desarrollado el disco oral ni la aleta caudal que les permitirán una mayor locomoción y adhesión cuando sean nadadores activos. El estadio 18 es reconocido por los movimientos musculares espasmódicos de los embriones que les permiten eclosionar desde sus envolturas gelatinosas. Además, su aleta caudal se encuentra bien definida y los botones branquiales muestran

un aspecto acanalado. El estadio 19 se reconoce por la aparición del latido cardíaco, mientras que en el estadio 20 es posible visualizar la corriente sanguínea en los filamentos branquiales.

Los estadios siguientes abarcan la transición hacia la larva, con capacidad de ingerir alimentos y nadar libremente. En el estadio 21 los ojos se distinguen bien y se produce la apertura de la boca, por lo que el estadio se denomina *boca abierta* (BA; 7 días post-fertilización). Esta característica determina que los embriones en BA, de 7 mm de longitud, estén en condiciones de alimentarse. En el estadio 22 los bordes de la aleta caudal se vuelven transparentes y es posible observar la circulación sanguínea en ella.

Los estadios 23 a 25 marcan el desarrollo de los opérculos y la desaparición de las branquias externas. En el estadio 24 se ha cerrado el opérculo del lado derecho. El estadio 25, denominado *opérculo completo* (OC; 10 días post-fertilización) se caracteriza por la completa reabsorción de las branquias externas. Los embriones control en OC tienen una longitud de 10 mm y la porción anterior del embrión es redondeada y se encuentra bien diferenciada respecto de la porción posterior constituida por la aleta caudal.

La reproducción fisiológica de la especie se lleva a cabo una sola vez al año, en primavera. En la región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén el apareamiento ocurre durante los meses de septiembre, octubre y noviembre en lugares de remanso de las costas de los ríos y en canales de riego, coincidiendo con el período de mayor aplicación de plaguicidas (INTA, 1993) y en sitios en los cuales se ha detectado la presencia de diversos compuestos (Loewy et al., 2011). Esto implica que tanto el desarrollo embrionario como el larval podrían estar expuestos, al menos transitoriamente, a concentraciones elevadas de estos tóxicos. Esta situación constituye un peligro potencial para la especie, que justifica la inclusión de la misma en protocolos de evaluación de riesgo.

El desarrollo embrionario de los anfibios representa el arquetipo del desarrollo de los vertebrados. El gran tamaño de los ovocitos de

sapos y ranas (1-2 mm), la fecundación y el desarrollo embrionario externos que facilitan el estudio experimental en cualquier estadio, el gran número de individuos obtenidos simultáneamente en cada ovulación, la posibilidad de inducir hormonalmente a las hembras y realizar fertilizaciones y desarrollos embrionarios *in vitro* sin necesidad de agregar nutrientes, la transparencia de la ganga que facilita la observación, la posibilidad de su remoción química o quirúrgica y la factibilidad de realizar microcirugías y microinyecciones en los embriones, transforman al desarrollo embrionario de sapos y ranas en un sistema experimental único para estudios embriológicos básicos y toxicológicos (Brackett, 1978; Slack y Forman, 1980; Barbieri, 1982; Pisanó y Rengel, 1982; Müller, 1997).

1.2. Plaguicidas

Los productos químicos agrícolas denominados plaguicidas son el grupo más grande de sustancias tóxicas diseminadas intencionalmente en el ambiente. De acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2003), el término *plaguicida* abarca a una sustancia o mezcla de sustancias destinada a prevenir, destruir, repeler o mitigar alguna plaga, incluyendo a transmisores de enfermedades en humanos y animales, a plantas no deseadas o animales que causen daño durante o interfieran con la producción, procesamiento, almacenaje, transporte o comercio de alimentos. El término incluye también a sustancias con otros tipos de acción como reguladores del crecimiento, defoliantes, desecantes, atrayentes, esterilizantes, repelentes, así como a otros compuestos utilizados para prevenir el deterioro durante el almacenamiento y transporte de los productos derivados de actividades agrícolas o de la silvicultura.

A su vez entendemos por plaga a cualquier organismo que interfiera con la conveniencia o bienestar del hombre u otra especie de su interés. La utilización de plaguicidas resulta necesaria para proveer a la población mundial en expansión con suficientes alimentos de calidad

nutricional. Además, permite a los agricultores aumentar sus ganancias al reducir el trabajo manual, aumentar la producción y disminuir sus pérdidas. Sin embargo, a pesar de la utilización de plaguicidas, se calcula que un tercio de la producción de alimentos se pierde a causa del ataque por plagas, siendo los insectos responsables de más de la mitad de dichas pérdidas.

Sólo un pequeño porcentaje de los productos aplicados para el control de plagas alcanza a los organismos que pretende controlar; el resto de los productos se dispersan en el ambiente y representan un riesgo para los ecosistemas y los organismos no-blanco a los cuales no estaban dirigidos. De esta manera pueden producirse efectos indeseables e incluso irreparables en el ambiente.

Existen diversos criterios a la hora de clasificar los plaguicidas. La más común toma como criterio de clasificación la plaga a la cual el compuesto controla (Tabla 1).

1.2.1. Insecticidas

Los insecticidas son un grupo particular de plaguicidas que se han desarrollado con el objetivo de controlar insectos. Son ampliamente empleados en agricultura y en el control de plagas domésticas. Otro uso sumamente importante es en salud pública para el control de vectores de enfermedades como malaria, oncocercosis, chagas, etc.

La mayoría de los insecticidas ejercen su acción tóxica afectando el sistema nervioso de las especies blanco. Es justamente debido a su acción neurotóxica y al alto grado de conservación del sistema nervioso, que se ven afectados otros animales “no blanco”, tanto invertebrados como vertebrados.

Tabla 1: Clasificación de plaguicidas de acuerdo a la plaga que controlan.

Plaguicida	Organismo blanco	Principal Modo de Acción	Ejemplos
Insecticidas	Insectos	Acción neurotóxica	Organofosforados Carbamatos Piretroides Organoclorados
		Reguladores del crecimiento (inhibición de síntesis de quitina; mímicos de hormona juvenil; mímicos de ecdisona)	Juvenoides Diacilhidrazinas Triazinas Benzoilfenilureas Tiadiazinas
		Confusión sexual	Feromonas
Fungicidas	Hongos	Desacoplantes.	Carboxamidas Estrobilurinas
		Inespecíficos	Ftalimidas
		Interferencia con la división celular	Benzimidazoles
Herbicidas	Vegetales	Interferencia con la síntesis de esteroides	Piperazinas Imidazoles Triazoles
		Inhibidores de la fotosíntesis	Sales de bipyridilos Tiazinas
		Inhibidores de la síntesis aminoácidos	Fosfonoaminoácidos
Rodenticidas	Roedores	Mimetizantes de la acción de hormonas vegetales	Derivados del ácido benzoico Clorofenoxiácidos
		Anticoagulantes. Productores de edema pulmonar masivo. Interferencia en el metabolismo.	Superwarfarínicos Tioureas Derivados del ácido fluoroacético

1.2.1.1. Insecticidas organofosforados

La principal plaga que ha afectado la producción frutícola en la región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén en las últimas décadas ha sido la carpocapsa, *Cydia pomonella*. Su control ha demandado el uso de diversas clases de plaguicidas y se han llegado a aplicar aproximadamente 900 toneladas de plaguicidas por año. De estas 900 toneladas, un 70% ha estado representado por el insecticida organofosforado (OF) metilazinfos (MA) (Anguiano y Pechen de D'Angelo, 2007). En los últimos años, sin embargo, la utilización de plaguicidas organofosforados se ha visto reducida drásticamente en un 40% debido a la implementación de un plan de manejo Integrado de Plagas en Grandes Bloques. Dicho plan se basa en la utilización de la técnica de confusión sexual para reducir la población de carpocapsa y mantenerla por debajo de niveles aceptables (SENASA-FUNBAPA, 2010).

Los insecticidas OF derivan del ácido fosfórico y poseen un átomo de fósforo unido mediante un doble enlace a un átomo de azufre o de oxígeno. Además, dos cadenas alquílicas R_1 y R_2 , que pueden ser grupos metilo, etilo o isopropilo, están unidas a través de un átomo de oxígeno al átomo central de fósforo. El enlace remanente del fósforo pentavalente se establece con el llamado grupo saliente (X), que varía ampliamente entre los diferentes compuestos (Costa, 1997) y es el enlace más susceptible a la hidrólisis. La estructura general de los insecticidas OF se muestra en la Figura 4.

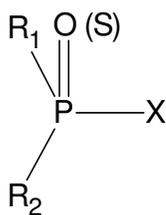


Figura 4: Estructura general de los insecticidas OF. R_1 y R_2 : sustituyentes alquilo; X: grupo saliente.

Basados en las diferencias químicas que presentan, los OF pueden ser divididos en seis subclases, fácilmente identificadas por sus nombres químicos, e incluyen a los fosfatos, fosforotioatos, fosforoditioatos, fosforamidatos, fosfonatos y fosforotiolatos.

En general, los OF son sustancias poco solubles en agua y muy solubles en disolventes orgánicos, principalmente en los solventes aromáticos (benceno, xileno) y algo menos en los alifáticos (hexano, pentano); por lo tanto, son compuestos liposolubles.

Además de los gases nerviosos, sólo unos pocos compuestos OF son de la forma oxón P=O (por ejemplo: diclorvos). La mayoría, denominados fosforotioatos porque presentan el enlace P=S, necesitan ser activados a su correspondiente análogo oxigenado. La activación ocurre a través de un proceso de desulfuración oxidativa mediado por el sistema enzimático de las oxidasas de función mixta (OFM) (Figura 5) (Costa, 1997; Hyne y Maher, 2003). Los OF del tipo fosforotioatos (P=S) poseen mínima o nula actividad anticolinesterásica. Por otra parte, la detoxificación metabólica de los OF se realiza principalmente por el clivaje de alguno de los grupos unidos al átomo de fósforo. Esto usualmente da lugar a una molécula cargada negativamente, que es menos activa como agente anticolinesterásico y al mismo tiempo más hidrosoluble y por lo tanto fácilmente eliminada del organismo (Jokanović, 2001).

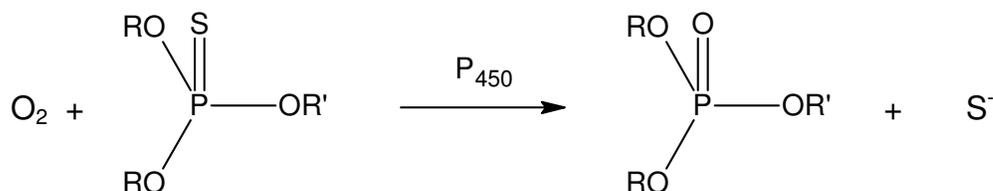


Figura 5: Proceso de activación por desulfuración oxidativa de un insecticida fosforotioato.

1.2.1.1.1 Mecanismo de acción de los insecticidas organofosforados

El blanco primario de acción de los insecticidas OF lo constituye la enzima acetilcolinesterasa (AChE). La enzima AChE es una esterasa de tipo B que hidroliza preferentemente ésteres de colina como acetilcolina (ACh). La enzima AChE se encuentra principalmente en el sistema nervioso central y periférico, en las uniones neuromusculares y en el sistema hematopoyético de vertebrados. Desempeña un papel muy importante en la neurotransmisión colinérgica al hidrolizar el neurotransmisor ACh liberando ácido acético y colina (Corbett, 1974; Fukuto, 1990).

La hidrólisis de ACh comienza cuando dicha molécula se aproxima al sitio activo de la AChE por atracción electrostática entre el átomo de nitrógeno cargado positivamente de ACh y la carga negativa del sitio aniónico de la enzima. La acetilación del -OH del residuo serina del sitio activo de la enzima es favorecida por el residuo básico B (histidina) y el residuo ácido AH (-OH de tirosina) presentes en AChE. La deacetilación del residuo serina de su sitio activo ocurre rápidamente por hidrólisis, regenerando la enzima libre en milisegundos (Figura 6).

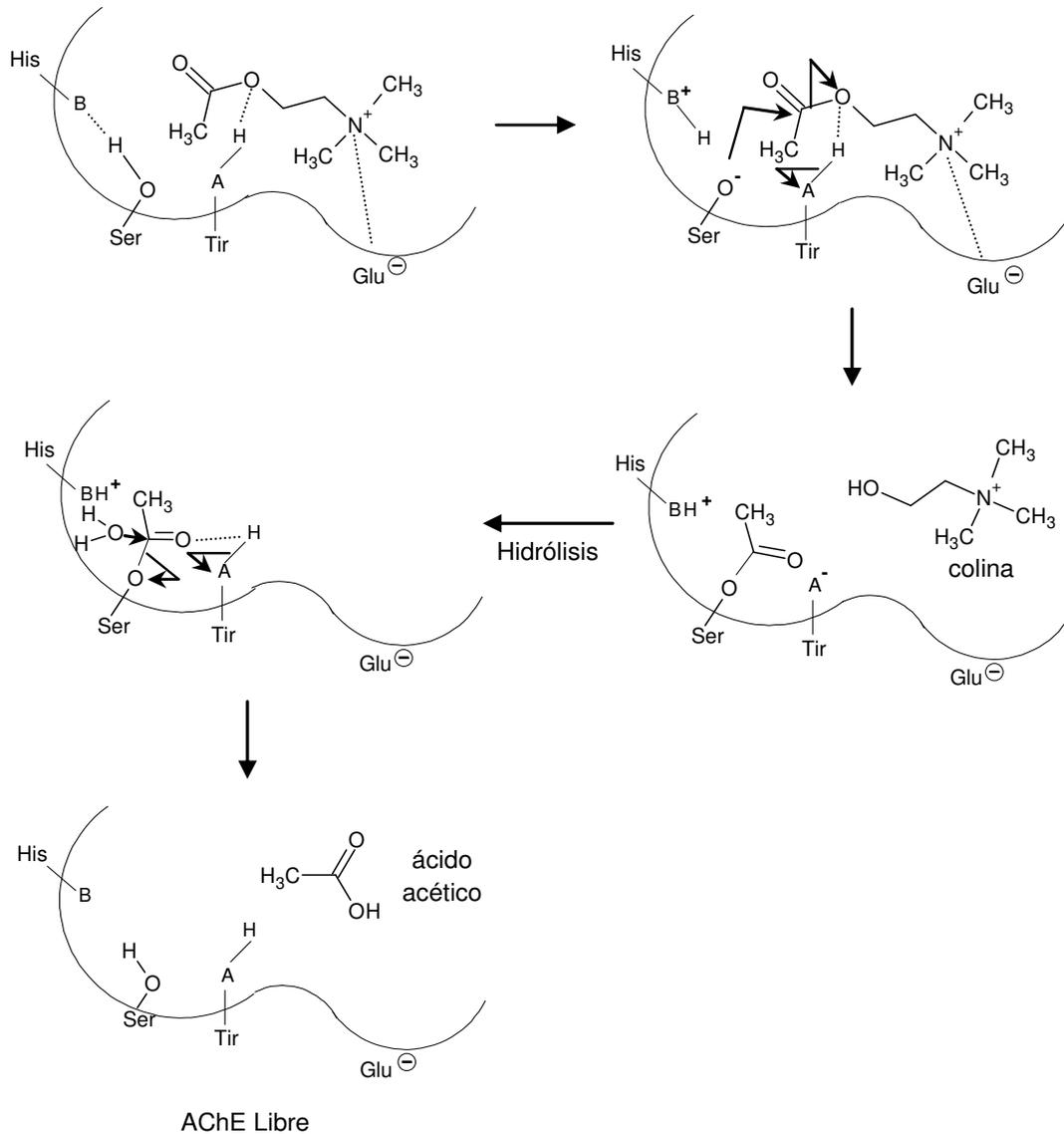


Figura 6: Mecanismo de hidrólisis de ACh por la enzima AChE (extraído y modificado de Fukuto, 1990).

Los compuestos OF ejercen su acción tóxica al inhibir a la enzima AChE, lo que conduce a una acumulación del neurotransmisor ACh en las sinapsis y uniones neuromusculares (Matsumura, 1985). Niveles elevados de ACh provocan la sobreestimulación de los receptores colinérgicos de las células postsinápticas y alteran las vías de señalización mediadas por estos receptores (Pope y Liu, 1997; Mileson et

al., 1998; Pope, 1999; Pope et al., 2005). La inhibición de AChE por insecticidas OF es análoga al proceso de hidrólisis de su sustrato natural ACh. La inhibición de la enzima AChE por un compuesto OF tiene lugar a través de una reacción química en la cual el hidroxilo de un residuo de serina en el sitio activo de la enzima es fosforilado y se libera el grupo saliente X del OF. En contraste con la enzima acetilada, la cual es rápidamente hidrolizada para dar ácido acético y la enzima libre, la enzima fosforilada es altamente estable y en algunos casos, dependiendo de los grupos unidos al átomo de fósforo, es inactivada irreversiblemente (Fukuto, 1990). En general, el complejo AChE-OF de los OF sustituidos dimetoxilados (por ejemplo, MA y malatión) se desfosforilan espontáneamente más rápido que los dietoxilados (por ejemplo, paratión) o los diisopropoxilados (por ejemplo, DFP, diisopropilfosforil fluoruro). Este orden de reactividad puede deberse a que los grupos metilos tienen menos impedimentos estéricos y más electronegatividad que los grupos etilos o isopropilos, haciendo al átomo de fósforo más electropositivo y al OF más susceptible a la hidrólisis (Wilson et al., 1992). Estudios de recuperación de la actividad de la enzima AChE inducida químicamente después del tratamiento con organofosforados mostraron una pérdida progresiva en la habilidad del complejo AChE-OF a reactivarse. Esta disminución en la capacidad de reactivación, llamada *envejecimiento*, resulta de la pérdida de un segundo grupo, usualmente un grupo alquilo (R) desde el átomo de fósforo. Este hecho estabiliza el complejo AChE-OF y previene tanto la reactivación espontánea de AChE como la química (Figura 7) (Eto, 1974; Costa, 1997). Por lo tanto, los compuestos que envejecen rápidamente son particularmente tóxicos, ya que para la recuperación de la actividad enzimática es necesario esperar que ocurra la síntesis de nueva enzima. Este es el caso de algunos OF utilizados como agentes de guerra, tales como sarín, somán o tabún para los cuales el envejecimiento ocurre en minutos (Costa, 1997).

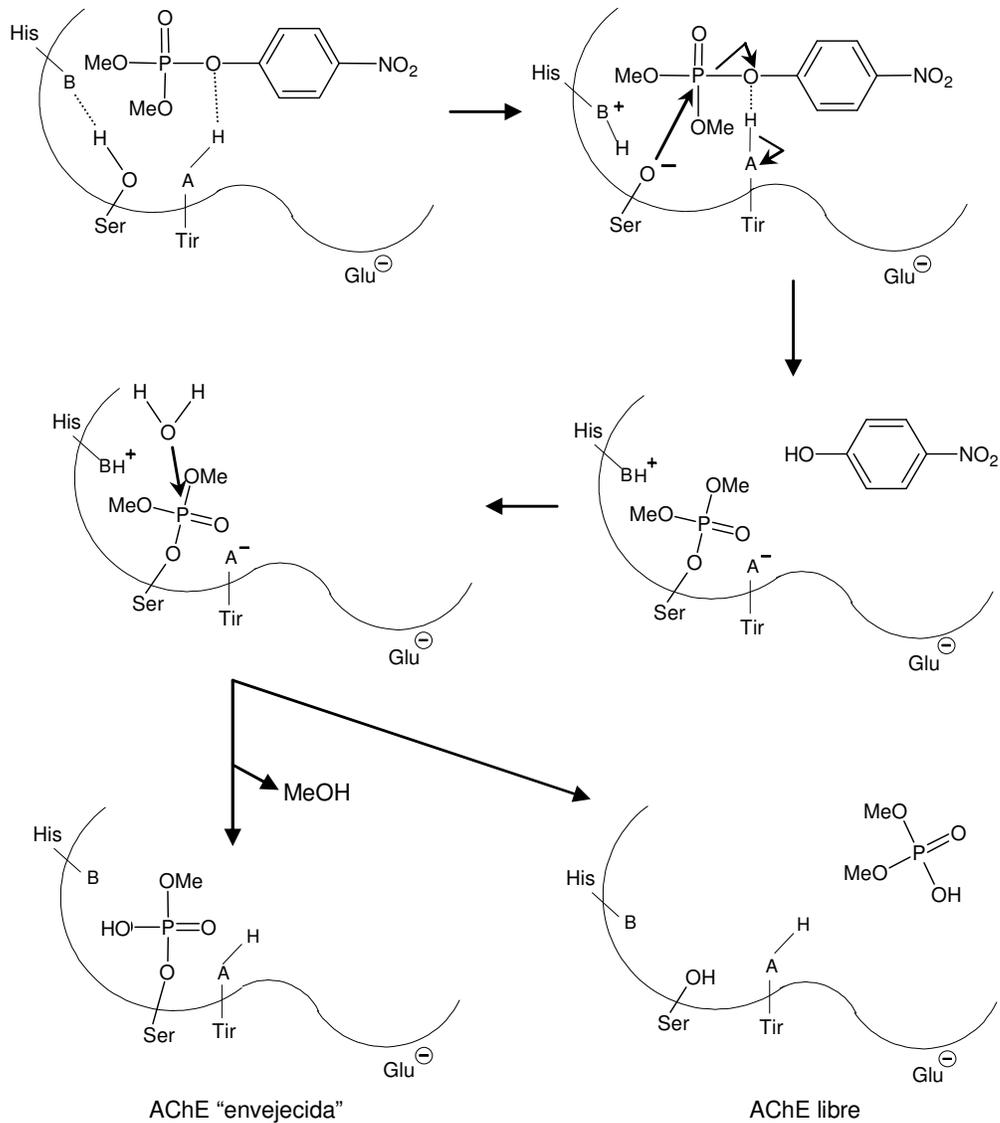


Figura 7: Reacción de la enzima AChE con el OF metilparaoxón. La defosforilación de AChE es un proceso muy lento. (Extraído y modificado de Fukuto, 1990).

1.2.1.1.2 Biotransformación de insecticidas organofosforados

Luego de su absorción por el organismo, el plaguicida OF sufre una serie de reacciones de biotransformación. Dado que los OF son compuestos principalmente lipofílicos, lo que hace más fácil su penetración a través de la cutícula del insecto, las reacciones de biotransformación conducen

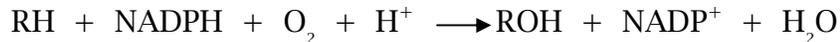
a la formación de compuestos conjugados más polares. Como se ha mencionado previamente, la mayoría de los OF en su condición de compuestos no metabolizados, excepto los fosfatos y los fosfonatos, son moderados inhibidores de AChE. Sin embargo, la biotransformación de dichos compuestos puede incrementar ampliamente su potencial anticolinesterásico y, por lo tanto, el efecto tóxico resultante es la suma de los procesos bioquímicos competitivos de *activación* y *detoxificación*. La *activación* de los OF puede ser definida como la transformación metabólica de un compuesto OF inactivo a compuestos activos y la conversión de un compuesto OF activo a otros compuestos más activos. La *detoxificación* incluye la biotransformación de los compuestos OF a metabolitos no tóxicos (Jokanović, 2001).

Las reacciones de biotransformación de xenobióticos se dividen en reacciones de Fase I y reacciones de Fase II. En las reacciones de Fase I, un grupo polar tal como hidroxilo (-OH), carboxilo (-COOH), tiol (-SH) o amino (-NH₂) es introducido en la molécula a través de reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis. Los metabolitos formados pueden ser más tóxicos que el compuesto original, como por ejemplo paraoxón (el metabolito activo de paratión). En las reacciones de Fase II, los metabolitos polares son conjugados con sustratos endógenos como glucurónidos, glutatión reducido (GSH), sulfatos, acetatos y aminoácidos para formar compuestos más hidrosolubles que pueden ser excretados en la orina (Livingstone, 1998; Jokanović, 2001).

En las reacciones de biotransformación de los OF están involucrados diferentes sistemas enzimáticos. Algunos de ellos intervienen en la activación metabólica de los OF tales como las monooxigenasas mientras que otros, tales como las A-esterasas, carboxilesterasas y glutatión S-transferasas son muy importantes en la detoxificación. El que predomine la reacción de activación o la reacción de detoxificación depende de la estructura del compuesto OF y de su interacción con dichos sistemas enzimáticos.

1.2.1.1.2.1. Enzimas de Fase I

El metabolismo oxidativo, que involucra al oxígeno molecular, es el proceso enzimático inicial en la biotransformación de la mayoría de los compuestos orgánicos lipofílicos extraños. A continuación se muestra un esquema general de la reacción catalizada por las monooxigenasas:



donde RH representa al sustrato y ROH al producto hidroxilado. Sin embargo, bajo condiciones *in vivo* esta reacción es mucho más compleja (Stegeman y Hahn, 1994).

El sistema microsomal de monooxigenasas comprende tres componentes catalíticos: citocromo P450 (EC 1.14.14.1), NADPH-P450 reductasa (RED; EC 1.6.2.4) y flavina monooxigenasas (EC 1.14.13.8) (Jokanović, 2001).

Los anfibios y los reptiles son nexos importantes en el árbol filogenético entre los peces y los mamíferos y muestran diferencias importantes en su sistema de monooxigenasas respecto de los segundos. No sólo el contenido es menor en estos organismos sino que también las actividades catalíticas son inferiores, se inducen en menor grado y responden más lentamente a ciertos xenobióticos (Ertl y Winston, 1998).

i. Citocromo P450

Las enzimas citocromo P450 comprenden una de las más grandes y versátiles familias de hemoproteínas. Múltiples formas de estas enzimas parecen estar presentes en todos los organismos, desde bacterias a vertebrados. La gran cantidad de sustratos metabolizados incluyen moléculas endógenas tales como prostaglandinas, esteroides y ácidos grasos, y contaminantes ambientales tales como plaguicidas,

hidrocarburos aromáticos y dioxinas (Snyder, 2000; Solé y Livingsstone, 2005). Las enzimas P450 no sólo catalizan la incorporación de un átomo de oxígeno desde el oxígeno molecular a un sustrato (Rewitz et al., 2006), sino también una variedad de reacciones que incluyen hidroxilaciones, epoxidaciones, deaminación oxidativa, N-, O-, S-dealquilaciones y dehalogenaciones.

Las enzimas citocromo P450 están presentes en muchos tejidos, pero generalmente los niveles más altos de actividad se encuentran en el retículo endoplásmico de aquellos tejidos relacionados con el procesamiento de alimentos tal como en hígado de peces, hepatopáncreas de crustáceos, intestino de poliquetos y glándulas digestivas de moluscos (Solé y Livingsstone, 2005).

Se ha diseñado un sistema de nomenclatura que utiliza el prefijo CYP para identificar los genes correspondientes a las distintas formas. Números arábigos se agregan luego de la sigla CYP para identificar la familia genética y a continuación se agrega una letra para designar la subfamilia. Las isoformas individuales se identifican mediante el uso de un segundo número arábigo a continuación de la letra que designa la subfamilia genética.

Las principales enzimas involucradas en la desulfuración de clorpirifós, metilazinfos y otros OF son CYP1A2, -2B6 y -3A4, lo que resulta en la activación de dichos insecticidas. CYP3A4 posee baja afinidad por estos insecticidas, pero desempeña un papel importante en su desulfuración frente a elevados niveles de exposición. Por su parte, CYP1A2 y CYP2B6 son muy activas a bajas concentraciones de insecticidas y por lo tanto desempeñan un importante papel durante episodios de intoxicaciones en humanos (Buratti et al., 2003).

ii. NADPH-P450 reductasa

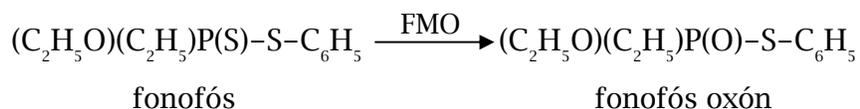
En aquellas reacciones metabólicas en las que participa CYP450, la transferencia de electrones desde NADPH a CYP450 se logra a través de la enzima NADPH-P450 reductasa (RED). Esta es una flavoproteína que

contiene tanto FAD (flavina adenina dinucleótido) como FMN (flavina mononucleótido). Un electrón es introducido en RED a través de FAD y es transferido a CYP450 desde FMN. RED es una coenzima necesaria para el funcionamiento de CYP450, aunque el mecanismo de su interacción aún no ha sido completamente dilucidado. RED puede reducir el grupo $-\text{NO}_2$ del OF paratión a un grupo $-\text{NH}_2$ produciendo aminoparatión, el cual carece de actividad anticolinesterásica:



iii. Flavina monooxigenasas

Las enzimas que contienen flavinas, incluyendo reductasas, oxidasas y monooxigenasas, están ampliamente distribuidas en la naturaleza y catalizan la transformación de muchas clases de xenobióticos (Levi y Hodgson, 1992). La actividad de las flavina monooxigenasas microsomales (FMO) en tejidos extrahepáticos tales como pulmón y riñón es relativamente alta comparada con la de los citocromos P450. De manera similar a los citocromos P450, las FMO son enzimas presentes en el retículo endoplásmico involucradas en la monooxigenación de numerosos compuestos exógenos que contienen nitrógeno, azufre y fósforo. Las FMO pueden catalizar solamente reacciones de oxigenación, mientras que los citocromos P450 están involucrados en numerosas reacciones tales como oxigenación, epoxidación, reducción y alquilación (Jokanović, 2001). Las FMO aceptan electrones directamente desde NADPH y no a través de RED. Los insecticidas OF de tipo fosfonato son buenos sustratos para las FMOs ya que en su estructura contienen un enlace P-C, indispensable para la actividad de FMO. Esta es también la razón por la cual el paratión y los fosforoditioatos en general no son buenos sustratos de las FMOs (Levi y Hodgson, 1992; Jokanović, 2001). Por ejemplo, el OF fonofós es activado metabólicamente por FMO:



1.2.1.1.2.2. Enzimas de Fase II

i. Esterasas

Las esterasas son hidrolasas que catalizan la hidrólisis de ésteres para generar alcoholes y ácidos. Si bien no requieren de cofactores para su acción, frecuentemente son estimuladas por cationes divalentes (Saxena et al., 1998).

Las esterasas pueden ser subdivididas, de acuerdo a la forma en la cual interactúan con los OF, en tres grupos. En el primer grupo están las esterasas que hidrolizan los compuestos OF y los degradan como sustratos sin resultar inhibidas. Este grupo de enzimas se denomina *esterasas de tipo-A*, aunque en la literatura existen otros nombres de acuerdo al OF que hidrolizan (paraoxonasa, somanasa, etc.). En el segundo grupo de enzimas que actúan sobre los OF están las *esterasas de tipo-B*, las cuales son inhibidas por estos compuestos en una reacción que es dependiente del tiempo y la temperatura. Este grupo de enzimas comprende a la AChE, colinesterasa sérica, carboxilesterasa (CaE), tripsina, quimotripsina, etc. El tercer grupo comprende a las *esterasas tipo-C* que no interactúan con los OF (Vilanova y Sogorb, 1999; Jokanović, 2001). Las esterasas están presentes en todos los tejidos, usualmente en citosol o microsomas, de organismos vertebrados e invertebrados (Basack et al., 1998).

ii. Glutación S-transferasas

Las glutatión S-transferasas (GSTs) son un grupo de enzimas ampliamente distribuido que cataliza la conjugación de moléculas orgánicas que poseen un centro electrofílico reactivo con el grupo tiol

del tripéptido glutatión (GSH). El efecto de esta reacción, generalmente, es convertir una molécula lipofílica reactiva en una soluble en agua mediante la formación de un conjugado no reactivo que puede ser excretado fácilmente (Fukami, 1984; Clark, 1989).

Estas enzimas están presentes principalmente en la fracción soluble del hígado o riñón en vertebrados. Se ha demostrado que la conjugación de xenobióticos con el GSH ocurre en plantas (Gronwald y Plaisance, 1998), mamíferos, pájaros, reptiles, anfibios, peces, insectos y otros invertebrados (Fukami, 1984).

Las GSTs cumplen un papel esencial en la protección de los organismos contra el daño peroxidativo, en el transporte celular y en la detoxificación tanto de compuestos endógenos como de xenobióticos reactivos. También han estado implicadas en la resistencia adquirida a plaguicidas (Plaisance y Gronwald, 1999; Rufingier et al., 1999; Prapanthadara et al., 2000; Kostaropulos et al., 2001; Vontas et al., 2001).

En general, la conjugación de xenobióticos o compuestos endógenos mediada por las GSTs es precedida por otras reacciones, particularmente por oxidaciones mediadas por las MO. Por esta razón, la reacción de conjugación es considerada como un mecanismo de detoxificación secundario y por eso ha recibido poca atención en estudios sobre metabolismo de insecticidas. No obstante, se ha observado que la conjugación catalizada por GSTs de insecticidas tales como ciertos organofosforados, carbamatos e hidrocarburos clorados, es la primera etapa en el metabolismo de xenobióticos. Por lo tanto, la reacción de conjugación con GSH en algunos casos puede ser reconocida como proceso de *detoxificación primario* (Fukami, 1984). Un ejemplo son las reacciones de conjugación de los compuestos OF catalizadas por las GSTs que producen derivados fosfo-, alquil- o aril-glutatión (Fujioka y Casida, 2007) (Figura 8). Por ejemplo, el metabolito metil-glutatión fue detectado como resultado de la actividad de GST en larvas del sapo *Rhinella arenarum* expuestos a malatión (Venturino et al., 2001). En

mamíferos, los compuestos OF O-metilfosforotioatos son más fácilmente atacados por GST que los compuestos O-etilados, lo que afecta la toxicidad de los distintos OF. Sin embargo, estas diferencias no se manifiestan en insectos ya que se conoce que la actividad GST es baja en dichos organismos (Motoyama y Dauterman, 1980; Fukami, 1984).

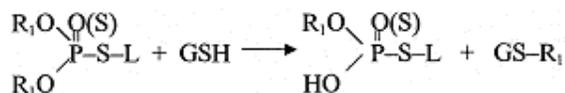


Figura 8: Reacción del insecticida MA con GSH, catalizada por GST.

1.3. Insecticida metilazinfos

El metilazinfos (MA) (Figura 9) es un insecticida-acaricida OF de amplio espectro, de gran persistencia y con un poder residual regular, clasificado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como *Clase I altamente tóxico*. Es tóxico también para ácaros y garrapatas y venenoso para caracoles y babosas. Junto a su análogo etilado, este compuesto es usado para combatir las plagas de frutales, vegetales, plantas ornamentales y cultivos de algodón (Matsumura, 1985). Es un insecticida-acaricida no sistémico por lo que no es transportado de un sitio a otro dentro de la planta. Se utiliza principalmente en aplicaciones foliares para controlar insectos que se alimentan de las hojas. Actúa como insecticida por contacto y como veneno estomacal.

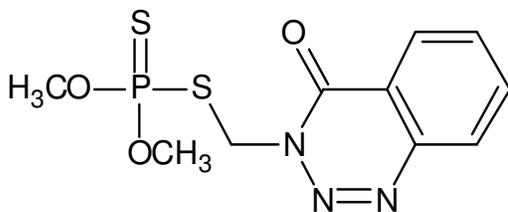


Figura 9: Estructura química del insecticida metilazinfos.

El insecticida MA [S-(3,4-dihidro-4-oxobenzod-[1,2,3]-triazin-3-ilmetil) O,O-dimetil fosforoditioato] (CAS N° 86-50-0) posee un peso molecular de 317,33 g/mol y su solubilidad en agua es de 30 mg/L a 25°C. Dentro de los plaguicidas OF, MA es uno de los más tóxicos. En exposiciones agudas, el MA es altamente tóxico por inhalación, absorción dérmica, ingestión y contacto ocular. La dosis letal-50 (DL50) de MA varía ampliamente dependiendo de la ruta de exposición y del animal utilizado. La DL50 oral en ratas es de 4,4 mg/kg, 80 mg/kg en conejillos de la india y entre 8 y 20 mg/kg en ratones. La DL50 dérmica varía entre 88 y 220 mg/kg en ratas y es de 65 mg/kg en ratones. En humanos, la ingestión de MA en cantidades superiores a 1,5 mg/kg/día puede causar envenenamiento severo y desembocar en la pérdida de conciencia y muerte. Las rutas de exposición dérmica y ocular son altamente peligrosas. Por otra parte, la exposición crónica a MA puede generar falta de concentración y memoria y causar dolor de cabeza, irritabilidad, náuseas, vómitos, etc. La inhibición de ChE en personas expuestas a MA puede persistir entre 2 y 6 semanas.

De acuerdo con datos correspondientes a las temporadas 2008-2009 y 2009-2010, se realiza un promedio de 11-12 aplicaciones por año de MA sobre la zona productiva del Alto Valle, convirtiéndose en el insecticida más utilizado en la región. Aquellos establecimientos que participan del plan de manejo Integrado de Plagas en Grandes Bloques del Programa Nacional de Supresión de Carpocapsa han reducido su aplicación a un promedio de 4 veces al utilizar la técnica de confusión sexual por feromonas para controlar la carpocapsa (SENASA-FUNBAPA, 2010).

El MA es altamente tóxico para mamíferos, aves e insectos benéficos así como también para peces e invertebrados acuáticos. Este compuesto ha sido frecuentemente detectado en aguas subterráneas y superficiales de la región (Loewy et al., 1999; 2003; 2011), lo cual constituye un riesgo potencial para las especies acuáticas que habitan los cuerpos de agua tales como peces, anfípodos gamáridos y estadios

embrionarios y larvales de anfibios (Ferrari et al., 2004; 2009; Anguiano et al., 2008).

1.4. Poliaminas

1.4.1. Vía metabólica de las poliaminas

Las poliaminas naturales putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm) se encuentran ampliamente distribuidas en los organismos vivos. Las poliaminas son policationes orgánicas esenciales que han sido implicados en eventos tales como la estabilización de la cromatina y del citoesqueleto, la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN), la transcripción de genes y la traducción a proteínas, el transporte iónico, la regulación del crecimiento y de la diferenciación celular y en la apoptosis (Igarashi y Kashiwagi, 2000; Wallace et al., 2003). Las células han desarrollado una maquinaria regulatoria compleja que controla los niveles intracelulares de poliaminas de manera rápida y precisa al combinar la síntesis *de novo*, la retroconversión, la degradación terminal, la secreción y la captación de poliaminas (Schipper et. al., 2000).

El metabolismo de las poliaminas se encuentra esquematizado en la Figura 10. El primer paso en la biosíntesis de poliaminas es la formación de Put a partir de la decarboxilación de ornitina en un paso catalizado por la enzima ornitina decarboxilasa (ODC; E.C. 4.1.1.17). ODC es una de las enzimas limitantes de la velocidad de esta vía metabólica y su actividad depende de la presencia de fosfato de piridoxal. Las poliaminas superiores Spd y Spm se forman por la adición sucesiva de dos grupos aminopropilo aportados por la acción de la enzima S-adenosilmetionina decarboxilasa (SAMDC) sobre S-adenosilmetionina (SAM). Este paso también es limitante ya que una vez que SAM es decarboxilada su destino es la síntesis de poliaminas y no puede ser utilizada en otras reacciones de metilación para las cuales es un sustrato común (Pegg, 2009). La actividad de SAMDC se ve estimulada por Put, de manera que una mayor disponibilidad de Put

incrementa la producción de SAM homocisteína (SAMHC), la cual es necesaria para la actividad de la enzima Spd sintasa para convertir Put en Spd. La adición de otro grupo aminopropilo sobre Spd, para formar Spm, es catalizada por la enzima Spm sintasa.

Debido a que esta ruta biosintética es básicamente irreversible, existe una serie de reacciones inversas en las cuales Spm y Spd son retroconvertidas respectivamente a Spd y a Put; en primer lugar, ambas son acetiladas por la enzima espermidina/espermina N¹-acetiltransferasa (SSAT) y luego oxidadas por acetilpoliamino oxidasa (APAO). La enzima SSAT regula la velocidad de esta ruta catabólica y su actividad se ve incrementada por elevados niveles de poliaminas. El efecto de la inducción de SSAT es la reducción de los niveles de Spm y Spd en las células y constituye un mecanismo homeostático que previene la acumulación de cantidades citotóxicas de poliaminas (Shantz y Pegg, 1999). La enzima espermina oxidasa (SMO) también participa en la degradación oxidativa de poliaminas, particularmente Spm, a la cual utiliza como sustrato y convierte en Spd. La ruta catabólica de poliaminas permite su interconversión en sentido contrario a su síntesis. Como consecuencia de la actividad de las enzimas oxidativas que participan en la degradación de poliaminas se generan sustancias tóxicas como peróxido de hidrógeno y aldehídos reactivos.

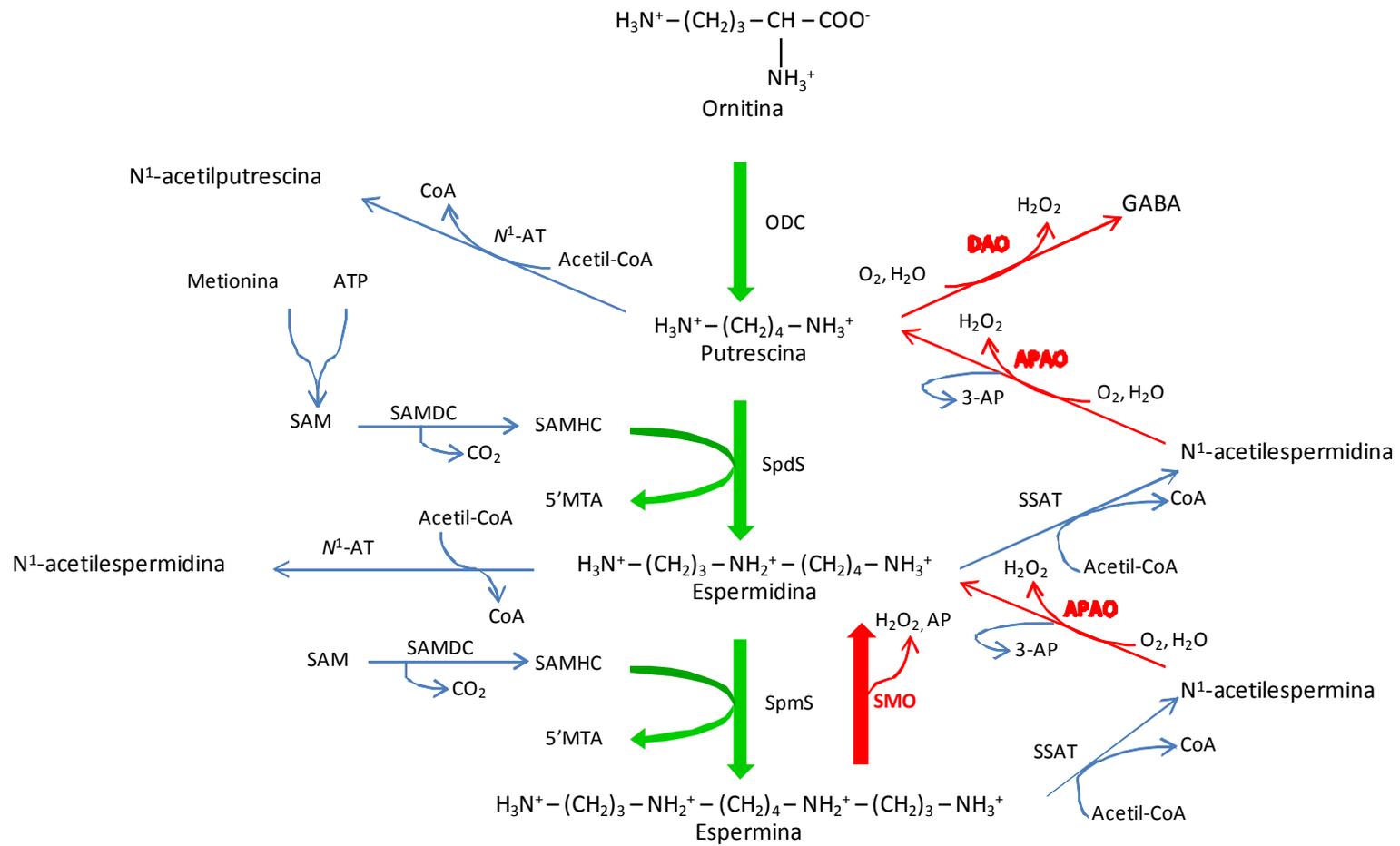


Figura 10: Vía metabólica de las poliaminas. Se encuentra esquematizada tanto la biosíntesis de poliaminas como su degradación oxidativa e interconversión. AP: 3-aminopropanal; CoA: Coenzima A; DAO: diamino oxidasa; GABA: ácido γ -aminobutírico; N¹-AT: N¹-acetil transferasa; ODC: ornitina decarboxilasa; APAO: acetilpoliamino oxidasa; SAM: S-adenosilmetionina; SAMDC: S-adenosilmetionina decarboxilasa; SAMHC: S-adenosilmetionina homocisteína; SMO: espermina oxidasa; SpdS: espermidina sintetasa; SpmS: espermina sintetasa; SSAT: espermidina/espermina N¹-acetiltransferasa; 5'MTA: 5' metiltioadenosina.

1.4.2. Regulación de los niveles de poliaminas

La enzima ODC contiene grupos -SH esenciales para su actividad enzimática por lo que, *in vitro*, requiere del agregado de sustancias protectoras de grupos tiol tales como ditioneitol (DTT), a fin de obtener la máxima actividad y estabilidad (Jänne y Williams-Ashman, 1971). La vida media de las enzimas ODC, SAMDC y SSAT es inferior a 1 h. A pesar de que las actividades de las enzimas ODC y SSAT conducen a un incremento en los niveles de Put, ambas poseen papeles opuestos en la síntesis de poliaminas: ODC tiende a incrementar los niveles de poliaminas, mientras que SSAT tiende a disminuirlos. Ambas enzimas se encuentran reguladas a nivel de su estabilidad proteica por poliaminas. Las poliaminas estimulan la degradación de ODC mediante la acción de una proteína denominada antizima (AZ) y, a su vez, inhiben la degradación de SSAT (Shantz y Pegg, 1999).

Además del aparato metabólico que sintetiza e interconvierte poliaminas, las células pueden regular sus reservas intracelulares por transporte de poliaminas a través de las membranas. Las poliaminas extracelulares pueden derivar de otras células que secreten poliaminas o sus derivados acetilados; también pueden provenir de la dieta o ser de origen microbiano y ser captadas a nivel del tracto gastrointestinal (Schipper et al., 2000).

1.4.2.1. Regulación de la actividad y degradación de ornitina decarboxilasa por antizima

La proteína AZ es un inhibidor no-competitivo de ODC que se une fuertemente al monómero de ODC. En condiciones normales, ODC ejerce su actividad enzimática como un dímero y la unión de AZ a un monómero de ODC genera un heterodímero ODC-AZ que es enzimáticamente inactivo. La unión de AZ a ODC conduce a esta última a su degradación por el proteosoma 26S (Elias et al, 1995) (Figura 11). La síntesis de AZ es regulada por un evento de cambio de marco de lectura de su ARNm estimulado por poliaminas, de modo que cuando el nivel de éstas se incrementa, se favorece la síntesis de AZ. Además, las poliaminas inhiben la degradación de AZ, para lo que se requiere de su ubiquitinación. Por lo tanto, altos niveles de poliaminas estimulan la síntesis de AZ e inhiben su degradación (Palanimurugan et al., 2004). Además, el sistema de transporte de poliaminas se bloquea cuando existen altos niveles de AZ (Igarashi y Kashiwagi, 2000).

Se ha descubierto una proteína que bloquea los efectos de AZ sobre ODC. La proteína, llamada inhibidor de AZ (AZIN) es similar a ODC pero no tiene actividad decarboxilasa. La proteína AZIN se une a AZ más fuertemente que ODC y por lo tanto libera a ODC del complejo ODC-AZ (Pegg, 2006).

1.4.2.2. Regulación transcripcional y traduccional de ornitina decarboxilasa

La síntesis de la enzima ODC es regulada a nivel de la transcripción de su correspondiente gen, y diversos factores incrementan la síntesis del ARNm de ODC. La región promotora del gen *odc* contiene múltiples secuencias que posibilitan su respuesta a hormonas, factores de crecimiento y promotores de tumores.

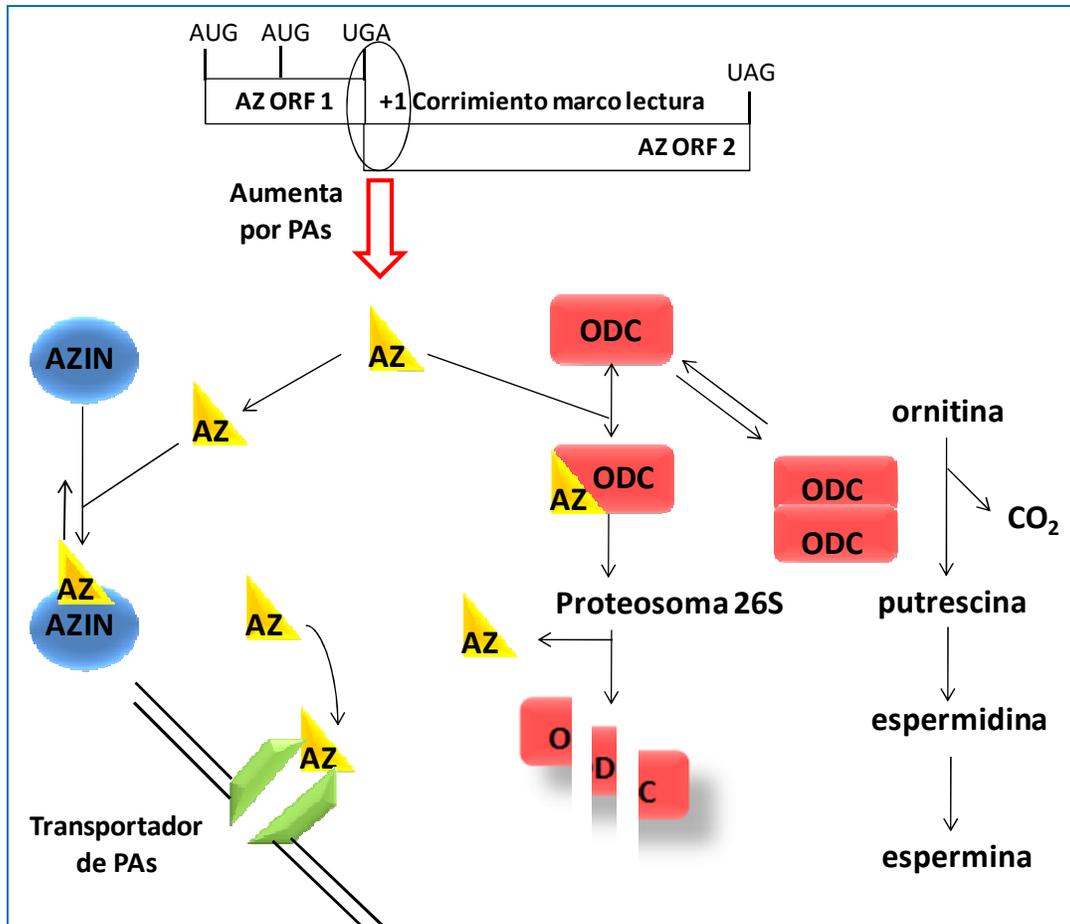


Figura 11: Papel desempeñado por antizima y ornitina decarboxilasa en el metabolismo de poliaminas. El dímero de ODC cataliza la producción de putrescina, que luego es convertida en las poliaminas superiores. AZ es sintetizada por un corrimiento en el marco de lectura durante la traducción de su ARNm, fusionando los ORF 1 y 2, en un proceso estimulado por poliaminas. Antizima puede unirse a ODC y dirigirla a su degradación por el proteosoma 26S o bien unirse a su inhibidor, AZIN. AZ: antizima; AZIN: inhibidor de antizima; ODC: ornitina decarboxilasa; ORF: *open reading frame* (marco abierto de lectura).

Entre dichas secuencias se encuentran las de respuesta a AMP cíclico, motivos CAAT y LSF, sitios de unión para los factores de transcripción AP-1 (*activator protein 1*; proteína activadora 1), AP-2 (*activator protein 2*; proteína activadora 2) y Sp1 (*specificity protein 1*;

proteína de especificidad 1) y una caja TATA. Además, el gen *odc* es una diana del oncogen *c-myc* y el incremento de actividad del complejo de transcripción Myc/Max lleva al aumento de ODC. La región promotora del gen *odc* contiene dos cajas E con las secuencias CACGTG que conforman la secuencia canónica CAYGTG a la cual se une el factor de transcripción Myc/Max. De esta manera, el gen *odc* se activa cuando los niveles de c-Myc se incrementan. Las cajas E se encuentran ocupadas en células en reposo por complejos Mnt/Max y en ellas la transcripción del gen *odc* es baja (Qin et al., 2004; Nilsson et al., 2004) (Figura 12).

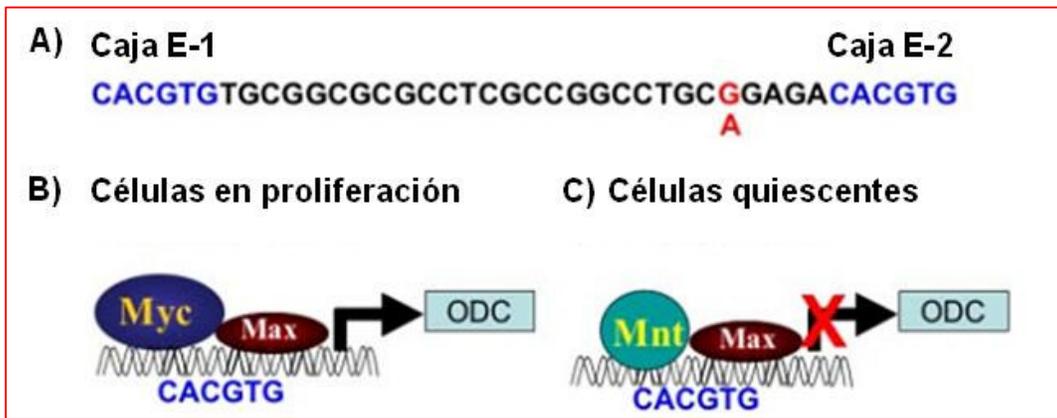


Figura 12: Papel desempeñado por c-Myc en la transcripción de *odc*. A) Región del gen *odc* que contiene las dos Cajas E, en color azul. El polimorfismo G/A localizado en el intrón 1 se muestra en rojo. B) Estimulación de la transcripción de *odc* en células en proliferación bajo la influencia de Myc/Max. C) Inhibición de la transcripción de *odc* en células quiescentes por influencia de Mnt/Max.

La síntesis de ODC también se encuentra regulada a nivel traduccional. El ARNm de ODC posee una región 5'-no traducida (5'-UTR) con una importante estructura secundaria, por lo que su traducción se encuentra favorecida por altos niveles del factor de inicio de la traducción. Las células que sobreexpresan dicho factor poseen un elevado contenido de ODC que contribuiría a su fenotipo transformado

(Shantz et al., 1996). Diversos estudios indican que la traducción del ARNm de ODC es reducida por las poliaminas y podría deberse a que la síntesis de proteínas ribosomales requiere poliaminas pero es inhibida por un exceso de las mismas. Además, ODC también se encuentra regulada por el oncogen *ras*. La activación de la vía Ras ejerce efectos estimulatorios tanto en el contenido de ARNm de ODC como sobre su traducción (Shantz, 2004). Tanto Put como Spd estimulan la fosforilación de proteínas a través de tirosina quinasas. Spd también estimula la fosforilación de residuos treonina y tirosina sobre ERK1 y ERK2 (*extracellular signal-regulated kinase*; quinasa regulada por señales extracelulares; p42 y p44). A su vez, la activación de quinasas por poliaminas dispara la expresión de oncogenes; por ejemplo, Spd estimula la transcripción y traducción del oncogen nuclear *c-myc* mientras que Put estimula la transcripción de *c-fos* y *c-jun* (Figura 13), que controlan la transcripción del gen *odc* (Tabib y Bachrach, 1999; Bachrach et al., 2001a). Además, ERK1/2 fosforila a dichos factores de transcripción que a su vez regulan la expresión de *odc* y se establece de esta manera un circuito positivo en la regulación de ODC (Flamigni et al., 1999).

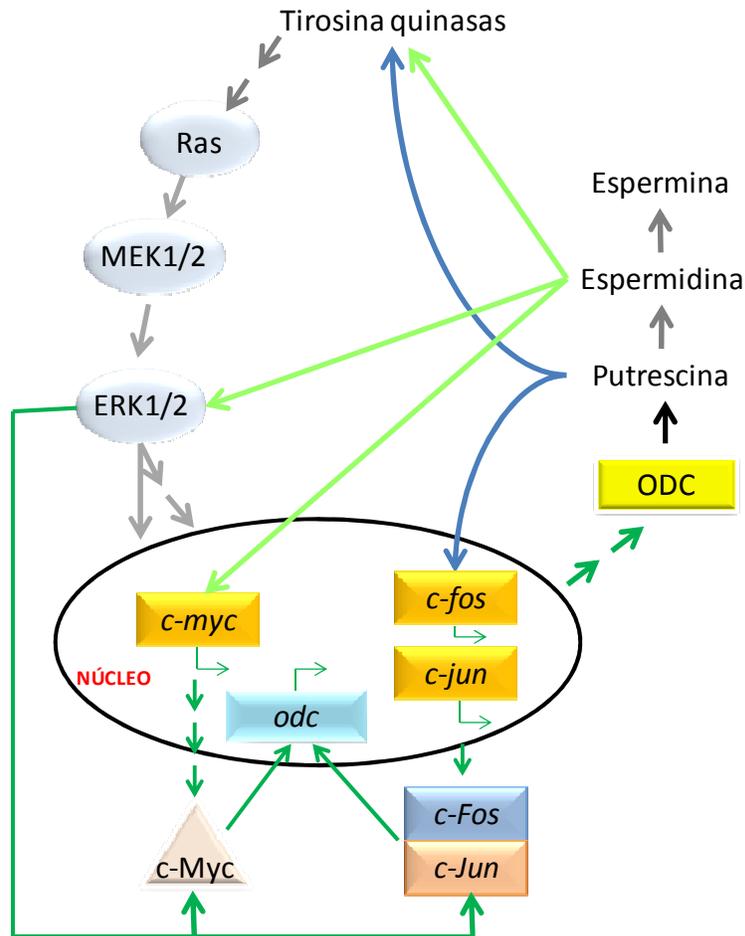


Figura 13: Relación entre el metabolismo de poliaminas y la expresión de factores de transcripción. Tanto Put como Spd son capaces de estimular la fosforilación de proteínas por tirosina quinasa. A su vez, Spd estimula la fosforilación de ERK1/2 y la transcripción del oncogen *c-myc*. Por su parte, Put estimula la transcripción de los oncogenes *c-fos* y *c-jun*, componentes del factor de transcripción AP-1. Además, ERK1/2 fosforila a c-Myc y AP-1, que controlan a su vez la transcripción del gen *odc*. Se establece así un circuito positivo que involucra a ODC y a la cascada Ras - MEK1/2 - ERK1/2.

1.4.3. Desregulación del metabolismo de poliaminas

1.4.3.1. Alteración en la síntesis de poliaminas

Las poliaminas regulan procesos celulares fundamentales, incluyendo procesos de proliferación, por lo que sus niveles deben ser mantenidos dentro de estrechos márgenes de concentración óptima. La desregulación de la síntesis de poliaminas puede desencadenar la muerte celular, ya sea por aumento o disminución de la actividad de enzimas clave. Erez et al. (2002) reportaron que la acumulación de Put en células que sobreproducen la enzima ODC provoca la muerte celular apoptótica, la cual es inhibida por difluorometilornitina (DFMO), un inhibidor específico de ODC. Dicho proceso apoptótico involucra la liberación del citocromo c desde la mitocondria y la activación de las cascadas de caspasas. La acumulación de Put por sobreexpresión de ODC lleva a una situación de estrés oxidativo que causa la muerte celular. Por otra parte, la inhibición de ODC por utilización del inhibidor DFMO en el octavo día de preñez en ratones está relacionada con alteraciones en la formación del saco vitelino y con la diferenciación trofoblástica, lo que afecta procesos tales como la vasculogénesis y la esteroideogénesis (López-García et al., 2008).

1.4.3.2. Alteración en el catabolismo de poliaminas

El catabolismo de poliaminas desempeña un importante papel en la homeostasis de dichas sustancias. La desregulación de este proceso es una característica que acompaña frecuentemente a diversas condiciones patológicas. Cada una de las enzimas involucradas en el catabolismo de poliaminas (SSAT, SMO y APAO) posee el potencial de alterar la homeostasis de las poliaminas en respuesta a diversas señales. Además, la acción de las oxidasas genera especies reactivas como H_2O_2 y aldehídos reactivos, cada uno con capacidad de inducir estados patológicos (Figura 14). Por ende, la correcta regulación de la vía metabólica de poliaminas es de naturaleza crítica (Casero y Pegg, 2009).

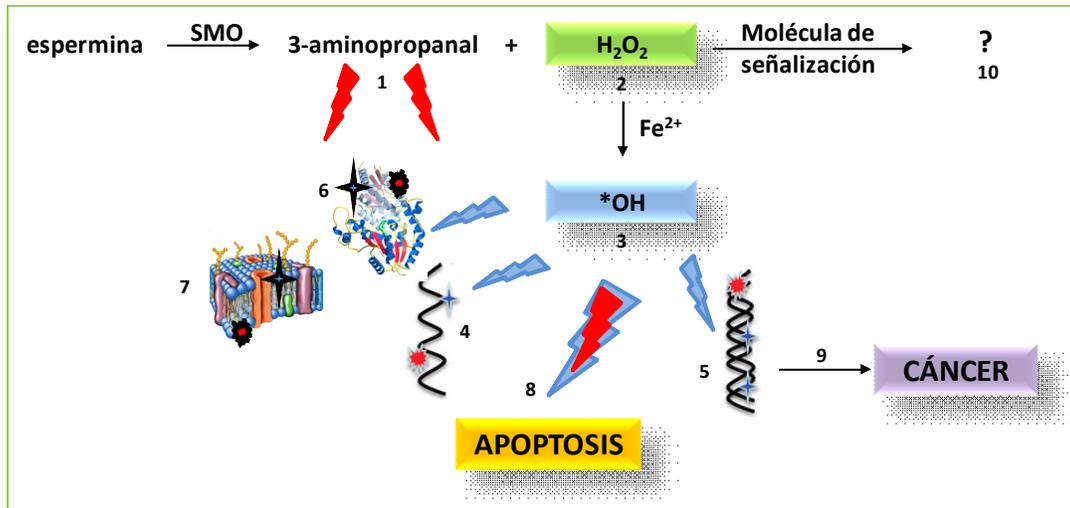


Figura 14: Potenciales daños que podrían resultar de la oxidación de poliaminas. Las poliaminas intracelulares pueden ser oxidadas tanto por SMO como por APAO. Se muestra el posible daño resultante de la oxidación de Spm por SMO. Los rayos rojos representan posibles daños por aldehídos reactivos, mientras que los azules representan aquellos por especies reactivas de oxígeno. (1) El aldehído reactivo 3-AP puede dañar al ARN (4), ADN (5), proteínas (6) y lípidos de membrana (7). De igual modo, el peróxido de hidrógeno (2) puede dañar a dichas moléculas una vez convertido en el radical hidroxilo (3), altamente reactivo, a través de la reacción de Fenton. Si el daño oxidativo es suficientemente severo, podría desatarse la muerte celular por apoptosis (8). El daño heredado en el ADN podría resultar en la transformación, carcinogénesis (9) y metástasis. El peróxido de hidrógeno producido durante el catabolismo de poliaminas podría actuar como una molécula de señalización (10).

1.4.4. Procesos en los que participan las poliaminas

Las poliaminas participan en multitud de procesos celulares. Como se mencionó anteriormente, las poliaminas se encuentran completamente protonadas como policationes a pH fisiológico. Esta característica fisicoquímica les permite establecer fuertes interacciones catión-anión con diferentes macromoléculas polianiónicas como el ADN y el ARN. Así, la mayor parte del contenido celular de poliaminas se encuentra

unido a ARN mientras que una pequeña porción de las poliaminas totales se encuentra unida a fosfolípidos de membrana y en forma libre (Igarashi y Kashiwagi, 2010). Se ha establecido que la interacción poliaminas-ARN estimula tanto la traducción de proteínas (Kashiwagi et al., 1990) como el ensamblaje de subunidades ribosomales 30S (Echandi y Algranati, 1975), entre otros procesos. Por otra parte, en su interacción con el ADN, las poliaminas actúan como represoras de la transcripción genética ya que estabilizan áreas de cromatina fuertemente condensadas (Pollard et al., 1999). Sin embargo, también se ha reportado la estimulación de la transcripción de genes como el de *E-cadherina*, a través de c-Myc, por poliaminas (Liu et al., 2009).

Es reconocida la importancia de las poliaminas en la proliferación celular. Su efecto involucraría la interacción de las poliaminas con la proteína p53, que cumple un papel esencial en la regulación de diversos genes involucrados en el crecimiento y la muerte celular (Li et al., 2001). Además, el requerimiento de poliaminas durante el crecimiento celular podría deberse a que la poliamina Spd es necesaria para la formación del aminoácido hipusina, presente en el factor eucariótico de iniciación 5A (eIF-5A) (Tome y Gerner, 1996). Las poliaminas Spd y Spm regulan la actividad de diversos canales iónicos de membrana y en particular ejercen un efecto de bloqueo sobre ciertos canales de potasio (involucrados en el mantenimiento del potencial de membrana) y sobre el receptor de glutamato (Williams, 1997). Debido a su capacidad de estabilizar membranas biológicas, las poliaminas son capaces de modular la actividad de receptores de factores de crecimiento, como por ejemplo el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Johnson y McCormack, 1999). Además, las poliaminas están involucradas en la señalización intracelular. Debido a su carácter policatiónico, estos compuestos son capaces de interactuar con los fosfolípidos de membrana y podrían regular la actividad de enzimas unidas a las mismas, tales como la proteína quinasa C (PKC) (Moruzzi et al., 1993).

Los cambios en los niveles de poliaminas y en las actividades de las enzimas pertenecientes a su vía metabólica son observaciones efectuadas frecuentemente en estudios de apoptosis. Sin embargo, es difícil enunciar una conclusión general sobre los mecanismos de acción de las poliaminas en el proceso apoptótico ya que han sido asociadas con la inducción y la sensibilización así como con la protección frente a la apoptosis. La diversidad de resultados obtenidos puede deberse a las características intrínsecas de los diferentes sistemas biológicos empleados en los estudios sobre apoptosis. Se han reportado incrementos en la actividad de ODC y en los niveles de poliaminas en fibroblastos humanos estimulados con factor de necrosis tumoral (TNF) como inductor de apoptosis (Donato et al., 1991). Sin embargo, utilizando la misma sustancia inductora, las células humanas de cáncer cervical respondieron incrementando ODC y disminuyendo el nivel de poliaminas (Manchester et al., 1993). Es evidente que niveles extremos de poliaminas, ya sean extremadamente altos o extremadamente bajos, interfieren con sus interacciones celulares y afectan sus funciones fisiológicas. En consecuencia, el ciclo celular puede verse afectado y eventualmente conducir a la activación del proceso de apoptosis.

Alternativamente, en condiciones en las que la apoptosis se encuentra inhibida y/o en conjunto con lesiones en el ADN, la expresión constitutiva de ODC puede conducir a la transformación y al crecimiento celular descontrolado (Auvinen et al., 1997; Shantz y Pegg, 1998; Tabib y Bachrach, 1998). Además, Hoet y Nemery (2000) reportaron que la acumulación excesiva de poliaminas favorece la muerte celular programada debido al estrés oxidativo generado como consecuencia de la acumulación de peróxido de hidrógeno producido durante el catabolismo de poliaminas.

Las poliaminas también ejercen papeles protectores que han sido demostrados tanto en procariotas como en eucariotas. Estas sustancias pueden proteger al ADN del daño infligido por especies reactivas del oxígeno (EROs) (Ha et al., 1998a,b; Muscari et al., 1995; Khan et al., 1992; Pedreno et al., 2005). Además, se ha demostrado la capacidad de las

poliaminas de actuar como barredoras de EROs (Ha et al., 1998b; Sava et al., 2006). En gran parte de los estudios realizados *in vivo*, la respuesta de inducción de poliaminas ha protegido a las células del estrés oxidativo (Muscari et al., 1995; Khan et al., 1992; Tkachenko et al., 2001; Ye et al., 1997; Kasukabe et al., 2004). En estudios realizados en *Trypanosoma cruzi*, el oligoqueto *Lumbriculus variegatus* y el gastrópodo *Biomphalaria glabrata* se observó la protección por poliaminas frente a la peroxidación lipídica (Hernández et al., 2006; Cochón et al., 2007).

1.4.5. Ornitina decarboxilasa en anfibios

Estudios pioneros realizados por Russell (1971) en la rana africana *Xenopus laevis* determinaron que embriones mutantes anucleados, incapaces de sintetizar nuevos ribosomas a partir de su gastrulación, muestran una disminución de la actividad de SAMDC y son incapaces de acumular Spd. Además, la actividad de ODC se encuentra disminuida en estos mutantes, al igual que los niveles de Put. Por lo tanto, la síntesis de Put y Spd en embriones de *X. laevis* se correlaciona con el inicio de la síntesis de ARN ribosomal y con la formación de un nucléolo viable en las células embrionarias.

La síntesis de ODC es un componente integral del proceso de maduración citoplasmática de ovocitos en *X. laevis*. Se ha determinado que el aumento de la actividad metabólica general en ovocitos en maduración desencadena una situación de estrés oxidativo que es controlada por la poliamina Put a través de su síntesis por ODC. Esta sería una medida protectora que garantizaría la producción de huevos saludables al evitar la apoptosis por EROs (Zhou et al., 2009). Por lo tanto, ODC desempeña un papel antiapoptótico durante la maduración de ovocitos de *X. laevis*.

En el año 2001 un parálogo de *xodc1*, *xodc2*, fue aislado en *X. laevis*. A diferencia de *xodc1*, que se expresa a niveles constantes a lo largo del desarrollo embrionario, *xodc2* muestra un cierto grado de

variación. Antes de que los embriones entren en el estadio de *blástula tardía*, la transcripción del gen *xodc2* es muy baja, y luego se incrementa dramáticamente hasta que comienza el estadio de *respuesta muscular* a partir del cual disminuye en forma gradual. Además, en el mismo trabajo se estableció la distribución espacial de *xodc2* a través de hibridación *in situ* en embriones enteros (Cao et al., 2001). *xodc2* fue detectado inicialmente en el polo animal de embriones en estadio de blástula tardía. Durante la fase de neurulación y en brote caudal, la señal se desplazó hacia los extremos del embrión y su localización se restringió gradualmente. En el estadio de respuesta muscular, la señal mostró una expresión específica en diversos tejidos, entre ellos la glándula cemental y el ano. A diferencia de *xodc2*, *xodc1* mostró una distribución ubicua en todo el embrión a lo largo de su desarrollo.

1.5. Sistema de defensa antioxidante

Los organismos vivos continuamente producen EROs como consecuencia natural de su metabolismo. Las EROs comprenden una serie de diversas especies químicas que incluyen tanto a radicales de oxígeno, tales como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el hidroxilo (OH^{\cdot}), como a ciertas especies no radicales que son agentes oxidantes y/o se convierten en radicales como el ácido hipocloroso (HOCl), el oxígeno singulete (1O_2) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), entre otros. Algunos de estos intermediarios producidos, como el $O_2^{\cdot-}$ o el OH^{\cdot} , son extremadamente inestables; mientras que otros, como el H_2O_2 tienen vida relativamente más larga y difunden fácilmente (Finkel y Holbrook, 2000; Scandalios, 2002; Halliwell, 2006).

Las EROs son moléculas esenciales en el control fisiológico de diversas funciones celulares. La exposición de los organismos a diversos factores ambientales puede provocar un incremento en la producción de EROs, lo que afecta el estado redox celular (Halliwell y Gutteridge, 2006) y eventos críticos del desarrollo. Las EROs se ven incrementadas por factores exógenos como la radiación solar, toxinas fúngicas o

plaguicidas (Miller y Brzezinska-Slebodzinska, 1993). Los radicales libres generados pueden iniciar procesos de peroxidación lipídica produciendo daño en las membranas biológicas o pueden oxidar proteínas, polisacáridos e incluso el ADN. Adicionalmente, las EROs pueden activar señales moleculares que conducen tanto a la apoptosis como a la proliferación celular y dar lugar a lesiones pre-neoplásicas (Panemangalore y Bebe, 2000). Finalmente se puede llegar a una condición fisiológica alterada de los organismos, reducción en el crecimiento, y a la muerte si son afectados tejidos esenciales (Janssens et al., 2002).

Los organismos que son capaces de contrarrestar los efectos deletéreos de las EROs han desarrollado un complejo sistema de defensa antioxidante. Si dicho sistema no consigue neutralizar el exceso de EROs, ocurre una situación de estrés oxidativo (Davies, 1995). La exposición de organismos acuáticos a plaguicidas OF puede conducir a una situación de estrés oxidativo y/o a la alteración de sus sistemas de defensa antioxidante (Anguiano et al., 2001; Oruc et al., 2004; Monteiro et al., 2006; Durmaz et al., 2006; Ferrari et al., 2007; Kavitha y Rao, 2008; Isik y Celik, 2008; Ferrari et al., 2008, 2009; Thomaz et al., 2009).

1.5.1. Componentes del sistema de defensa antioxidante

El sistema de defensa antioxidante comprende tanto enzimas como antioxidantes químicos de bajo peso molecular. La expresión de las enzimas antioxidantes es modulada, en algunos casos, por los propios xenobióticos a los cuales el organismo ha sido expuesto (Janssens et al., 2002). Dentro de los componentes enzimáticos del sistema antioxidante se encuentran las enzimas glutatión S-transferasa (E.C. 2.5.1.18; GST) glutatión reductasa (E.C., 1.6.4.2, GR), glutatión peroxidasa Se-dependiente (E.C. 1.11.1.9, SeGPx), catalasa (E.C. 1.11.1.6, CAT) y superóxido dismutasa (E.C. 1.15.1.1, SOD). Dentro de los antioxidantes químicos se encuentran compuestos tales como el alfa-tocoferol

(vitamina E), el ácido ascórbico (vitamina C), los tioles proteicos (-SH) y el glutatión reducido (GSH).

1.5.1.1. Glutatión reducido

El tripéptido glutatión (gamma-glutamil-cisteinil-glicina) (Figura 15) es una sustancia presente en altas concentraciones en las células de mamíferos, generalmente en concentraciones milimolares (Sies, 1999).

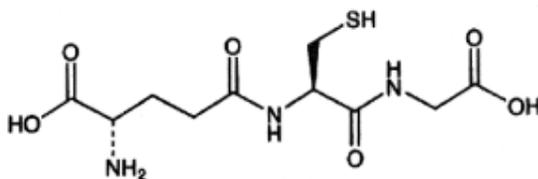


Figura 15: Estructura del tripéptido glutatión reducido (GSH).

El glutatión se encuentra principalmente como glutatión reducido (GSH) y sólo una pequeña fracción está constituida por el disulfuro de glutatión o glutatión oxidado (GSSG). El GSH actúa como una sustancia nucleofílica capaz de eliminar numerosos compuestos y sus metabolitos al convertir sus centros electrofílicos en enlaces tioéter y también participa como cofactor en las reacciones catalizadas por las enzimas GST y glutatión peroxidasa Se-dependiente (SeGPx). De acuerdo con Jokanović (2001), una disminución del 20%-30% en los niveles de glutatión total puede disminuir la capacidad celular de defensa frente a la acción tóxica de oxidantes y deja a la célula expuesta al daño y a la muerte celular. Ya que GSH es un nucleófilo, se hace posible su interacción directa con sustancias electrofílicas en ausencia de enzimas para formar productos de conjugación. Además, GSH protege a las células de la desnaturalización de proteínas ocasionada por la oxidación de sus grupos tiol (-SH) durante situaciones de estrés (Noctor et al., 2002). El contenido de GSH endógeno y de tioles ácido-solubles son

parámetros evaluados en estudios de laboratorio con organismos acuáticos así como también en estudios a campo (Anguiano et al., 2001; Falfushynska y Stolyar, 2008; 2009; Ferrari et al., 2007; 2008; 2009).

1.5.1.2. Enzimas antioxidantes

1.5.1.2.1. Enzimas dependientes de glutatión reducido

1.5.1.2.1.1. Glutatión S-transferasa

Como se ha mencionado anteriormente (1.2.1.1.2.2. ii), las enzimas GSTs son un grupo de enzimas que catalizan el ataque nucleofílico del GSH sobre compuestos no polares que contienen un átomo de carbono, de nitrógeno o de azufre electrofílico. Asimismo, metabolizan agentes quimioterapéuticos, insecticidas, herbicidas, carcinógenos y subproductos del estrés oxidativo con propiedades mutagénicas y citotóxicas. Se hace referencia en esta apartado a la acción antioxidante de algunas isoenzimas de GST.

La peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas biológicas es un proceso iniciado por radicales libres que disparan reacciones en cadena y conducen a la amplificación del daño a los lípidos. En consecuencia, se producen hidroperóxidos de vida corta que se escinden y generan electrófilos secundarios, los cuales son eliminados de la célula gracias a la acción conjunta de las enzimas GSTs y SeGPx (Hayes y Mc Lellan, 1999). La sobreexpresión de GST en células tumorales de mamíferos ha sido relacionada con la resistencia a agentes anticancerígenos y carcinógenos químicos (Hayes y Pulford, 1995). Se ha reportado, en embriones tardíos del anuro *Bufo bufo*, la expresión genética de una isoforma de GST (BbGSTP2-2) eficiente en el barrido de hidroperóxidos orgánicos que es inducida por estrés oxidativo (Amicarelli et al., 2004). La proteína es sintetizada durante la metamorfosis de *B. bufo*, cuando los individuos pasan del ambiente acuático al terrestre, donde la concentración de oxígeno es mayor. Por otra parte, Anguiano et al. (2001) reportaron que la actividad de GST en

embriones tempranos de *R. arenarum* no es afectada por exposición continua al OF malatión, pero que es inducida significativamente sobre el final del desarrollo embrionario como consecuencia de la exposición sostenida al plaguicida. Las características de GST expuestas indican que la inducción de GST es una respuesta celular conservada a lo largo de la evolución para hacer frente al estrés oxidativo (Hayes et al., 2005).

Es importante tener en cuenta que las enzimas GSTs son parte de una estrategia general de defensa y que su efectividad depende de las acciones combinadas de las enzimas que sintetizan GSH y de los transportadores que remueven los compuestos conjugados a GSH (Hayes y Mc Lellan, 1999).

1.5.1.2.1.2. Glutación peroxidasa Se-dependiente

Las enzimas SeGPx catalizan la reducción de una variedad de hidroperóxidos, incluyendo peróxidos lipídicos y peróxido de hidrógeno, a sus correspondientes alcoholes a expensas del antioxidante GSH, de acuerdo con la reacción:



A pesar de que poseen un mecanismo catalítico común, las distintas isoformas de SeGPx poseen características únicas con respecto a su localización subcelular, distribución tisular, especificidad de sustrato y función biológica (Ufer y Wang, 2011).

Se han documentado cinco tipos de SeGPx en humanos y son componentes destacados del sistema de defensa antioxidante. La enzima SeGPx1 es ubicua y de localización citosólica; SeGPx2 es específica del tracto gastrointestinal y actuaría como una barrera frente a hidroperóxidos provenientes de la dieta o del metabolismo de xenobióticos ingeridos; SeGPx3 se localiza en plasma por lo que se encuentra en todos los compartimientos extracelulares y se expresa en tejidos que se encuentran en contacto con fluidos corporales tales como el riñón y la interfase materno/fetal; SeGPx4 es la enzima encargada de

eliminar hidroperóxidos lipídicos que puedan formarse en las membranas biológicas; y SeGPx6 es específica de epitelio olfatorio y de tejidos embrionarios. Las SeGPx1-3 catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos, mientras que SeGPx4 es capaz de reducir directamente hidroperóxidos fosfolipídicos y de colesterol (Brigelius-Flohé, 1999; Lu y Holmgren, 2009).

1.5.1.2.1.3. Glutación reductasa

La enzima GR regula la homeostasis celular del GSH y permite mantener los niveles adecuados que aseguran la protección de las células frente a situaciones de estrés. Evolutivamente, GR se encuentra bien conservada en plantas, bacterias, hongos, levaduras y mamíferos, lo que sugiere que es una enzima importante para la supervivencia de los organismos en ambientes aeróbicos (Carlberg y Mannervick, 1985). La enzima GR cataliza la reducción de GSSG vía NADPH (Stephensen et al., 2002):



La actividad de GR se encuentra asociada a la de SeGPx formando un ciclo redox, ya que recicla el glutatión oxidado producido por la acción de SeGPx, nuevamente a GSH.

1.5.1.2.2. Sistema superóxido dismutasa-catalasa

1.5.1.2.2.1. Superóxido dismutasa

La enzima SOD destruye el anión superóxido al dismutarlo en peróxido de hidrógeno y oxígeno de acuerdo con la siguiente reacción (Matés, 2000):

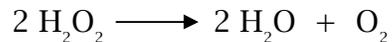


El peróxido de hidrógeno generado puede a su vez ser eliminado por acción de CAT o SeGPx.

Distintas isoenzimas de SOD han sido aisladas y caracterizadas a partir de una amplia variedad de organismos. La presencia de determinados metales en el sitio activo de la enzima determina la clase de SOD. Las enzimas Cu/Zn SOD contienen Cu(II) y Zn(II) en su sitio activo; las MnSOD contienen Mn(III); una tercera clase contiene Fe(III) (FeSOD) y una cuarta clase está constituida por las NiSOD que contienen Ni(II/III) en su sitio activo. Las enzimas Cu/Zn son de localización citosólica en células eucariotas; también se las encuentra en cloroplastos vegetales y en algunas células procariotas. Los procariotas también contienen MnSOD y las células eucariotas expresan esta proteína en mitocondrias. Las enzimas FeSOD se encuentran principalmente en procariotas, algas y cloroplastos de algunas plantas superiores. Las enzimas NiSOD han sido aisladas en el género *Streptomyces* (Scandalios, 2005).

1.5.1.2.2.2. Catalasa

La enzima CAT es una enzima ubicua que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno produciendo agua y oxígeno, de acuerdo con la siguiente reacción (Matés, 2000):



Junto con la SeGPx constituye la defensa antioxidante celular clave contra los peróxidos. Su actividad se ha visto modificada en diferentes organismos por la exposición a contaminantes ambientales (Bagnyukova et al., 2006; Costa et al., 2008; Feng et al., 2008; Ferrari et al., 2007, 2009; Kavitha y Rao, 2007, 2008, 2009).

1.5.2. Evolución del sistema antioxidante en *Rhinella arenarum*

En *Rhinella arenarum*, las enzimas SOD y CAT son activas en ovocitos no fertilizados y su actividad es elevada durante el desarrollo embrionario, lo que sugiere el control genético de estas enzimas. Ambas constituyen el principal sistema de protección frente a EROs en embriones tempranos. La protección antioxidante por GSH y enzimas dependientes de GSH se vuelve más importante cuando los embriones se encuentran expuestos a un mayor nivel de O₂. Esta respuesta es acompañada por un incremento en la actividad de SOD. La regulación ambiental de dichos sistemas enzimáticos coincide con el aumento del riesgo de exposición de los embriones a contaminantes luego de que eclosionan y de que el intercambio gaseoso a través de las branquias es completo. Por lo tanto, además de ser una respuesta fisiológica debida al incremento del nivel de oxigenación, la progresión de los sistemas antioxidantes en *R. arenarum* a lo largo de su desarrollo embrionario también constituye una preparación adecuada frente a un ambiente oxidante (Ferrari et al., 2008). El desarrollo del sistema antioxidante en *R. arenarum* es coincidente con el perfil reportado por Rizzo et al. (2007), quienes han documentado la evolución del metabolismo antioxidante de embriones de *X. laevis* durante sus primeros días de desarrollo embrionario.

1.6. Hipótesis de trabajo

En el Alto Valle del Río Negro y Neuquén la práctica de monocultivos, fundamentalmente de frutales de pepita y carozo, ha favorecido la aparición de numerosas plagas. El control de las mismas trae aparejado la aplicación masiva de plaguicidas, lo que constituye un peligro potencial para la biota de la región y hace que sea necesaria la evaluación de los efectos sobre los organismos a los cuales no estaban dirigidos. Teniendo en cuenta la importancia que revisten las poliaminas para el correcto desarrollo de los organismos y la importancia del sistema de defensa antioxidante en su protección frente a situaciones de estrés, se postula la siguiente hipótesis de trabajo:

El plaguicida organofosforado metilazinfos es capaz de alterar el normal desarrollo embrionario de *Rhinella arenarum* al afectar la vía de poliaminas y simultáneamente impactar en el sistema de defensa antioxidante, alterando el estado redox celular.

1.7. Objetivos

1.7.1. Objetivo general

Estudiar los mecanismos de acción de plaguicidas organofosforados sobre la vía de poliaminas como posible blanco en el desarrollo embrionario en anfibios.

1.7.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto de diferentes grados de exposición al OF metilazinfos sobre los niveles de poliaminas a lo largo del desarrollo embrionario de *Rhinella arenarum*.

- Analizar los niveles de actividad de ODC en la exposición al OF metilazinfos.

- Determinar si hay efectos de la exposición al OF metilazinfos sobre la regulación de la expresión de ODC durante del desarrollo embrionario de *Rhinella arenarum*.

- Analizar la participación o implicancia de factores de transcripción relacionados con proliferación celular en la regulación de ODC y en la exposición al OF metilazinfos.

- Determinar si la vía de acción OF - poliaminas - toxicidad celular puede relacionarse con estrés oxidativo.

- Aportar información orientada hacia el uso de estos blancos de acción de metilazinfos como biomarcadores en la evaluación de impacto ambiental y análisis de riesgo.

2. MATERIALES

Y

MÉTODOS

2.1. Materiales

2.1.1. Material biológico

Hembras y machos adultos de sapo de la especie *Rhinella arenarum* Hensel fueron recolectados en el lago Los Barreales, ubicado a 120 Km de distancia de la ciudad de Neuquén, ya que constituye una zona de referencia libre de aplicación de plaguicidas. Los animales fueron mantenidos en cautiverio a la intemperie en un pequeño recinto con pasto, hojarasca y agua hasta ser utilizados.

2.1.2. Material químico

El plaguicida organofosforado utilizado, metilazinfos (MA; 99% pureza) fue comprado a Chem Service (West Chester, PA, USA). El 5,5-ditio-2-bis-nitrobenzoato (DTNB), el glutatión reducido (GSH), la albúmina sérica bovina (BSA), 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB), la glutatión reductasa (GR, lote 78H74301, 173 U/mg), el yoduro de acetiltiocolina, el β -NADPH, la putrescina dihidrocloruro, la espermidina trihidrocloruro y la espermina tetrahidrocloruro fueron comprados a Sigma Co. (St. Louis, MO, USA). El glutatión oxidado (GSSG) fue comprado a ICN Biomedicals Inc (Aurora, OH, USA). La azida sódica fue comprada a Mallickrodt (Phillipsburg, NJ, USA). La L- 14 C-ornitina fue comprada a New England Nuclear. El líquido de centelleo Optiphase "Hisafe" 3 fue comprado a Perkin Elmer (Shelton, CT, USA). Todos los otros reactivos utilizados fueron de grado analítico.

2.2. Métodos

2.2.1. Obtención de embriones

Se realizaron tres experimentos independientes para cada parámetro a analizar, utilizando parejas distintas de sapos adultos. Las hembras fueron aclimatadas durante 24 hs a 20-23°C. Su ovulación se indujo por inyección intraperitoneal de 2500 UI de gonadotrofina coriónica

humana. Alrededor de 12 horas después de la inyección y cuando en la cloaca de las hembras era evidente la presencia de ovocitos (Figura 16 A), las mismas fueron demeduladas. Se procedió a la extracción quirúrgica de los ovocitos desde sus ovisacos (Figura 16 B). La fertilización *in vitro* de los ovocitos fue realizada pincelando a los mismos con un macerado de testículos de macho (Pisanó, 1957; Fonovich de Schroeder y Pechen de D'Angelo, 1991).

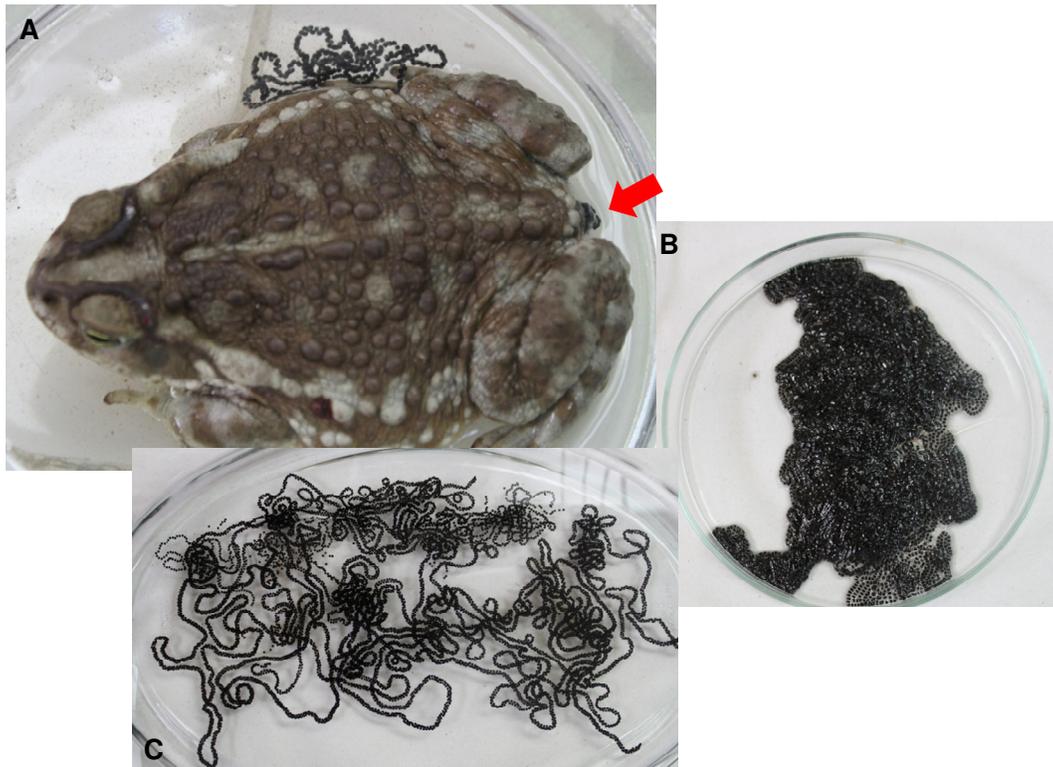


Figura 16: Ovocitos y embriones de *Rhinella arenarum*. A) Hembra a punto de poner sus huevos. La flecha roja señala la presencia de ovocitos en su cloaca. B) Ovocitos extraídos de la hembra en A). C) Ovocitos ya fertilizados.

2.2.2. Preparación y control de soluciones estándar de metilazinfos

Se prepararon soluciones estándar de MA de 18 g/L de concentración. El insecticida fue pesado y disuelto en un volumen apropiado de acetona calidad pro-análisis de residuos de plaguicidas. La concentración de las soluciones estándar fue controlada por cromatografía gaseosa con un detector fósforo-nitrógeno (GC-NPD).

2.2.3. Exposición a metilazinfos

Grupos que variaron entre 250 y 1000 embriones recientemente fertilizados, fueron transferidos a contenedores de vidrio con el volumen apropiado de medio Ringer para anfibios. La solución Ringer está compuesta por 0,65 g/L NaCl, 0,01 g/L KCl y 0,02 g/L CaCl₂. En todo momento se mantuvo una relación de 1 embrión/1 mL de solución Ringer. A los grupos *Control* se les agregó acetona al 0,3% de concentración final, utilizada como vehículo. Las concentraciones nominales utilizadas en los ensayos fueron de 0,5 mg/L, 2 mg/L y 9 mg/L MA (*Tratamientos*). Dichas concentraciones nominales se alcanzaron al agregar el volumen de solución estándar necesario de acuerdo con el volumen de cada bandeja. La exposición de los embriones a MA se realizó en medio Ringer utilizando como vehículo acetona al 0,3% final. Todos los tratamientos fueron realizados por duplicado en cada experimento. Se utilizó un esquema semi-estático de exposición, con renovación de las soluciones de trabajo cada 48 h. Los embriones fueron expuestos desde fertilización hasta que alcanzaron el estadio de opérculo completo (Del Conte y Sirlin, 1952). Los embriones fueron mantenidos en un régimen de 12 h de luz-12 h de oscuridad y a una temperatura controlada de 20 ± 2°C (Figura 17). Los embriones no fueron alimentados durante los ensayos. Tanto el material de laboratorio utilizado durante los experimentos como el medio líquido que contenía el plaguicida fueron adecuadamente descontaminados por

hidrólisis básica con NaOH comercial. A continuación, el material fue sonificado en agua con detergente alcalino (Extran[®], Merck).



Figura 17: Exposición de embriones de *Rhinella arenarum* a MA. Las exposiciones se realizaron en cuarto climatizado con control de fotoperiodo.

2.2.4. Toma de muestras y almacenamiento

El desarrollo embrionario fue evaluado en todos los tratamientos y los estadios fueron asignados de acuerdo con Del Conte y Sirlin (1952). Se monitoreó la mortalidad y los individuos muertos fueron removidos. El criterio de mortalidad utilizado fue la ausencia de latido cardíaco y/o de circulación sanguínea en branquias y aleta caudal en embriones tardíos que ya hubieran superado el estadio de latido cardíaco. En embriones en estadios previos, que no habían alcanzado dicho estadio, se consideraron muertos aquellos individuos que se detuvieran en su

desarrollo y no progresaran al estadio embrionario siguiente. Además se monitorearon las alteraciones morfológicas y se clasificaron de acuerdo con el Atlas de Anormalidades (Bantle et al., 1991). Para el análisis de ambos parámetros se utilizó una lupa estereoscópica con aumentos de 4X a 40X. Se realizó un registro fotográfico de las principales alteraciones encontradas.

Las muestras de embriones control y expuestos a MA fueron colectadas en tres estadios embrionarios diferentes: brote caudal (BC), boca abierta (BA) y opérculo completo (OC). Dichos estadios equivalen a 3, 7 y 10 días de desarrollo, respectivamente. Cada muestra consistió en un total de 50 embriones en estadio de BC o de 25 embriones en estadio de BA y OC. Los embriones muestreados fueron lavados cuatro veces con solución Ringer fría, colocados brevemente en hielo y guardados en freezer hasta ser procesados. Oportunamente se indica, para cada ensayo realizado, en qué solución buffer fueron guardadas las muestras y cómo se retomó el protocolo de procesamiento.

2.2.5. Determinaciones bioquímicas en embriones de *Rhinella arenarum*

2.2.5.1. Metabolismo de poliaminas

2.2.5.1.1. Actividad de ornitina decarboxilasa

La técnica de Gaines et al. (1989) fue utilizada como modelo a fin de determinar la actividad de ornitina decarboxilasa (ODC) en los embriones. A partir de ella se realizaron ligeras variaciones que optimizaron la medición de la actividad de ODC en *R. arenarum*. Las muestras recolectadas para determinar la actividad enzimática de ODC fueron guardadas en 1 mL de buffer de homogenado Hepes-NaOH 200 mM con 0,4 mM EDTA diNa, 0,04% Triton X-100, 0,05 mM piridoxal fosfato (PLP), 100 mM ditiotreitól (DTT) y cóctel de inhibidores de proteasas (1 µL cóctel/mL muestra; Sigma®). El cóctel está compuesto por aprotinina, leupeptina, bestatina, pepstatina, E-64 y AEBSF (4-(2-

aminoetil)bencensulfonil fluoruro). Hasta su procesamiento, las muestras fueron mantenidas a -20°C . Para ello, fueron homogeneizadas y centrifugadas a $20000 \times g$ durante 30 minutos a 4°C y se recolectó el sobrenadante que fue utilizado para la determinación de manera inmediata. Se ensayó un micrométodo para la medición de la actividad de ODC que requirió de $25 \mu\text{L}$ de sobrenadante y $25 \mu\text{L}$ de buffer de reacción. El buffer de reacción tuvo la misma composición que el buffer de homogenado con el agregado de ornitina 100 mM conteniendo $\text{L-}^{14}\text{C}$ -ornitina $2 \times 10^5 \text{ dpm/tubo}$. A fin de capturar el $^{14}\text{CO}_2$ liberado por la acción de ODC sobre la ornitina marcada, se prepararon papeles de filtro de $2 \times 2 \text{ cm}$ embebidos en $\text{KOH } 2 \text{ M}$. Dichos papeles se colocaron dentro de un microtubo de PCR que fue adherido a la tapa de un tubo plástico. A todos los tubos se les agregó $25 \mu\text{L}$ del buffer de reacción y se los colocó en baño termostático con agitación a una temperatura de 30°C . La reacción enzimática se inició por agregado de $25 \mu\text{L}$ de sobrenadante de muestras. Inmediatamente después de agregar la muestra, los tubos plásticos fueron cerrados herméticamente, de modo que el papel embebido en KOH quedó suspendido de la tapa del tubo plástico y adentro del microtubo de PCR. La reacción se llevó a cabo durante 60 minutos. A fin de detener la reacción enzimática de ODC, se inyectaron $50 \mu\text{L}$ de ácido perclórico $0,25 \text{ N}$ con jeringa a través de la tapa del tubo plástico, evitando su caída dentro del microtubo de PCR que contenía el papel embebido en KOH . Se selló la hendidura dejada por la jeringa con un sellador de secado rápido. Luego del cese de la reacción se dejó equilibrar el CO_2 liberado con el KOH durante otros 60 minutos, luego de los cuales los tubos fueron abiertos y los papeles de filtro embebidos en KOH fueron transferidos a viales de centelleo líquido conteniendo $0,5 \text{ mL}$ Triton X-100 1% y 5 mL de solución de centelleo líquido. Se realizaron controles de muestras suplantando los $25 \mu\text{L}$ de muestra por $25 \mu\text{L}$ de buffer de homogenado. Se realizaron controles negativos inactivando muestras con difluorometilornitina 100 mM (DFMO), inhibidor suicida de ODC. Todas las muestras fueron

cuantificadas en contador de centelleo líquido (Wallac WinSpectral 1414).

2.2.5.1.2. Actividad de diamino oxidasa

Se utilizó la técnica de peroxidasa de rabanito-aminoantipirina-ácido 3,5-diclorobencenosulfónico (Cona et al., 2006) debido a que características propias de la muestra biológica impidieron el uso de la técnica fluorométrica del ácido homovainílico. Esto se debe a la presencia de plaquetas vitelinas de color negro presentes en embriones de *R. arenarum*, que provocan un fuerte descenso de la intensidad de la fluorescencia. La aminoantipirina y el ácido 3,5-diclorobencenosulfónico forman un complejo coloreado en presencia de 2 moles de H₂O₂, formados en este caso por la oxidación de Put, el cual absorbe a 515 nm.

Las muestras fueron guardadas en 1 mL de buffer Hepes-NaOH 200 mM con 0,4 mM EDTA diNa, 0,04% Triton X-100, 0,05 mM PLP, 100 mM DTT y cóctel de inhibidores de proteasas (1 µL cóctel/mL muestra). La reacción se llevó a cabo utilizando aminoantipirina en una concentración final de 0,1 mM y ácido 3,5-diclorobencenosulfónico en una concentración final de 1 mM. Se utilizó buffer Tris HCl 50 mM pH 7,5, y putrescina 0,1 M como sustrato. Las muestras con los reactivos fueron incubadas a 37 °C durante 17 h en oscuridad. La absorbancia fue determinada a punto fijo por medición en un espectrofotómetro UV-Visible a 515 nm, leyendo cada muestra frente a su respectivo control negativo y descontando a todas ellas la absorbancia correspondiente al blanco de reactivos. Se utilizó un coeficiente de extinción molar de $2,6 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.2.5.1.3. Niveles de poliaminas libres

Se utilizó la técnica de Schenkel et al. (1996) para determinar los niveles endógenos de poliaminas en embriones de *R. arenarum*. Para ello, las

muestras fueron guardadas en 1 mL de buffer fosfato de potasio 143 mM pH 7,5 con 6,3 mM EDTA- Na_2 (buffer PiK) a -20°C . Luego de homogeneizarlas, se agregó a cada tubo ácido perclórico 1 N en cantidad suficiente para alcanzar una concentración final de 0,2 N y se mezcló por agitación. Las muestras se colocaron durante 60 minutos en baño de hielo y fueron centrifugadas a $3000 \times g$ durante 10 minutos, sin necesidad de refrigeración. Se recogió el sobrenadante, que fue utilizado para derivatizar las poliaminas presentes. Además de las muestras, se prepararon patrones de concentración conocida de cada una de las poliaminas (Put: 2 y 20 nmol/tubo; Spd: 0,5 y 5 nmol/tubo; Spm: 0,2 y 2 nmol/tubo). A continuación se prepararon tubos a los que se les agregaron en el siguiente orden 50 μL de muestra (o del patrón de concentración conocida), 30 μL de una solución saturada de Na_2CO_3 , 75 μL acetona y 75 μL de cloruro de dansilo (20 mg/mL) (Marcé et al., 1995). Las muestras se dejaron dansilar en oscuridad durante 16 h. La reacción de dansilación se frenó por agregado de prolina (0,1 g/mL) y se dejó reposar durante 2 h. Luego, se agregaron 300 μL de tolueno a cada tubo y se extrajo un volumen fijo e igual de la capa superior toluénica de todos los tubos. Dicho volumen fue secado bajo corriente de nitrógeno a fin de obtener las poliaminas dansiladas y secas. De esta manera los tubos pueden conservarse en freezer durante varios meses hasta ser utilizados para la determinación analítica. A fin de determinar la concentración de poliaminas, los derivados secos se volvieron a disolver en 200 μL de acetonitrilo antes de ser inyectados en un HPLC en fase reversa (Spectra-Physics Analytical Inc., Fremont, California) con columna C18 de 10 μm (Waters Corporation, Milford, MA), utilizando acetonitrilo puro como solvente isocrático para la separación de las poliaminas dansiladas. Las poliaminas libres fueron cuantificadas por fluorometría con una λ de excitación de 342 nm y una λ de emisión de 512 nm (Cochón et al., 2002) con un detector de fluorescencia Spectra SYSTEM FL-2000. Las muestras fueron eluidas con un gradiente lineal a partir de acetonitrilo 40% en agua hasta acetonitrilo 100% a una tasa de 1 mL/min.

2.2.5.2. Actividad de enzimas del sistema de defensa antioxidante

Las muestras para la determinación de la actividad de enzimas del sistema de defensa antioxidante fueron guardadas en 1 mL de buffer PiK como se indica en el punto anterior. Posteriormente a su homogeneización, fueron centrifugadas a 10000 x *g* durante 20 minutos a 4 °C y se recuperó el sobrenadante para proceder a su análisis.

2.2.5.2.1. Glutación reductasa

La actividad de la enzima GR (EC 1.6.4.2) fue determinada utilizando el buffer fosfato de potasio 143 mM pH 7,5 con 6,3 mM EDTA- Na_2 más el agregado de 0,21 mM NADPH y 0,5 mM GSSG, como sustratos y 0,1 mL de sobrenadante de muestra (modificado de Schaedle y Bassham, 1977) en un volumen final de 1 mL. Se monitoreó la cinética de oxidación de NADPH en forma continua a 340 nm de longitud de onda. Los valores de actividad fueron corregidos para la oxidación inespecífica de NADPH al omitir el agregado de GSSG en la mezcla de reacción. Los datos obtenidos fueron convertidos a mUI utilizando un coeficiente de extinción molar de 5,886 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ de acuerdo con las condiciones experimentales (Ferrari et al., 2008).

2.2.5.2.2. Glutación S-transferasa

A fin de determinar la actividad de la enzima GST (EC 2.5.1.18) se utilizaron como sustratos 0,5 mM CDNB disuelto en 1% v/v de acetonitrilo y 2,5 mM GSH, en un volumen final de 1 mL de buffer fosfato 100 mM pH 6,5. La línea de base (reacción no enzimática) fue monitoreada continuamente a 340 nm. A continuación se agregaron 30 μL de sobrenadante para la determinación de la actividad de GST (Habig et al., 1974; Anguiano et al., 2001). Los moles de CDNB conjugado fueron calculados utilizando un coeficiente de extinción molar de 9,6 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

2.2.5.2.3. Glutación peroxidasa Se-dependiente

La actividad de la enzima SeGPx (EC 1.11.1.9) fue determinada utilizando como sustrato 0,3 mM H₂O₂ en un volumen final de 1 mL de buffer fosfato 50 mM pH 7,4 con 1 mM de GSH como co-sustrato. Como sistema de reciclado se utilizó 0,5 UI/mL de GR más 0,21 mM NADPH. A fin de inhibir la enzima catalasa, se utilizó 1 mM de azida sódica. (Czarniewska et al., 2003). Se utilizaron 50 µL de sobrenadante para medir la actividad de SeGPx monitoreando de manera continua la oxidación de NADPH a 340 nm. Los valores obtenidos fueron corregidos para la oxidación inespecífica de NADPH por la reacción química y por otras enzimas, y fueron convertidos a mUI utilizando el mismo coeficiente de extinción molar que para GR.

2.2.5.2.4. Catalasa

La actividad de la enzima CAT (EC 1.11.1.6) fue determinada de acuerdo a la técnica de Regoli et al. (2005), con ligeras modificaciones (Ferrari et al., 2008). La reacción se realizó en 3 mL de buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7,0 con 25 mM H₂O₂ como sustrato. La absorbancia de la línea de base fue controlada a 240 nm para asegurar un valor inicial del sustrato igual a 1 unidad de absorbancia y para asegurar que el mismo se mantuviera estable. A fin de iniciar la reacción, 20 µL de sobrenadante fueron agregados a la mezcla de reacción y se registró la caída de absorbancia en forma continua exclusivamente en el tramo lineal inicial. Los datos obtenidos fueron transformados a UI utilizando un coeficiente de extinción molar de 40 M⁻¹ cm⁻¹.

2.2.5.2.5. Superóxido dismutasa

La actividad de la enzima SOD (EC 1.15.1.1) fue medida por competición de la oxidación de NADH entre SOD y el anión superóxido, monitoreando el consumo de NADH a 340 nm (Paoletti et al., 1985). La reacción se realizó en un volumen final de 1,065 mL de buffer

trietanolamina (TEA) 100 mM–dietanolamina (DEA) 100 mM pH 7,4, con 0,28 mM NADH, 1,17 mM MnCl₂, 2,35 mM EDTA-Na₂ y 0,95 mM β-mercaptoetanol para iniciar la generación química de anión superóxido. Se realizó una competencia entre el máximo de oxidación de NADH (*control*) por el anión superóxido, y distintos volúmenes de sobrenadante de 20000 x *g* (10, 20, 40 y 60 μL) los cuales provocan una caída hiperbólica de su concentración por acción de la actividad de SOD en cada muestra (Ferrari et al., 2008). Una unidad de actividad de SOD está definida como la cantidad de enzima que inhibe el 50% de la oxidación química de NADH producida por el anión superóxido. Las unidades de SOD fueron calculadas ajustando la siguiente ecuación a los datos de las muestras:

$$v = Vmax / 1 + (Vol/K)$$

donde *v* es la velocidad de oxidación de NADH que se obtiene en función del volumen de muestra *Vol* utilizado en la determinación, expresado en μL. *Vmax* y *K* son parámetros estimados por regresión no lineal que corresponden al promedio de velocidad máxima de oxidación de NADH (*control*) y al volumen de la muestra en μL que contiene 1 Unidad de SOD, respectivamente.

2.2.5.3. Actividad de colinesterasa, blanco primario de acción de los organofosforados

La actividad de colinesterasa (ChE) fue determinada de acuerdo con el método de Ellmann et al. (1961). Las muestras fueron guardadas en 1 mL de buffer fosfato de sodio 100 mM pH 8 a -20 °C hasta su procesamiento, homogeneizadas y centrifugadas a 10000 x *g* durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido fue utilizado inmediatamente para la determinación enzimática. La reacción se desarrolló en 1,03 mL de buffer fosfato de sodio 100 mM pH 8,0 con 0,2 mM de DTNB y 0,75 mM de ioduro de acetiltiocolina como sustrato. Se agregó 0,1 mL de sobrenadante de 10000 x *g* para iniciar la reacción enzimática. La

actividad de ChE se monitoreó continuamente a 412 nm y la actividad específica se expresó como mUI mg proteína⁻¹ utilizando un coeficiente de extinción molar de 13,6 mM⁻¹ cm⁻¹. A la misma se le descontó la línea de base de la reacción química en ausencia de muestra.

2.2.5.4. Contenido de glutatión reducido

Para la determinación del contenido de GSH, las muestras fueron guardadas en ácido tricloroacético al 5% en las proporciones indicadas anteriormente y almacenadas a -20 °C hasta su procesamiento. Las muestras fueron homogeneizadas y centrifugadas a 10000 x *g* durante 10 minutos y el contenido de GSH fue medido inmediatamente como tioles ácido-solubles por triplicado en 0,1 mL de sobrenadante, utilizando 1 mL de DTNB 1,5 mM en buffer fosfato de sodio 0,25 M pH 8,0 (Venturino et al., 2001; Ferrari et al., 2008). La mezcla fue incubada durante 10 minutos y se midió la absorbancia a 412 nm. Los tioles ácido-solubles fueron cuantificados utilizando una curva de calibración con GSH puro como estándar.

2.2.5.5. Determinación de la concentración de proteínas totales

El contenido proteico de las muestras se determinó de acuerdo con la técnica de Lowry et al. (1951), utilizando albúmina sérica bovina como estándar.

2.2.6. Estudios histológicos e inmunohistoquímicos

2.2.6.1. Preparación de muestras

Se tomaron 5 embriones de *R. arenarum* control y expuestos a 9 mg/L MA y se fijaron embebiendo los mismos completamente en reactivo de Bouin durante 24 hrs a 4°C (solución acuosa saturada de ácido pícrico 70%, formaldehído 25%, ácido acético glacial 5%). A continuación se

enjuagó el fijador con etanol 70% y se mantuvo a los embriones en dicha solución hasta el procesamiento de las muestras. El protocolo se retomó deshidratando a los embriones en concentraciones crecientes de etanol (70°, 90°, 95° y 100°) durante 10 minutos en cada uno para luego sumergirlos otros 10 minutos en xilol:etanol (1:1). Las muestras deshidratadas se embebieron en xilol puro (10 minutos) y en xilol-parafina (1:1) a 25°C por 25 minutos. Finalmente se pasaron 3 veces por parafina a 58°C por 25 minutos para formar el taco de inclusión. Se utilizó una mezcla 50/50 de Histoplast /Paraplast (Biopack) para realizar las inclusiones. Se realizaron cortes en el plano frontal (longitudinal) de los embriones, de 7 µm en un micrótomo, dejándolos en agua 10 a 15 segundos a 42-46°C para luego montarlos en portaobjetos (Frosted HiFix, TNT). De esta manera se obtuvieron los preparados que posteriormente se utilizaron en el análisis histológico y en estudios inmunohistoquímicos. Para retomar el protocolo en las técnicas histológicas e inmunohistoquímicas se procedió a la rehidratación de los cortes. Los portaobjetos se sumergieron en xilol 100% dos veces durante 10 minutos y luego se sumergieron en una serie de etanol 100%, 95%, 90% y 70%, durante 5 minutos cada uno. Finalmente los preparados rehidratados se mantuvieron en buffer TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM) (pH 7,5) hasta su utilización.

2.2.6.2. Análisis inmunohistoquímico de ornitina decarboxilasa

Se analizó la presencia y distribución embrionaria de la proteína ODC por métodos inmunohistoquímicos descritos para larvas de *R. arenarum* por Yovanovich et al. (2009). Los cortes histológicos rehidratados y desparafinizados fueron inicialmente sometidos a un proceso de desenmascaramiento de antígenos en buffer citrato de sodio 10 mM pH 6,0 durante 10 minutos a sub-ebullición. A continuación los portaobjetos fueron lavados con TBS-Tween (TBS-T) y bloqueados con una solución de BSA 1%/gelatina 0,5% durante 45 minutos. Luego, los

portaobjetos fueron incubados con una dilución 1:100 del anticuerpo primario anti-ODC en suero de cabra 2%. El anticuerpo primario utilizado fue hecho en conejo contra la ODC humana (Santa Cruz Biotechnology; ODC (H-71) sc-33539). La incubación con dicho anticuerpo se realizó durante 16 h a 4 °C en cámara húmeda. Transcurrido dicho periodo de tiempo, los portaobjetos fueron colocados a temperatura ambiente y fueron lavados 3 veces durante 5 minutos en TBS-T. A continuación, los portaobjetos fueron incubados con el anticuerpo secundario anti-conejo biotinilado durante 1 h a temperatura ambiente con agitación y luego fueron lavados nuevamente 3 veces durante 5 minutos con TBS-T. La señal fue amplificada por incubación con estreptavidina-peroxidasa de rábano (ZuMax™, ZZMED) diluida 1:500 en TBS-T durante 45 minutos con agitación a temperatura ambiente. Los portaobjetos fueron lavados a continuación 3 veces durante 5 minutos con TBS-T. El revelado de los cortes se hizo mezclando una gota del cromógeno diaminobencidina (DAB) (Dako) con 1 mL del buffer provisto por el fabricante, bajo microscopio. La reacción de desarrollo de color marrón se detuvo por lavado bajo agua corriente. En los controles negativos se reemplazó el anticuerpo primario por suero de cabra. Los cortes histológicos fueron deshidratados por pasaje sucesivo a través de soluciones de etanol en concentraciones crecientes y xilol. Los portaobjetos fueron montados definitivamente con bálsamo de Canadá (Biopack). La visualización de los cortes se realizó bajo microscopio y se tomaron fotografías con un aumento de 10X.

2.2.6.3. Tinción con hematoxilina-eosina de cortes histológicos

La tinción con hematoxilina-eosina se realizó a fin de comparar la histología de embriones en estadio de OC no expuestos y expuestos a 9 mg/L MA. Los cortes histológicos fueron rehidratados y desparafinizados como se indicó en la sección 2.2.6.1. Los portaobjetos que contenían los cortes histológicos fueron sumergidos sucesivamente

en una solución de hematoxilina pura en solución modificada según Gill III (Merck™) durante 2 minutos, enjuagados en agua de canilla y sumergidos en agua destilada. A continuación los portaobjetos fueron sumergidos en eosina alcohólica 0,25% durante 30 segundos, sumergidos en etanol 70% y nuevamente enjuagados bajo agua corriente. Los cortes teñidos fueron posteriormente deshidratados al sumergirlos en series crecientes de alcohol etílico y xilol. Los portaobjetos fueron montados definitivamente utilizando bálsamo de Canadá (Biopack). La visualización de los cortes se realizó bajo microscopio y se tomaron fotografías con un aumento de 4X.

2.2.7. Determinaciones moleculares

2.2.7.1. Extracción de proteínas nucleares

Los embriones destinados a extracción de proteínas nucleares fueron guardados en buffer de homogenato (BH), compuesto por Hepes 10 mM pH 7,4, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM, DTT 0,5 mM y cóctel de inhibidores de proteasas (1 µL cóctel/mL BH). Las muestras fueron homogeneizadas y centrifugadas a 1000 x *g* durante 10 minutos a 4 °C a fin de precipitar el núcleo celular. El sobrenadante obtenido se mezcló con buffer de siembra (ver más adelante), mientras que el precipitado que contenía los núcleos fue sometido a sucesivos lavados con BH. Para ello se agitaron en vortex los tubos con BH y fueron nuevamente centrifugados a 1000 x *g* durante 10 minutos a 4 °C. Los pasos de lavado fueron repetidos tres veces. El sobrenadante obtenido a partir de los lavados fue descartado, y el precipitado resultante del tercer lavado fue resuspendido, en la mitad del volumen original, en buffer de extracción (BE). El BE está compuesto por Hepes 20 mM pH 7,4, glicerol 25%, NaCl 0,42 M, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 0,2 mM, DTT 0,5 mM y cóctel de inhibidores de proteasas (1 µL cóctel/mL BE). El precipitado fue homogeneizado nuevamente y se mantuvo 30 minutos en baño de hielo sin agitación, seguido de otros 30 minutos en baño de hielo con agitación. A continuación, se centrifugó a 16000 x *g* durante 30 minutos a 4 °C. El precipitado fue descartado y el

sobrenadante obtenido, correspondiente al extracto de proteínas nucleares, fue procesado a fin de realizar la separación electroforética de proteínas por SDS-PAGE. Para ello, se utilizó buffer de siembra 6X (buffer de “cracking”), compuesto por Tris HCl 0,35 M pH 6,8, glicerol 0,3%, SDS 10%, 17 μ L de β -mercaptoetanol por cada 83 μ L de solución buffer y azul de bromofenol. Se colocaron 5 partes de muestra y una parte de buffer de “cracking” 6X (100 μ L de muestra + 20 μ L de buffer de “cracking” 6X).

2.2.7.2. Análisis de la expresión de proteínas por SDS-PAGE y Western Blot

Se prepararon geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10% de acuerdo con la técnica de Laemmli (1970). Se utilizaron equipos Mini PROTEAN® y Tetra Cell (Bio-Rad®) de geles verticales para realizar la separación electroforética y la transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa. La relación de acrilamida:bisacrilamida 30:0,8% p/v se mantuvo constante en ambos geles. La composición final del gel de separación al 10% fue: Tris HCl 365 mM pH 8,3 y SDS 0,1% p/v y cantidad necesaria de acril/bisacril-amida (30:0,8% p/v). La composición final del gel de concentración al 5% fue: Tris HCl 393 mM pH 6,8 y SDS 0,1% p/v y cantidad necesaria de acril/bisacril-amida (30:0,8% p/v).

Se prepararon geles de 1,5 mm de espesor y se sembraron 80 μ g de proteína en cada calle. Como estándar de peso molecular se utilizó el producto *ColorBurst™ Electrophoresis Marker* de Sigma®, que abarca un intervalo de pesos moleculares de entre 8 y 220 kDa. La electroforesis de proteínas se realizó a un voltaje constante de 200 voltios durante aproximadamente 30 minutos. El buffer de corrida utilizado fue Tris HCl 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1 %. Para la transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa de 0,2 μ m de tamaño de poro (Bio-Rad®) se utilizó buffer de transferencia, compuesto por buffer de corrida con el agregado de 20% de metanol. La transferencia fue realizada a una intensidad de corriente constante de 400 mA durante 80

minutos. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie a fin de determinar la calidad de la transferencia y las membranas de nitrocelulosa fueron teñidas transitoriamente con rojo Ponceau S para verificar que todas las calles hubieran sido sembradas con igual cantidad de proteínas. La visualización del marcador de peso molecular en las membranas de nitrocelulosa también se utilizó como parámetro de calidad de la transferencia.

Las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas con TBS-leche en polvo al 3% durante 90 minutos en agitación a temperatura ambiente. El TBS está compuesto por Tris HCl 16,67 mM pH 7,0 y NaCl 66,67 mM. La leche utilizada fue leche en polvo descremada Svelty®. A continuación, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente (desarrollado en conejo) a una concentración de 1:250 en TBS durante 16 horas a 4 °C. Las membranas fueron luego colocadas en agitación a temperatura ambiente durante 60 minutos. Se realizaron 3 lavados con TBS (10, 10 y 5 minutos). Se realizó un lavado adicional de 10 minutos con TBS-leche 3% antes de incubar con el anticuerpo secundario policlonal anti-conejo 1:5000 (anti-rabbit IgG hecho en cabra, Sigma®), preparado en TBS, durante 120 minutos en agitación a temperatura ambiente. Luego se realizaron 4 lavados con TBS de 5, 5, 10 y 15 minutos en agitación.

El revelado de las membranas se realizó utilizando la técnica de quimioluminiscencia. La solución A de revelado consistió en luminol 2,5 mM más ácido cumárico 0,396 mM en 5 mL de buffer Tris HCl 100 mM pH 8,6. La solución B de revelado consistió en 5 mL de buffer Tris HCl 100 mM pH 8,6 con 6 µL de H₂O₂ 30 N. Para el revelado se mezclaron, en cuarto oscuro, ambas soluciones y se colocaron inmediatamente sobre las membranas de nitrocelulosa durante 1 minuto. A continuación las membranas fueron colocadas dentro del cassette de revelado junto a una placa radiográfica, separadas entre sí por un folio transparente, durante 30 minutos. Las placas fueron reveladas en cuarto oscuro utilizando las soluciones de revelado y fijado correspondientes (Fujifilm®).

2.2.7.3. Puesta a punto del análisis de la expresión de las proteínas ODC y c-Fos. Anticuerpos primarios utilizados.

Se analizó la interacción entre el anticuerpo anti-ODC y las proteínas de *R. arenarum* mediante dot blot. El anticuerpo primario policlonal que se utilizó estaba hecho en conejo frente a la porción comprendida entre los aminoácidos 391–461 de la ODC humana (ODC H-71 sc-33539, Santa Cruz Biotechnology®). El anticuerpo primario reaccionó correctamente con el anticuerpo secundario y su señal fue detectada en el control realizado por dot-blot (no mostrado). Sin embargo, la señal no fue detectada al incubar las proteínas extraídas de *R. arenarum* con el anticuerpo primario y el anticuerpo secundario correspondiente. Pese a la buena calidad de las electroforesis y el Western Blot (Figura 18), no fue posible revelar la presencia de ODC mediante el uso de este anticuerpo. Probablemente el anticuerpo primario policlonal utilizado no reconozca la forma desnaturalizada de ODC de *R. arenarum*, si bien funcionó correctamente en técnicas inmunohistoquímicas.

La proteína c-Fos fue detectada correctamente por Western Blot utilizando un anticuerpo policlonal hecho en conejo frente a una porción de la proteína humana (c-Fos K-25, sc-253 de Santa Cruz Biotechnology®).

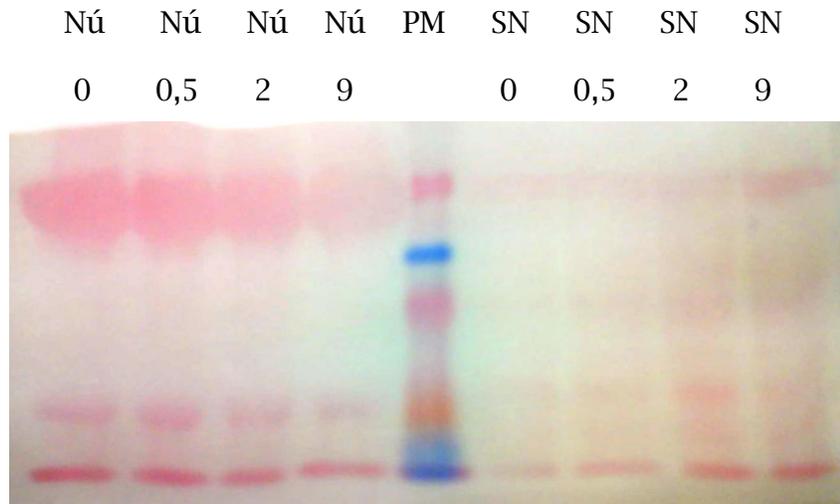


Figura 18: Fotografía representativa de una membrana de nitrocelulosa teñida con rojo Ponceau S. Se muestra la carga de proteínas en cada calle y la eficiente transferencia de proteínas. Nú: extracto nuclear; SN: sobrenadante 1000 x *g*; PM: marcador de peso molecular.

2.2.7.4. Extracción de ARN

Las muestras destinadas a extracción de ARN fueron guardadas en TRIzol®, manteniendo una relación de 1 mL de TRIzol®/100 mg de tejido. Las muestras fueron homogeneizadas con homogeneizador vidrio-teflón bajo campana y sobre hielo. Luego se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Se agregaron 200 µL de cloroformo por cada mL de TRIzol® y se agitaron los tubos vigorosamente durante 15 segundos. Nuevamente, las muestras se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los tubos fueron centrifugados a 12000 x *g* durante 4 minutos a 4 °C. La fase superior acuosa incolora conteniendo el ARN, fue transferida a un tubo nuevo. El ARN fue precipitado por agregado de 600 µL de isopropanol por mL de TRIzol® y fue mezclado por suave inversión. Las muestras fueron incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, fueron centrifugadas a 12000 x *g* durante 15 minutos

a 4 °C y se obtuvo un precipitado gelatinoso y blancuzco, correspondiente al ARN. Se descartó el isopropanol cuidadosamente por inversión y se lavó el pellet con 1 mL de etanol 75% por mL de TRIzol®. Las muestras fueron agitadas en vórtex y nuevamente centrifugadas a 12000 x *g* durante 10 minutos a 4 °C. Se descartó el etanol por inversión y los tubos fueron colocados boca abajo abiertos a fin de eliminar el exceso de etanol. El ARN fue disuelto en 100 µl de agua libre de RNAsas.

A fin de determinar la pureza del ARN extraído se realizó una dilución de 5 µL de ARN en 995 µL de agua estéril y se leyó la absorbancia a 260 nm (ARN) y 280 nm (proteínas y ADN). La relación 260/280 debe variar entre 1,6 y 1,9 para que pueda considerarse que el ARN extraído tiene suficiente pureza. De acuerdo a los valores obtenidos, pudo inferirse una buena extracción de ARN

La concentración de ARN se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$[\text{ARN}] (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = (\text{Abs } 260 \times 33 \times \text{factor de dilución})/1000$$

El ARN fue alícuotado de a 5 µg y conservado a -20 °C, con el agregado de 2 volúmenes de etanol absoluto, hasta su utilización.

2.2.7.5. Verificación de la integridad del ARN extraído

El protocolo se retomó centrifugando una alícuota de ARN a 12000 x *g* durante 10 minutos a 4 °C. Se descartó el etanol absoluto y se colocó el tubo boca abajo sobre papel absorbente para eliminar el exceso de alcohol. El ARN fue disuelto en 9 µL de agua estéril y se le agregó 1 µl de buffer de siembra 10X, compuesto por 50% glicerol, 0,25% azul de bromofenol y 0,25% xileno de cianol FF en buffer TAE (Tris HCl 13,3 mM pH 7,6, 6,67 mM ácido acético glacial, 0,33 mM EDTA).

Se preparó un gel de agarosa al 0,7% en buffer TAE. Las muestras fueron sembradas y sometidas a electroforesis en una cuba horizontal (multiSub Horizontal Gel System, Cleaver Scientific), utilizando buffer TAE como buffer de corrida. La electroforesis se realizó a un voltaje

constante de 100 voltios hasta que el frente de corrida alcanzó el final del gel. A continuación, el gel fue sumergido durante 30 minutos en una solución de bromuro de etidio 0,5 mg/mL y enjuagado con agua destilada. La visualización se llevó a cabo en un transiluminador UV (MaestroGen® Slider Imager). EL ARN se consideró íntegro al visualizarse las bandas correspondientes a los ARN ribosomales 18S y 28S (Figura 19).

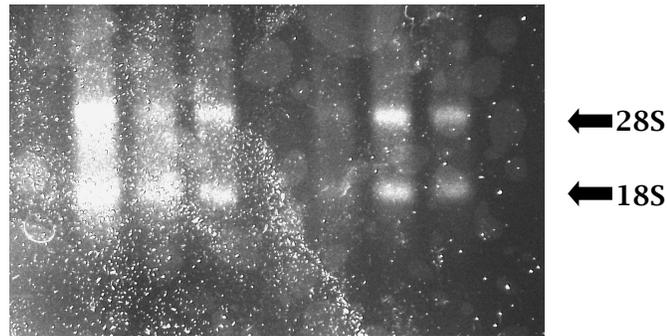


Figura 19: Fotografía representativa de un gel de integridad de ARN no desnaturalizante. Se visualizan las bandas del ARN ribosomal 18S y 28S.

2.2.7.6. Retrotranscripción (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar *odc*.

Una vez verificada la integridad del ARN extraído, se procedió a su transformación en ADN copia (ADNc) por reacción de retrotranscripción. Para ello, se retomó el protocolo centrifugando una alícuota de ARN a 12000 x *g* durante 10 minutos a 4 °C. Se descartó el etanol por inversión y los tubos se colocaron boca abajo sobre papel absorbente a fin de eliminar el exceso de alcohol. La alícuota de 5 µg de ARN fue disuelta en 9 µL de agua destilada estéril y se mantuvo en hielo. A continuación se preparó, siempre trabajando sobre hielo, la mezcla de reacción para la retrotranscripción de acuerdo con la Tabla 2 para $n+2$ tubos (n = número de muestras a retrotranscribir):

Tabla 2: Reactivos de la mezcla de reacción para la retrotranscripción.

Reactivo	1 tubo (µL)
Buffer MMLV RT 5X	7,464
dNTPs 20 mM	0,5
DTT 0,1 M	2
Hexámeros 11 pmol/µL	0,161
Oligo dT 4,5 pmol/µl	0,225
MMLV RT	0,4
RNAsin 40 U/µl	0,25
VOLUMEN FINAL	11

Se rotularon tubos estériles para PCR de 0,2 mL, se colocaron en hielo y en cada uno de ellos se distribuyeron 11 µL de la mezcla de reacción. A continuación se agregaron los 9 µL de ARN disuelto a cada uno de dichos tubos, totalizando un volumen final de reacción de 20 µL. Los tubos fueron colocados en un termociclador con el siguiente programa: 42°C, 60 minutos; 95 °C, 5 minutos; 4 °C.

El ADN copia proveniente de la retrotranscripción fue diluido con 10 µL de agua destilada estéril, de manera que los 5 µg de ADNc fueron disueltos en 30 µL de volumen final. Para cada reacción de PCR se utilizaron 10 µL de ADNc (o 1,7 µg de ADNc). Trabajando sobre hielo, se preparó la mezcla de reacción para la PCR de acuerdo con la Tabla 3 para $n+2$ tubos (n = número de muestras a amplificar):

Tabla 3: Reactivos de la mezcla de reacción para la PCR.

Reactivo	1 tubo (µL)
Green Buffer Go Taq® 5X	4
dNTPs 20 mM	0,5
Cebador Sentido (Forward) 10 µM	0,5
Cebador Antisentido (Reverse) 10 µM	0,5
Taq Polimerasa 5 U/µL	0,2
H ₂ O destilada estéril	9,3
VOLUMEN FINAL	15

Se rotularon tubos estériles para PCR de 0,2 mL, se colocaron en hielo y en cada uno de ellos se distribuyeron 15 µL de la mezcla de reacción. A continuación se agregaron los 10 µL de ADNc a cada uno de dichos tubos, totalizando un volumen final de reacción de 25 µL. Los tubos fueron colocados en un termociclador con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94 °C, 5 minutos; 29 ciclos de: 94 °C, 45 segundos; 60 °C, 60 segundos; 72 °C, 90 segundos; elongación final a 72 °C, 5 minutos; refrigeración a 4 °C (Cao et al., 2001).

A fin de amplificar los genes *odc1* y *odc2* se utilizaron los siguientes cebadores, construidos a partir de las secuencias correspondientes en *Xenopus laevis* (Cao et al., 2001) (Tabla 4):

Tabla 4: Secuencias de los cebadores utilizados en las reacciones de PCR y longitud teórica del producto amplificado en pares de bases.

Cebadores	Sentido 5'-3'	Antisentido 5'-3'	Long. prod. (pb)
XODC1	GGGCAAAGGAGCTTAAT GTG	CATTGGCAGCATCTTCT TCA	386
XODC2	AGCTGGGAGCTGGATTTG ACTG	GCGTGCATCAGAAATAGCC TGA	404

Los cebadores mencionados hibridan en las siguientes secuencias del ARNm de *Xenopus laevis*:

XODC 1 1973 pb ARNm lineal

Secuencia de Referencia en el NCBI: NM_001086698.1

SENTIDO**ANTI SENTIDO**

```

1   acggatagct gttaggagct ttgtcagagg aagtcttttt tttttttcgc ctggttattt
61  gtggcctcga tgggtacaga tttcgtaaat gctttttaag aatacaaaaca gcagaacagc
121 gcagagtggc tccattgaga gcgtaggact tgtcctctac ttaccaggct tctatttcac
181 cggcgagcct ccttgggagt gagactgaag ctttctttat agttatcccc atctcttact
241 tgtccatttt tttgcataag ttgcattttg aaaccgaata attgcaaaaa tgaacagctt
301 cagcaatgac gactttgact tcagcttcct ggaggaaggc ttctctgcca gggatattgt
361 ggagcaaaaag atcaatgaag tgtccttata tgacgacaaa gatgcctttt atgttgctga
421 tcttggcgac attgtgaaaa agcatgtgcg ttggtttaaa gcgctcccc gtgtcactcc
481 gttttatgcc gtaaaatgca acgatggcaa agccattgtg aagactctct ccattcttgg
541 tgccggcttt gactgtgcca gtaagactga aatccaacta gtacagagta ttggagtttc
601 ccccgagcgg attatctatg caaacccgtg taaacaagtt tcccagatca aatacgcagc
661 tagctgtggg gtggagaaga tgacttttga tagtgaagtt gaattgatga aagtggcaag
721 gaatcaccog aatgcaaagc ttgttctacg catagcaact gatgactcaa aagcagtctg
781 ccgcctcagt gtgaaatttg gtgccacct taaaacaagc aggctgcttc tggagcgggc
841 aaaggagctt aatgtggata taattggtgt gagtttccat gttggcagtg gctgcactga
901 tccacagact tatgtacaag ctgtctcaga tgcacgatgt gtctttgaca tgggggctga
961 gcttggcttt aacatgcata tacttgatat tgggtggtgga ttccctgggt cagaggatgt
1021 gaaactgaag tttgaagaga tcacatctgt gataaaccca gccctggata aatacttccc
1081 agcagattct ggcgttaaaa tcattgcaga gcctgggaga tactatgttg cctcatcttt
1141 caccctggca gttaatatca ttgccaagaa agttatggtg aatgagcaaa gtggatctga
1201 tga tgaagaa gatgctgcca atgacaaaac tctgatgtac tacgtcaatg atggagtga
1261 tggatctttc aactgcatct tgtttgatca tgcacatgtc aagccagttc taacaaagaa
1321 acccaaacca gatgagaagt tctactcgag cagcatttgg ggaccaacgt gtgatgggct
1381 ggatcgatc gtagaaaggt ttgagctgcc ggagctgcaa gttggagact ggatgttgtt
1441 tgaaaacatg ggtgcctaca ctgttctgctc agcctcgaca ttcaatggat ttcagagacc
1501 aaccctttat tatgttatgt caagaccaca ctggcaactg atgcatgata ttaaagaaca
1561 tggcattctc cctgaagtac cagatctgag tgcactccat gtatcctgtg ctcaggagag
1621 cggaatggaa cttgcacctg ctgtctgtac tgetgccagc atcaatgat aggcttatta
1681 aaaaaactct gtagttaaac tgcaacttta gccttgggac cattatttaa aaatttaact
1741 attttcattt atttccaag cctgtatttg tcagcattaa tgcaaaaaaa tggatgactg
1801 cgagatggg tccacatatct gtgttcctat ggaaactttt tttttttttt ctaatggttt
1861 ttgaagtata ttgaagatgc taattattta ctcaagcatt thtagcttgt gttttgccag
1921 tcagcatctt cattgaccag ttttacaat aaaagttcaa aaaaaaaaaa aaa

```

XODC2 1842 pb ARNm lineal

GenBank: AF217544.2

SENTIDO

ANTISENTIDO

```

1  gttagtctga gtaccagga cggagacact tccacatttc tattaatggg caacggccgt
61  gtcaatgcat gttaagaaag cgataaacgc cagaagcggc gacttcactc acagcccggg
121 gtggtgcaaa atctccgagt tcaactgcgga gcctccctgg ttgctctgat aaaagcttgt
181 tgcgtactta aaaacaatct tggtagaagt gcttaaaatc ccagatttca aaatgcaagg
241 gtatatccag gagtcagatt ttaacttggg tgaagaaggc tttttggcca gagacttgat
301 ggaggaaatc attaatgaag tctcacagac tgaggatcgt gatgcctttt ttgtggctga
361 tctaggggat gtggaagga aacatctccg ttttctgaaa gccttgctc gtgtgaagcc
421 tttctatgca gtgaagtgta acagcagcaa aggagtggg aagatcttgg ctgagctggg
481 agctggattt gactgcgcca gcaagacaga gattgagcta gtccaggacg ttgggtgtggc
541 accagaacgt atcatctatg ccaacccatg caagcagatt tcccagatta agtatgcagc
601 taagaatggt gtccaaatga tgacgtttga caatgaagta gagctttcca aggtgtcaag
661 aagccatccc aatgcaagaa tggttctgcy tatagcaacg gatgactcta aatcctctgc
721 tCGTTTaaGT gtgaaatttg gCGCCCCctt aaaatcctgc agacgcttat tggaaatggc
781 taaaaacctc agtgtggatg tcattgggtg tagtttccac gttggtagtg gatgactga
841 ttccaaggcc tatactcagg ctatttctga tgcacgcttg gtttttgaaa tggcatctga
901 gtttgggtac aaaatgtggc tgctggatat tgggtggggc ttccctggaa cagaggattc
961 caaaattaga tttgaggaga ttgcaggtgt aataaatcca gactggaca tgtatttccc
1021 tgagagctct gacgtgcaaa ttatcgctga accaggaaga tattacgtag catctgcttt
1081 ttcaattggc gttaacgtta ttgctaagaa agaagtggaa cactctgtat ctgatgatga
1141 ggaaaatgag tccagcaaaa gcatcatgta ttatgttaat gatggagtgt atggatcctt
1201 taattgcttg gtctttgatc atgctcatcc aaaaccaatc ctccacaaga aaccttctcc
1261 agatcagcca ttatacacca gtagcctttg gggaccacg tgcgatggct tagatcagat
1321 tgcagagcgc gttcagctgc ctgagcttca tgttggcgac tggcttttgt ttgagaatat
1381 ggggtgcatac accatagcag catcttccaa tttcaatggt ttccagcagt ctccagtaca
1441 ttacgcatg ccccgctgctg cttggaaagc tgttcagttg ctgcagagag gattacagca
1501 aaccgaggag aaagaaaatg tgtgcacccc tatgtcttgt ggctgggaga tttctgattc
1561 cttgtgcttc actcgtacct ttgcagccac cagcatcatt tgaattcctg catcatggga
1621 gtgacatgca aatgcttgtc ttagcgtagc ttgtctcttg tttttaagta tgcaacataa
1681 agcattttgta cttcctgga tttgtctctg tatcatctgg gagcaattta tgcataagaa
1741 acggatattt ttatcattaa ttgcatgcag ccaccgacat caattgattt tcattaaatt
1801 ttttttcatt tgaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa

```

No se obtuvieron resultados positivos a partir de la RT-PCR de *odc*, a pesar de que el ARN extraído se encontraba íntegro.

2.2.8. Análisis de datos

Se realizaron tres experimentos independientes para cada una de las determinaciones indicadas en los puntos anteriores. Dentro de cada uno, los diferentes tratamientos se realizaron por duplicado. Se analizaron diferencias entre experimentos para la respuesta de cada parámetro a fin de verificar si los valores eran comparables, o bien si era necesario expresar los mismos como % del valor promedio control. Se calculó la Media \pm Error Estándar de la Media (ESM) para cada estadio embrionario y para cada actividad enzimática (n=6). Las diferencias entre tratamientos fueron analizadas por ANOVA factorial y/o de una vía para cada parámetro medido en los diferentes estadios embrionarios. Se utilizó el Test de Fisher de Menor Diferencia Significativa (LSD; *least significant difference*) como análisis *post hoc* a fin de evaluar las diferencias estadísticas entre embriones control y embriones expuestos a MA en cada estadio de desarrollo y entre embriones control en diferentes estadios de desarrollo.

Para analizar las diferencias estadísticas de porcentajes de mortalidad y malformaciones entre embriones control y expuestos a MA se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

El análisis de las diferencias en la expresión de proteínas por Western Blot entre embriones control y expuestos a MA se realizó con el programa Image J (National Institutes of Health, USA).

La influencia de los diferentes parámetros bioquímicos y morfológicos en la variabilidad de respuesta frente a los tratamientos con MA, y las posibles correlaciones entre ellos, fueron evaluadas por Análisis de Componentes Principales (ACP), utilizando el programa NTSYS.

3. RESULTADOS

3.1. Efectos de metilazinfos a nivel de la ontogénesis de *Rhinella arenarum*

3.1.1. Mortalidad acumulada durante el desarrollo embrionario

Se registró la mortalidad acumulada de embriones de *Rhinella arenarum* durante la exposición continua a MA, desde fertilización hasta desarrollo embrionario completo. Los valores control incluyeron a aquellos individuos cuya fertilización fue defectuosa y por lo tanto no progresaron en su desarrollo embrionario, lo que ocasionó valores de mortalidad de alrededor del 20%. Los datos registrados en embriones de *R. arenarum* expuestos a 0,5 mg/L y 2 mg/L MA no difirieron significativamente de sus respectivos controles a lo largo del desarrollo. Sin embargo, los embriones expuestos a 9 mg/L MA mostraron una mortalidad acumulada significativa del 36,49% ($p \leq 0,0001$) al finalizar el desarrollo embrionario (Tabla 5).

3.1.2. Mortalidad respecto de embriones viables del estadio de BC

Se determinó además la mortalidad de embriones en estadios de BA y OC descartando aquellos individuos que inicialmente no se desarrollaron como consecuencia de defectos en el proceso de fertilización. Para ello se restó la cantidad de embriones no fertilizados al número inicial de embriones utilizados en los ensayos y la mortalidad en estadios de BA y OC fue referida a esta nueva cantidad inicial de embriones. El porcentaje de individuos muertos se expresó como mortalidad acumulada respecto de BC. La tasa de mortalidad en el estadio de BA no se vio modificada como consecuencia de la exposición de los embriones a MA. Sin embargo, el porcentaje de embriones muertos por exposición a 9 mg/L MA se incrementó significativamente cuando los embriones alcanzaron el estadio de OC, con un valor de

19,14% de mortalidad ($p \leq 0,001$) (Tabla 6), el doble del valor de la mortalidad en controles.

Tabla 5: Mortalidad acumulada en embriones de *Rhinella arenarum* durante su desarrollo. Los datos incluyen aquellos individuos muertos por defectos en el proceso de fertilización.

Estadio	MA (mg/L)	Embriones utilizados (n)	Embriones muertos acumulados(n)	% acumulado
BC	0	7195	1542	21,40
	0,5	5614	1095	19,50
	2	5676	1049	18,50
	9	7767	1666	21,40
BA	0	7195	1738	24,16
	0,5	5614	1251	22,28
	2	5676	1287	22,67
	9	7767	1828	23,53
OC	0	7195	1997	27,75
	0,5	5614	1512	26,93
	2	5676	1668	29,38
	9	7767	2834	36,49****

Los datos corresponden al número total de individuos utilizados en 8 experimentos individuales. El porcentaje de embriones muertos incluye aquellos individuos cuya fertilización defectuosa les impidió progresar en su desarrollo embrionario. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto de su correspondiente valor control (**** $p \leq 0,0001$) determinadas por análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis. MA: metilazinfos; BC: brote caudal; BA: boca abierta; OC: opérculo completo.

Tabla 6: Mortalidad acumulada de embriones de *Rhinella arenarum* en estadio de BA y OC respecto a embriones viables en estadio de BC. Los datos excluyen aquellos individuos arrestados por defectos en el proceso de fertilización.

Estadio	MA (mg/L)	n viables inicial	n muertos acumulado	% muertos
BA	0	5653	196	3,47
	0,5	4519	156	3,45
	2	4627	238	5,14
	9	6101	162	2,65
OC	0	5653	455	8,05
	0,5	4519	417	9,23
	2	4627	619	13,38
	9	6101	1168	19,14***

Los datos corresponden al número total de individuos utilizados en 8 experimentos individuales descartando los embriones arrestados en los primeros estadios o aquellos no fertilizados. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto de su correspondiente valor control (**p≤0,001) determinadas por análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis. MA: metilazinfos; BA: boca abierta; OC: opérculo completo.

3.1.3. Malformaciones embrionarias

En el estadio de BC, los embriones expuestos a MA no mostraron diferencias significativas en el porcentaje de individuos malformados en comparación con embriones control (10,6%) (Figura 20). Sin embargo, cuando los embriones alcanzaron el estadio de BA, el porcentaje de

individuos malformados se incrementó significativamente en aquellos expuestos a 9 mg/L MA (17,5%), comparativamente con los valores control (12,7 %; $p \leq 0,05$). Cuando los embriones alcanzaron el estadio de OC, aquellos expuestos a 9 mg/L MA sufrieron un incremento significativo en el porcentaje de individuos malformados (100%) al comparar con valores control (21,3%; $p \leq 0,0001$). Las anomalías morfológicas más comúnmente encontradas incluyeron: atrofia branquial, disminución del tamaño corporal, torcedura y ondulación de la aleta caudal, edema abdominal y epitelial y acortamiento axial (Figuras 21-23).

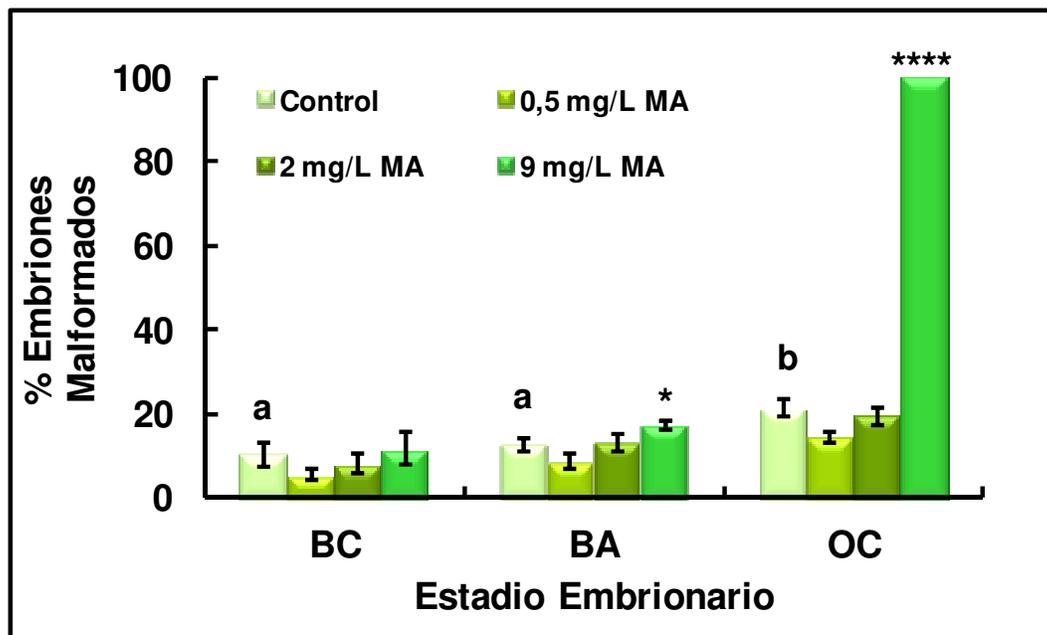


Figura 20: Porcentaje de embriones malformados de *Rhinella arenarum* expuestos a 0 mg/L, 0,5 mg/L, 2 mg/L y 9 mg/L MA desde su fertilización hasta el estadio de OC. Los datos representan la Media \pm Error Estándar de la Media (ESM) de 3 experimentos independientes; cada tratamiento se realizó por duplicado ($n=6$). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto de los valores control (* $p \leq 0,05$; **** $p \leq 0,0001$) y letras diferentes indican diferencias significativas de los valores control entre los diferentes estadios embrionarios ($p \leq 0,05$) determinadas por Kruskal-Wallis. MA: metilazinfos; BC: brote caudal; BA: boca abierta; OC: opérculo completo.

En el presente trabajo, el acortamiento axial del eje embrionario se observó frecuentemente asociado a otra anomalía como el edema (Figura 22 C, D, E). El edema abdominal aparece en los embriones como un área transparente, hinchada y llena de fluido y usualmente su presencia está acompañada de deficiencias en el desarrollo intestinal. También se observaron anomalías tales como la curvatura dorsal de la cola (Figura 22 C y Figura 23 I) y el edema epitelial (“*blistering*”) (Figura 22 E y Figura 23 E), así como también la atrofia de branquias externas en embriones expuestos a MA (Figura 22 C-E). A menudo también se observó una clara curvatura de la notocorda, ya sea dorsal o ventral, como en la Figura 21 D, Figura 22 B y Figura 23 F, G. También fue posible observar pliegues en la aleta caudal de embriones expuestos a MA (Figura 23 C, G). La capacidad de los embriones para adoptar la posición de nado correcta es impedida por las alteraciones morfológicas observadas, como el edema, que hace que los embriones descansen sobre su superficie dorsal o sobre sus lados. En estas circunstancias, los embriones malformados como consecuencia de la exposición a MA se desplazaron con dificultad y su capacidad de nado se vio claramente reducida. Además, la curvatura dorsal de la cola también contribuyó a la disminución en la capacidad de nado en embriones expuestos a MA. Asimismo, la longitud total de los embriones en OC expuestos a 9 mg/L MA se vio reducida por la exposición al plaguicida, alcanzando un valor de 7,5 mm cuando los embriones control en dicho estadio tienen una longitud total de 10 mm.

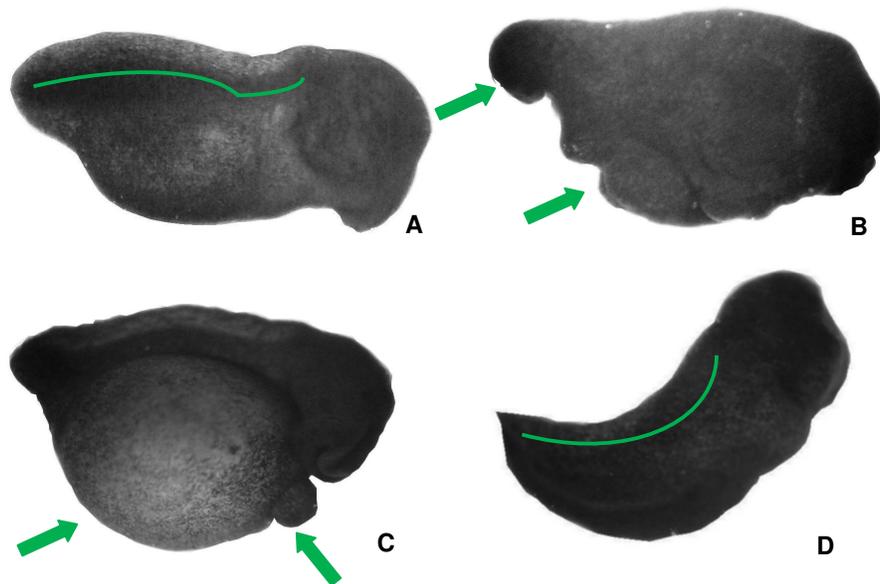


Figura 21: Fotografías de embriones de *Rhinella arenarum* en estadio de brote caudal (16X). A: embrión control de morfología normal en el que se muestra con una línea verde la curvatura normal de la notocorda. B: embrión expuesto a 0,5 mg/L MA en el que se señala la presencia de edema epitelial (*blistering*). C: embrión expuesto a 2 mg/L MA que muestra un severo edema abdominal acompañado por edema epitelial. D: embrión expuesto a 9 mg/L MA que muestra una curvatura dorsal de la notocorda.

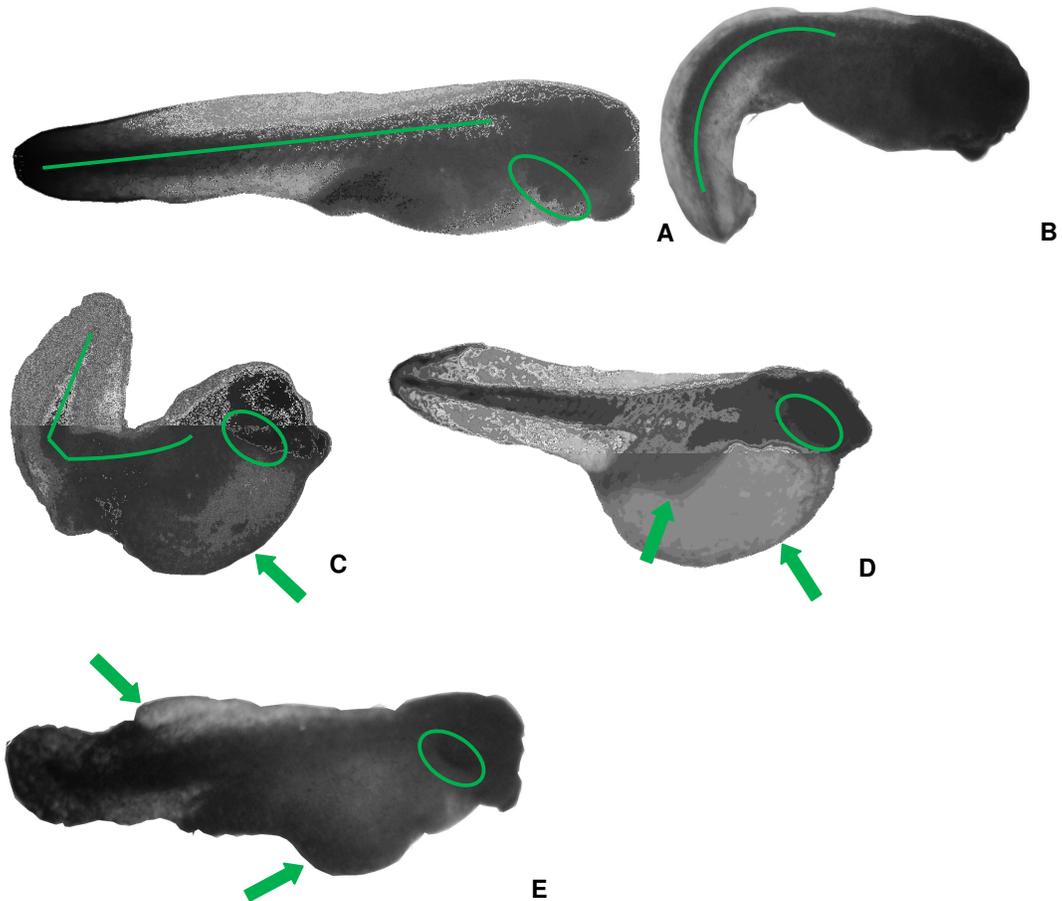


Figura 22: Fotografías de embriones de *Rhinella arenarum* en estadio de boca abierta (4X). A: embrión control en el que se muestra la disposición normal de la notocorda y el esbozo de branquias característico de este estadio embrionario. B: embrión expuesto a 0,5 mg/L MA que muestra una curvatura ventral de la aleta caudal. C, D: embriones expuestos a 2 mg/L MA. Se muestra una clara curvatura dorsal de la aleta caudal y edema abdominal, acompañado de la falla en el desarrollo intestinal. Se indica además con un círculo las branquias notablemente menos desarrolladas respecto del control. E: embrión expuesto a 9 mg/L MA en el que muestra el edema epitelial y abdominal, junto a las branquias con menor desarrollo.

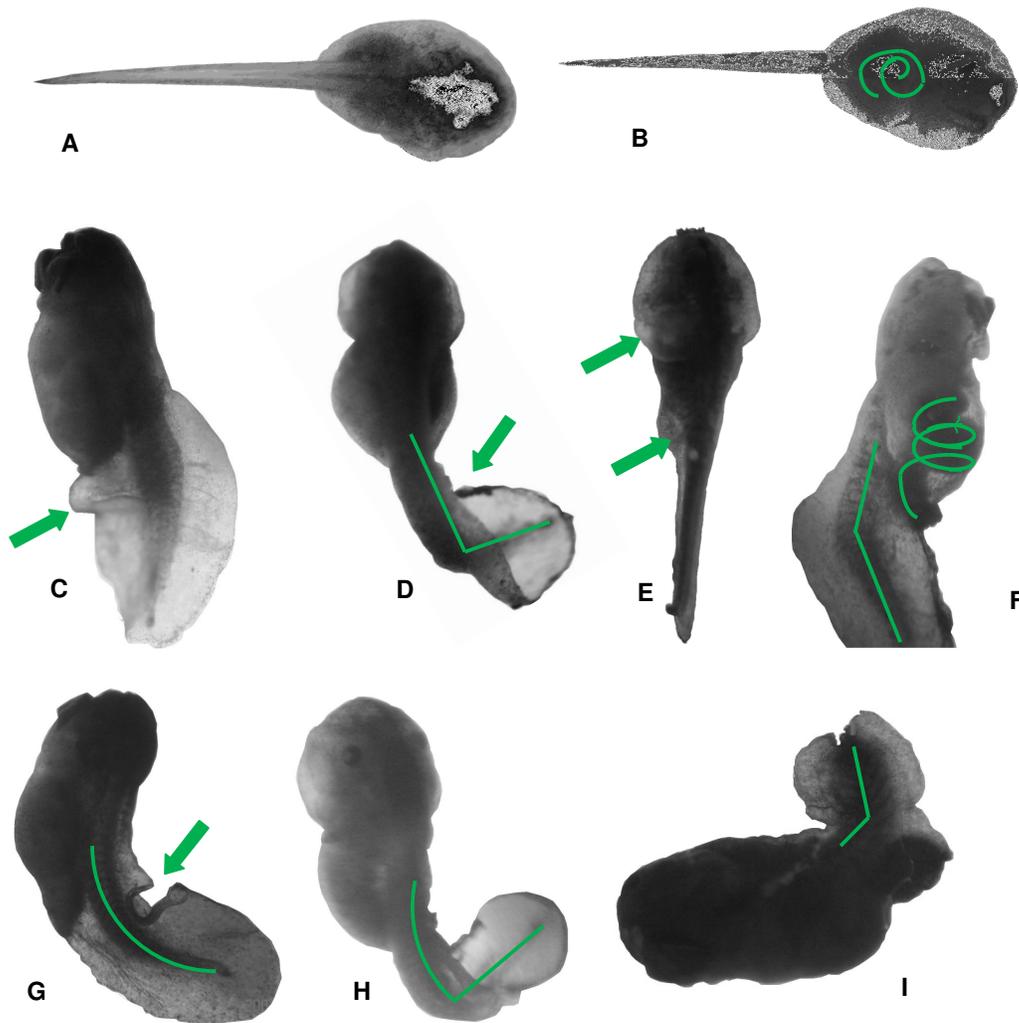


Figura 23: Fotografías de embriones de *Rhinella arenarum* en estadio de opérculo completo (4X). A, B: vista dorsal y ventral, respectivamente, de embriones control. Nótese la clara diferenciación de la región anterior respecto de la aleta caudal. En la figura B se indica el plegamiento correcto del intestino. C, D: embriones expuestos a 0,5 mg/L MA. Se indican pliegues y torceduras de la aleta caudal. Nótese que la región anterior de dichos embriones no posee la morfología característica del estadio de opérculo completo. E, F: embriones expuestos a 2 mg/L MA. Obsérvese el edema epitelial en la figura E y el quiebre de la aleta caudal en la figura F, junto al plegamiento incorrecto del intestino. G, H, I: embriones expuestos a 9 mg/L MA. Nótese los pliegues y quiebres de la aleta caudal y las severas alteraciones morfológicas del embrión de la figura I.

3.1.4. Histología de embriones de *Rhinella arenarum*

Se realizó una tinción básica hematoxilina-eosina a fin de realizar un análisis comparativo entre embriones control en estadio de OC y embriones expuestos a 9 mg/L MA. Los embriones expuestos a 9 mg/L MA desde fertilización y hasta desarrollo embrionario completo no fueron capaces de cumplir con los procesos que les permitieran alcanzar la fisonomía característica del estadio embrionario de OC. Dichos embriones presentan un evidente retraso en su desarrollo, caracterizado por un menor tamaño corporal y la presencia externa de ambas branquias, tal como se verifica en la Figura 24 B. Además de la presencia de branquias externas, los embriones en estadio de OC expuestos a 9 mg/L MA presentan grandes cantidades de vitelo en su interior, a diferencia de los embriones control en dicho estadio. La presencia de grandes cantidades de vitelo en embriones expuestos a 9 mg/L MA junto al menor tamaño de dichos individuos evidencia el retraso en el desarrollo embrionario que experimentan al estar expuestos de manera continua a 9 mg/L MA durante 10 días.

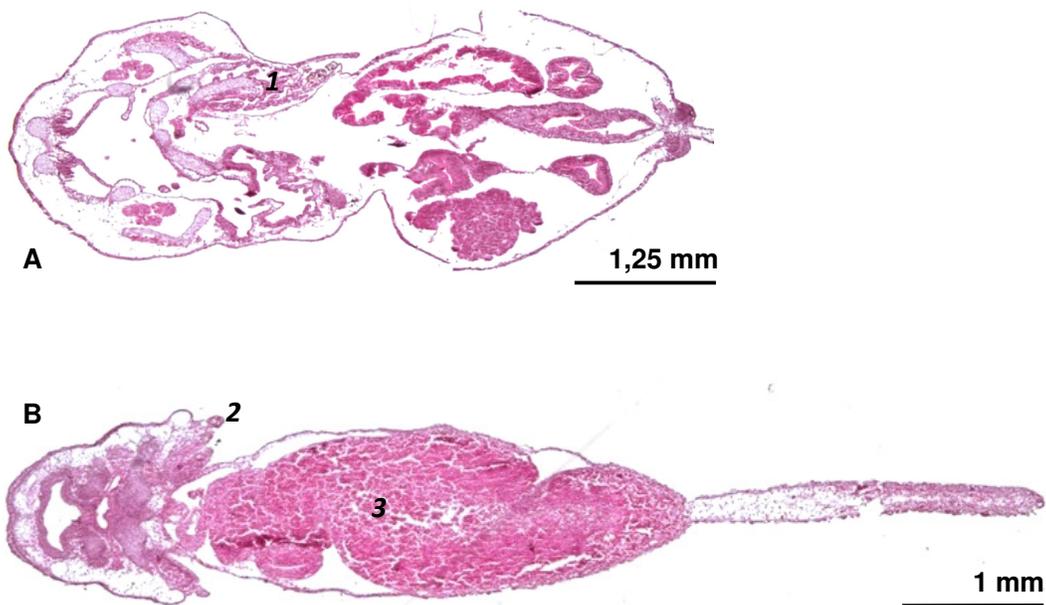


Figura 24: Tinción de hematoxilina-eosina de cortes en el plano frontal de embriones de *Rhinella arenarum* en estadio de OC. A) Embrión control en estadio de OC; 4x. Obsérvense las branquias reabsorbidas (1). B) Embrión expuesto a 9 mg/L MA; 4x. Obsérvese la presencia de branquias externas (2) en el embrión expuesto a 9 mg/L MA, así como la abundante cantidad de vitelo en su interior (3).

3.2. Acción de metilazinfos sobre la actividad del blanco primario colinesterasa

La actividad control de ChE se incrementó significativamente a lo largo del desarrollo de los embriones de *R. arenarum* ($p \leq 0,0001$). En embriones en estadio de BC, la actividad ChE promedió un valor de 0,73 mUI/mg proteína, alcanzando valores 5 veces y 22 veces mayores en BA y OC respectivamente (Figura 25). No se observaron diferencias significativas entre embriones control y aquellos expuestos a MA en los estadios de BC y BA. Sin embargo, los embriones en estadio de OC expuestos a 0,5 mg/L, 2 mg/L y 9 mg/L MA sufrieron una disminución significativa de la actividad ChE de 29%, 27% y 72%, respectivamente.

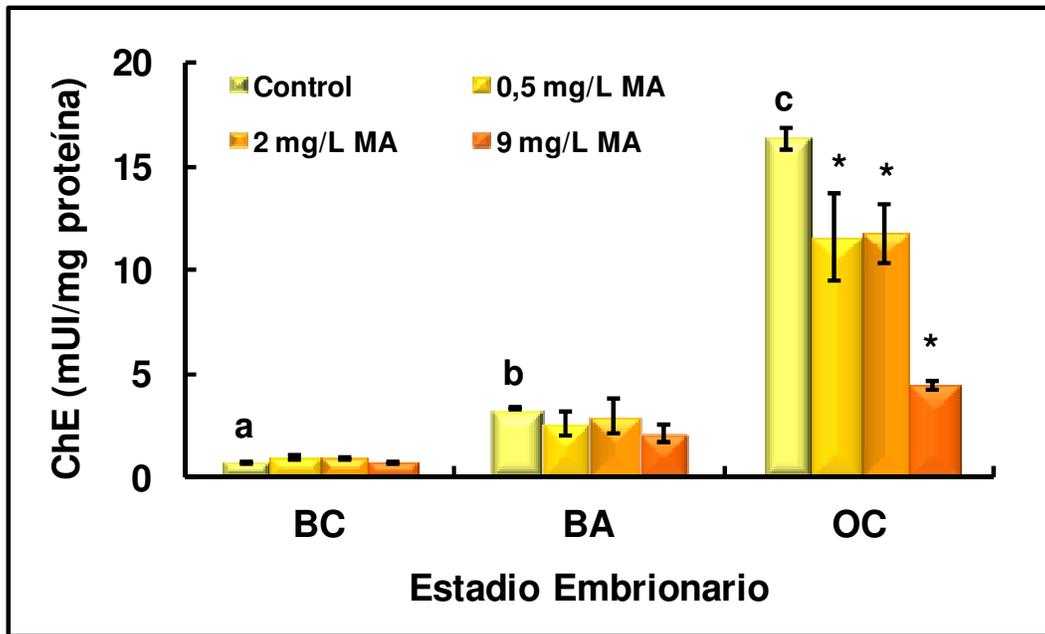


Figura 25: Actividad de ChE en embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a 0 mg/L, 0,5 mg/L, 2 mg/L y 9 mg/L MA desde su fertilización hasta el estadio de OC. Los datos representan la Media \pm ESM de 3 experimentos independientes; cada tratamiento se realizó por duplicado (n=6). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto de los valores control (* $p \leq 0,05$) y letras diferentes indican diferencias significativas de los valores control entre los diferentes estadios embrionarios ($p \leq 0,0001$) determinadas por ANOVA-Fisher LSD. ChE: colinesterasa; MA: metilazinfos; BC: brote caudal; BA: boca abierta; OC: opérculo completo.

3.3. Efectos de metilazinfos sobre el metabolismo de poliaminas

3.3.1. Niveles de poliaminas libres

3.3.1.1. Putrescina

Put fue la poliamina detectada en forma mayoritaria en embriones de *R. arenarum*. Los niveles control de Put se incrementaron significativamente a lo largo del desarrollo embrionario ($p = 0,0001$). Los niveles de Put no se vieron afectados en embriones en estadio de BC y

BA expuestos a MA y promediaron los valores de 5,3 nmol Put/mg proteína y 9,6 nmol Put/mg proteína, respectivamente. Sin embargo, al alcanzar el estadio de OC, los embriones expuestos a 9 mg/L MA sufrieron un incremento del 60% en los niveles de Put ($p=0,0002$) respecto de embriones control y alcanzaron un valor de 21 nmol Put/mg proteína (Figura 26).

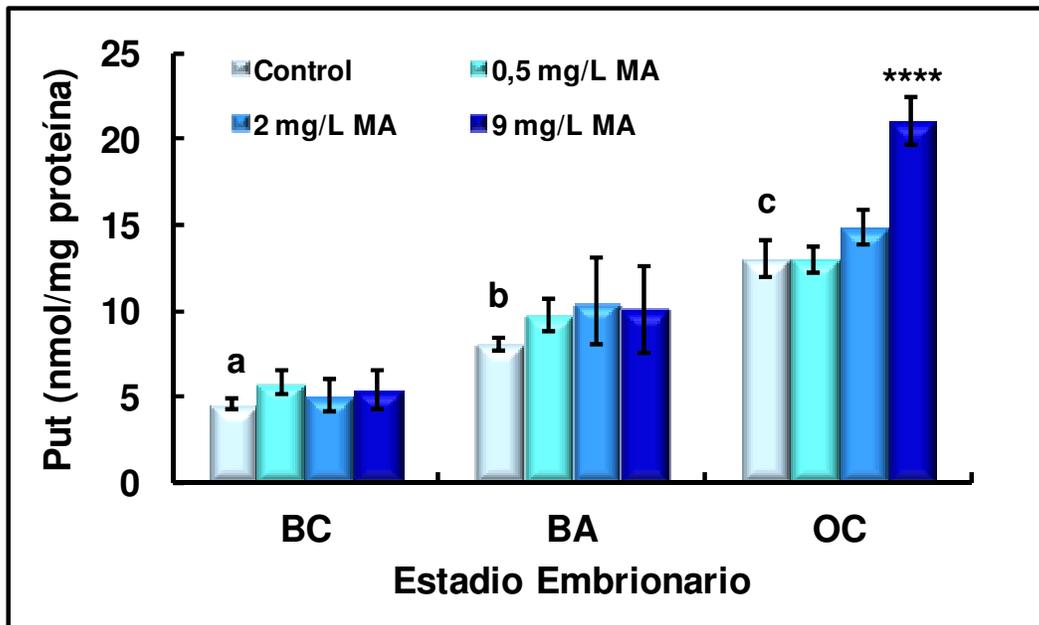


Figura 26: Niveles de Put en embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a 0 mg/L, 0,5 mg/L, 2 mg/L y 9 mg/L MA desde su fertilización hasta el estadio de OC. Los datos representan la Media \pm ESM de 3 experimentos independientes; cada tratamiento se realizó por duplicado ($n=6$). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto de los valores control (**** $p \leq 0,0001$) y letras diferentes indican diferencias significativas de los valores control entre los diferentes estadios embrionarios ($p \leq 0,001$) determinadas por ANOVA-Fisher LSD. Put: putrescina; MA: metilazinfos; BC: brote caudal; BA: boca abierta; OC: opérculo completo.

3.3.1.2. Espermidina

La poliamina Spd siguió en orden de abundancia a Put en embriones de *R. arenarum*. Al igual que Put, sus niveles control se incrementaron a medida que el desarrollo embrionario progresaba ($p \leq 0,0001$). En embriones en los estadios de BC y BA el nivel de Spd no se vio afectado significativamente por la exposición a MA. El valor promedio fue de 1.4 nmol Spd/mg proteína en embriones en BC. Los embriones en estadio de BA expuestos a 9 mg/L MA mostraron una disminución en los niveles de Spd del 22% aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Los embriones en estadio de OC expuestos a 9 mg/L MA sufrieron una disminución altamente significativa en los niveles de Spd del 42,3% respecto de los valores control ($p \leq 0,0001$) (Figura 27).

3.3.1.3. Espermina

Spm fue la poliamina detectada en menor cantidad en embriones de *R. arenarum*. Los niveles de Spm también se incrementaron a lo largo del desarrollo embrionario en embriones control, siendo aproximadamente 7 veces superior en embriones en OC respecto de BC. No se observaron diferencias significativas entre los embriones expuestos a MA y los individuos controles en los estadios embrionarios analizados ya que sus niveles variaron ampliamente. Sin embargo, se observó una clara tendencia hacia el descenso en sus niveles en embriones expuestos a 9 mg/L MA en estadio de OC. Spm no pudo ser detectada en la totalidad de las muestras analizadas (ND). Los niveles de Spm no superaron, en ningún caso, 1 nmol/mg proteína (Figura 28).

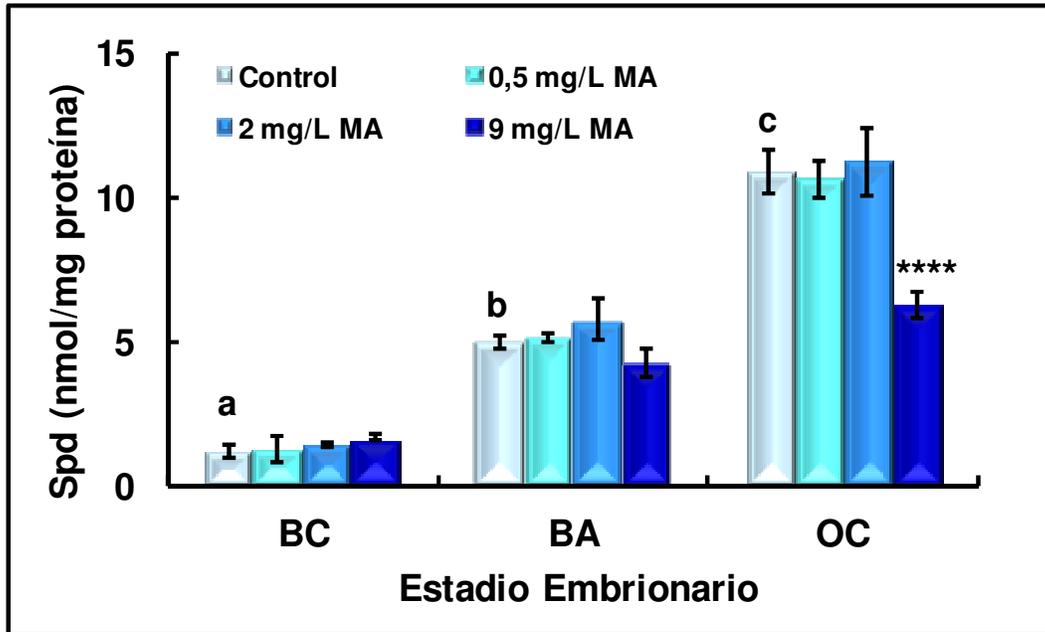


Figura 27: Niveles de Spd en embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a 0 mg/L, 0,5 mg/L, 2 mg/L y 9 mg/L MA desde su fertilización hasta el estadio de OC. Los datos representan la Media \pm ESM de 3 experimentos independientes; cada tratamiento se realizó por duplicado (n=6). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto de los valores control (**** $p \leq 0,0001$) y letras diferentes indican diferencias significativas de los valores control entre los diferentes estadios embrionarios ($p \leq 0,0001$) determinadas por ANOVA-Fisher LSD. Spd: espermidina; MA: metilazinfos; BC: brote caudal; BA: boca abierta; OC: opérculo completo.

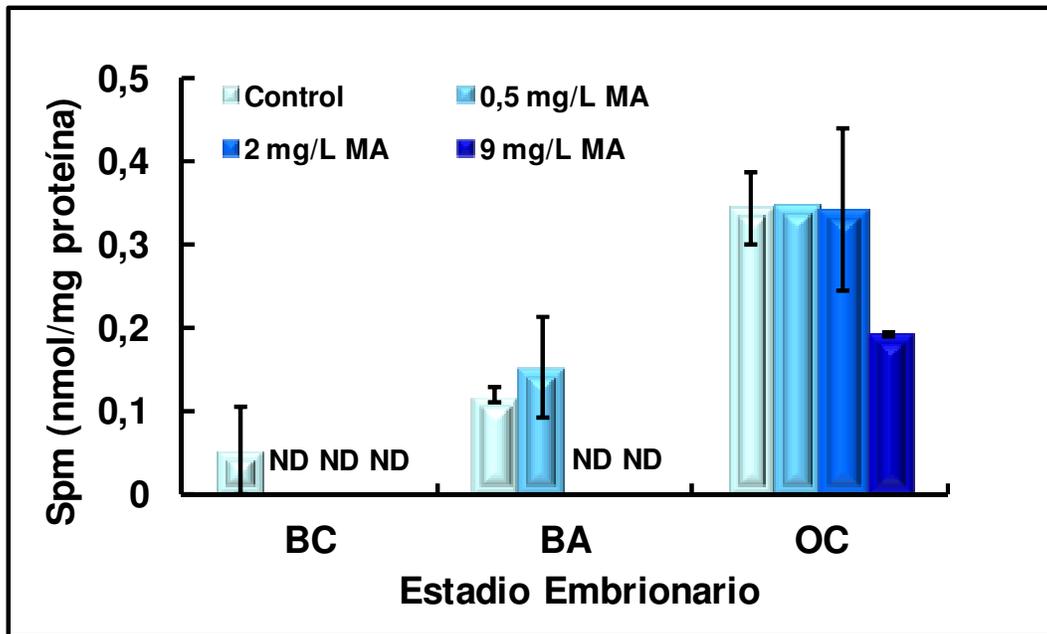


Figura 28: Niveles de Spm en embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a 0 mg/L, 0,5 mg/L, 2 mg/L y 9 mg/L MA desde su fertilización hasta el estadio de OC. Los datos representan la Media \pm ESM de 3 experimentos independientes; cada tratamiento se realizó por duplicado (n=6). No se detectaron diferencias significativas por ANOVA. Spm: espermina; MA: metilazinfos; BC: brote caudal; BA: boca abierta; OC: opérculo completo. ND: muestra no detectada.

3.3.2. Actividad de ornitina decarboxilasa

La actividad de ODC en embriones control sufrió variaciones a lo largo del desarrollo embrionario de *Rhinella arenarum*. Entre los estadios de BC y BA la actividad ODC se incrementó 2,25 veces ($p=0,007$), mientras que en los embriones en estadio de OC su actividad control cayó 22,5 veces, respecto del estadio de BA ($p=0,000022$). La actividad de ODC en embriones en estadio de BC no fue afectada por la exposición a MA y su valor promedio fue de 2,7 nmol $^{14}\text{CO}_2/\text{h}/\text{mg}$ proteína. Los embriones expuestos a 9 mg/L MA en los estadios de BA y OC sufrieron un incremento significativo de la actividad respecto de los embriones control (Figura 29). En el caso de embriones en BA, la actividad de ODC

se duplicó ($p=0,0003$) y en los embriones en estadio de OC su actividad aumentó 10 veces ($p=0,0001$). Los embriones en estadios de BA y OC expuestos a 0,5 mg/L y 2 mg/L MA no mostraron diferencias significativas en la actividad de ODC con respecto a los valores control.

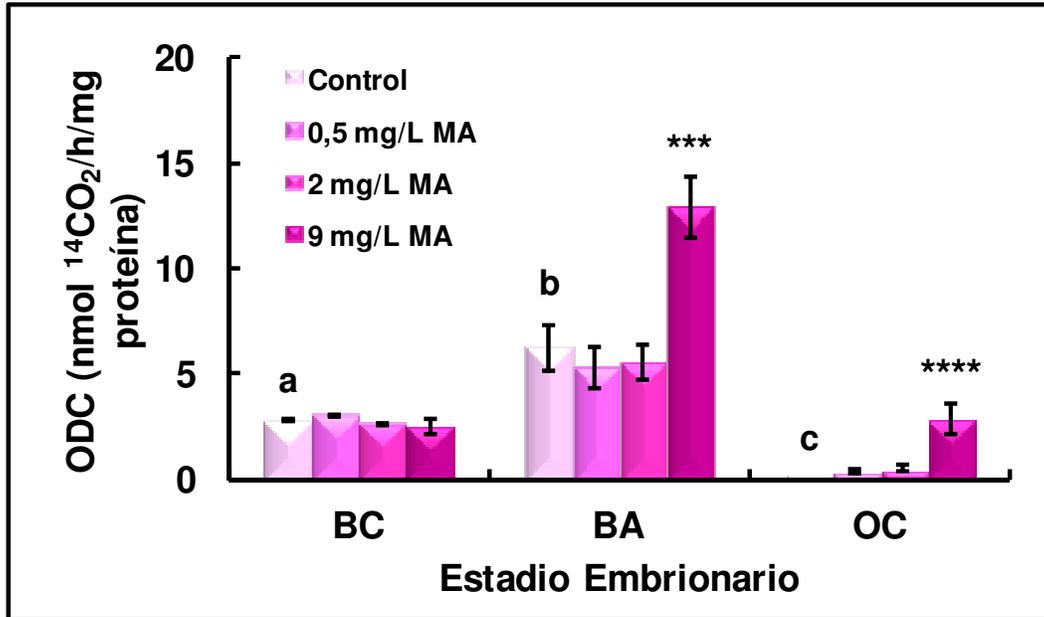


Figura 29: Actividad de ODC en embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a 0 mg/L, 0,5 mg/L, 2 mg/L y 9 mg/L MA desde su fertilización hasta el estadio de OC. Los datos representan la Media \pm ESM de 3 experimentos independientes; cada tratamiento se realizó por duplicado ($n=6$). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto de los valores control (***) $p \leq 0,001$; (****) $p \leq 0,0001$) y letras diferentes indican diferencias significativas de los valores control entre los diferentes estadios embrionarios ($p \leq 0,001$) determinadas por ANOVA-Fisher LSD. ODC: ornitina decarboxilasa; MA: metilazinfos; BC: brote caudal; BA: boca abierta; OC: opérculo completo.

3.3.3. Análisis de la proporción Poliaminas/ODC

Se analizó la correlación entre los niveles de poliaminas y la actividad de ODC en embriones de *R. arenarum* expuestos a MA. Para ello, la proporción poliamina/ODC fue calculada a partir de los datos para cada estadio embrionario y concentración de MA (Figura 30). No se observaron variaciones significativas en la proporción poliamina/ODC en el estadio de BC con respecto a BA y no se observaron efectos significativos por exposición a MA (Figura 30). En el estadio de OC, la proporción control poliamina/ODC se incrementó notablemente, siendo 28 veces mayor para la proporción Put/ODC, 87 veces mayor para la proporción Spd/ODC y 66 veces mayor para la proporción Spm/ODC con respecto al estadio de BC. Para poder visualizar mejor esta variación para las tres poliaminas, las proporciones calculadas en el estadio de OC fueron referidas a los valores de embriones control del estadio de BC (Figura 31). La exposición a MA impidió dichos incrementos en el estadio de OC en forma dependiente de la concentración, con un máximo efecto inhibitorio que permitió un aumento de sólo 4 veces en la proporción Put-Spd-Spm/ODC en embriones expuestos a 9 mg/L MA, si se lo compara con los incrementos de 28 a 87 veces en los controles.

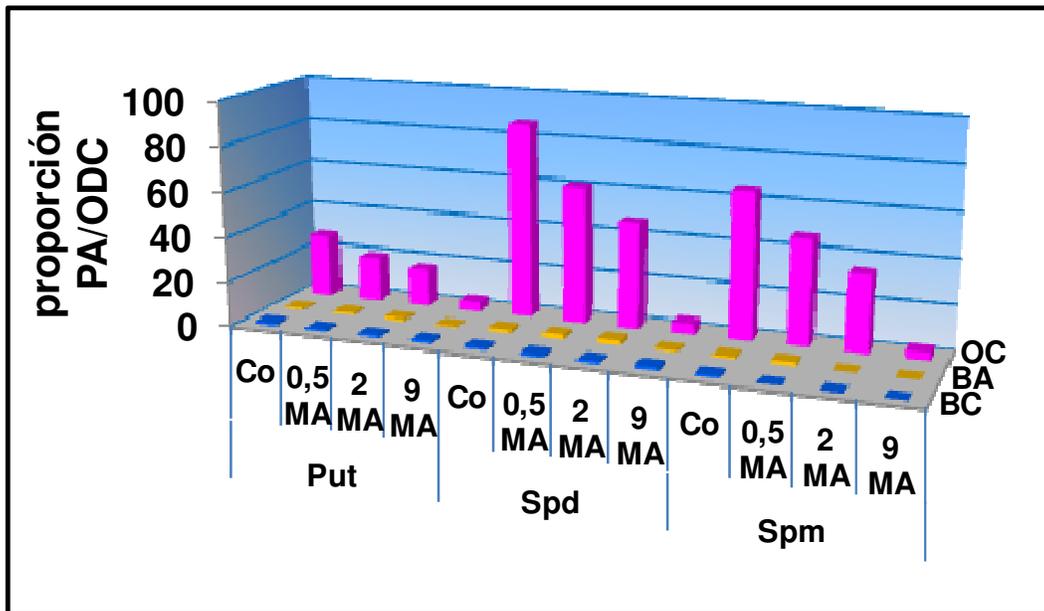


Figura 30: Efecto del plaguicida metilazinfos sobre la proporción poliaminas/ODC en embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a 0 mg/L, 0,5 mg/L, 2 mg/L y 9 mg/L MA desde su fertilización hasta el estadio de OC. La proporción poliaminas/ODC fue calculada dividiendo los valores de nivel de poliaminas por la actividad ODC en cada estadio embrionario. PA: poliaminas; ODC: ornitina decarboxilasa; MA: metilazinfos; BC: brote caudal; BA: boca abierta; OC: opérculo completo; Put: putrescina; Spd: espermidina; Spm: espermina.

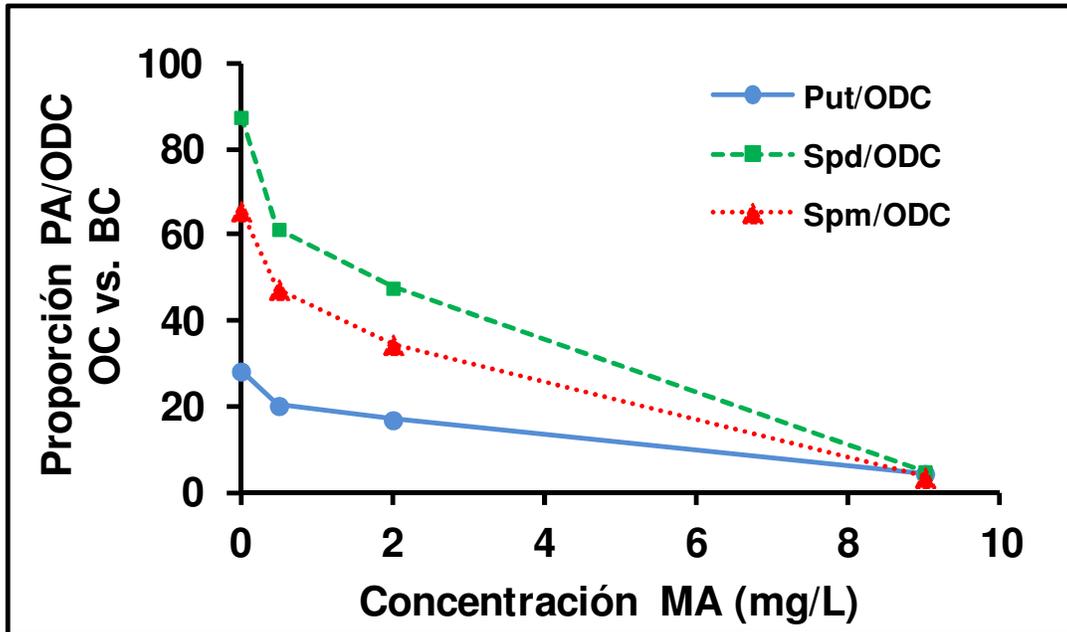


Figura 31: Efecto del plaguicida metilazinfos sobre la proporción poliaminas/ODC respecto del estadio de brote caudal en embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a 0 mg/L, 0,5 mg/L, 2 mg/L y 9 mg/L MA desde su fertilización hasta el estadio de OC. La proporción poliaminas/ODC fue calculada dividiendo los valores del nivel de poliaminas por la actividad ODC en cada estadio embrionario y fueron a su vez normalizados respecto de los valores de brote caudal. PA: poliaminas; ODC: ornitina decarboxilasa; MA: metilazinfos; BC: brote caudal; OC: opérculo completo; Put: putrescina; Spd: espermidina; Spm: espermina.

3.3.4. Actividad de diamino oxidasa

La actividad de DAO se incrementó significativamente 4,2 veces en embriones control entre los estadios de BC y BA, mientras que su actividad disminuyó un 21% en el estadio de OC con respecto a BA ($p \leq 0,0001$). No se registraron diferencias significativas en la actividad de DAO en embriones en BC expuestos a MA. Los embriones en estadio de BA expuestos a 0,5 mg/L MA y 9 mg/L MA sufrieron un incremento significativo de la actividad DAO de aproximadamente 2 veces comparado con su respectivo control ($p \leq 0,01$), mientras que los

expuestos a 2 mg/L MA mostraron también una tendencia a aumentar de 44,6% ($p=0,107$). Al alcanzar el fin del desarrollo embrionario, la tendencia vista en embriones expuestos a 2 mg/L MA se transformó en un aumento significativo de la actividad DAO de 1,6 veces con respecto a su control ($p=0,021$), mientras que los embriones expuestos a 0,5 mg/L MA mostraron un descenso significativo de la actividad DAO de 44% ($p=0,018$) (Figura 32).

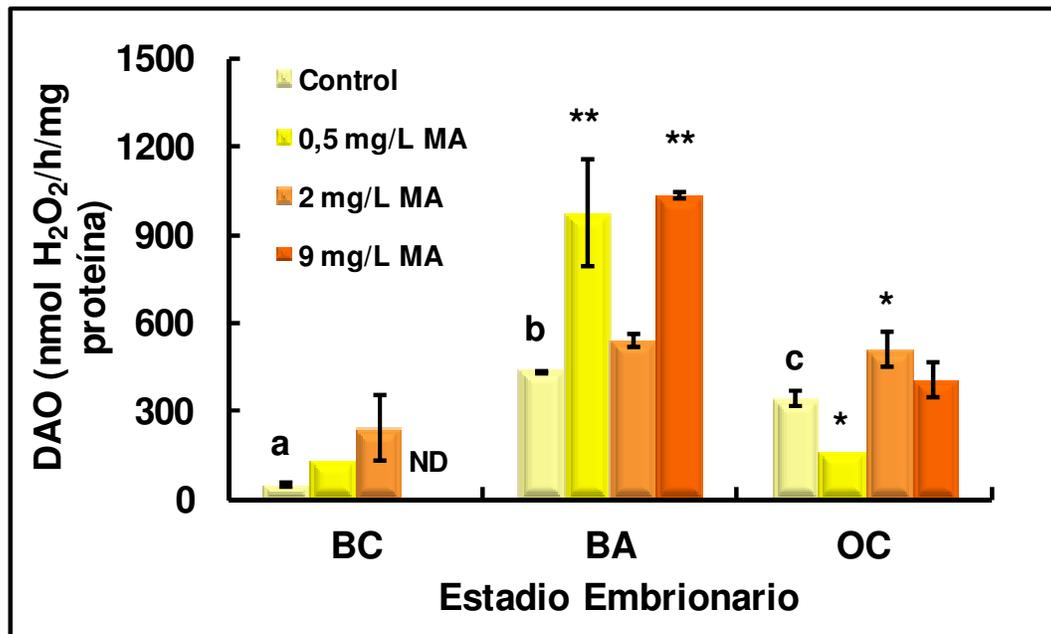
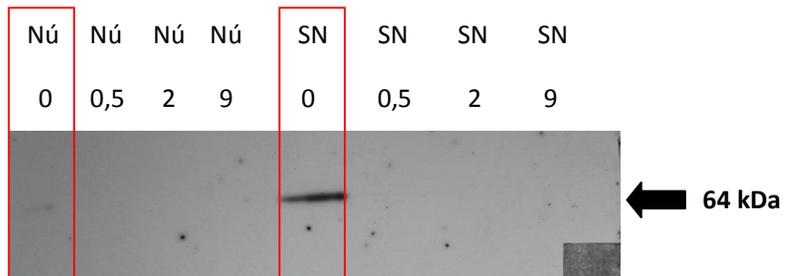


Figura 32: Actividad de DAO en embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a 0 mg/L, 0,5 mg/L, 2 mg/L y 9 mg/L MA desde su fertilización hasta el estadio de OC. Los datos representan la Media \pm ESM de 2 experimentos; cada tratamiento se realizó por duplicado ($n=4$). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto de los valores control ($*p\leq 0,05$; $**p\leq 0,01$) y letras diferentes indican diferencias significativas de los valores control entre los diferentes estadios embrionarios ($p\leq 0,0001$) determinadas por ANOVA-Fisher LSD. DAO: diamino oxidasa; MA: metilazinfos; BC: brote caudal; BA: boca abierta; OC: opérculo completo.

3.3.5. Niveles del factor de transcripción c-Fos como posible regulador de ODC

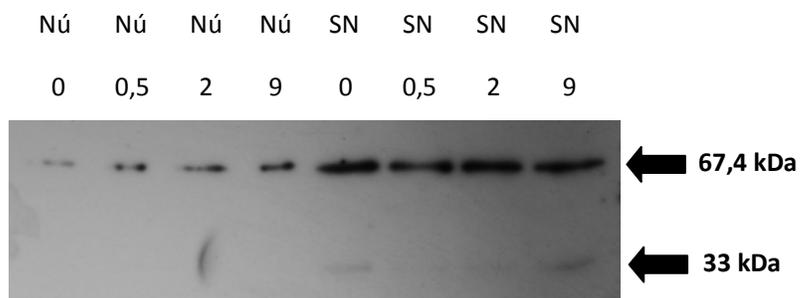
El análisis de los niveles de la proteína c-Fos en embriones de *Rhinella arenarum* por Western Blot demostró la presencia de 2 bandas de diferente peso molecular. En el estadio de BC se detectó c-Fos sólo en embriones control, y tanto en el núcleo como en el sobrenadante de 1000 x *g*; ambas bandas correspondientes a un peso molecular de aproximadamente 64 kDa (Figura 33 A). La intensidad de la señal fue 33 veces mayor en el sobrenadante con respecto al núcleo. En el estadio de BA la proteína c-Fos fue detectada tanto en embriones control como expuestos a MA y tanto en núcleo como en sobrenadante de 1000 x *g*. En extractos nucleares se detectó una sola banda correspondiente a 67,4 kDa de peso molecular aproximadamente (Figura 33 B). De acuerdo con la cuantificación realizada (Figura 33 D), se incrementó la translocación de la proteína c-Fos hacia el núcleo celular en embriones expuestos a todas las concentraciones de MA ensayadas. En sobrenadante de 1000 x *g* se detectaron dos bandas, una superior correspondiente a 67,4 kDa de peso molecular y otra inferior de 33 kDa de peso molecular aproximadamente. En embriones control, la intensidad de la señal correspondiente a c-fos (67,4 kDa) fue 24 veces mayor en el sobrenadante con respecto al núcleo. La banda inferior de 33 kDa podría corresponder a proteínas Fra (antígeno relacionado a Fos; *Fos related antigen*), ya que el anticuerpo utilizado detecta tanto miembros de la familia c-Fos como Fra. En embriones en estadio de OC se detectaron dos bandas, correspondientes a 34 kDa y 20 kDa de peso molecular, aproximadamente (Figura 33 C). La señal sólo fue detectada en sobrenadante de 1000 x *g* en embriones expuestos a 9 mg/L MA y nuevamente podrían corresponder a proteínas Fra.

Brote Caudal



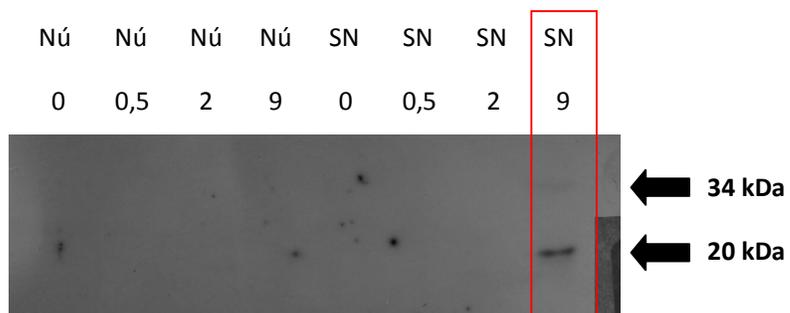
A

Boca Abierta



B

Opérculo Completo



C

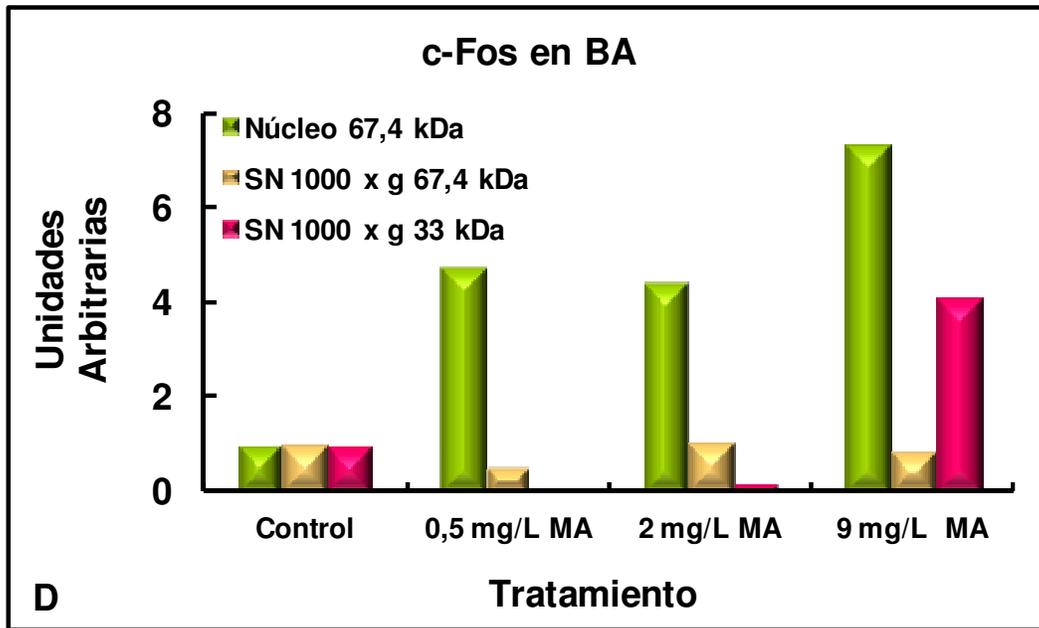


Figura 33: Análisis por Western Blot del factor de transcripción c-Fos. A) Western blot de c-Fos en embriones en estadio de BC; B) embriones en estadio de BA; C) embriones en estadio de OC; D) Cuantificación de los niveles de c-Fos en el estadio de BA. Nú: extracto nuclear. SN: sobrenadante de 1000 x *g*. Datos representativos de 2 experimentos independientes.

3.3.6. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de ODC en embriones de *Rhinella arenarum*

La proteína ODC fue detectada por inmunohistoquímica en las glándulas cementales de embriones en estadio de OC. La marca proporcionada por el revelado con diaminobencidina fue más intensa en embriones expuestos al plaguicida OF (Figura 34). El mayor nivel de proteína ODC concuerda con el incremento de actividad reportado en dichos embriones. La presencia de proteína ODC no pudo ser revelada en otros cortes de órganos de los embriones debido a problemas en la técnica, probablemente por decaimiento del anticuerpo.

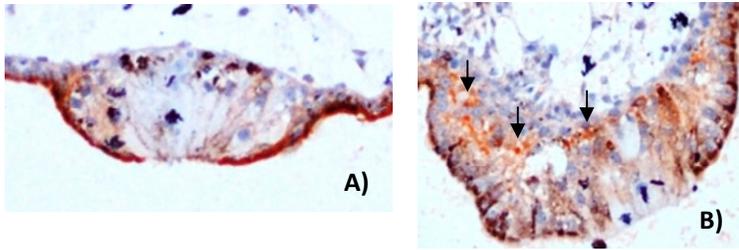


Figura 34: Detalle de las glándulas cementales de embriones de *Rhinella arenarum* en estadio de OC (10X). A) Embriones control. B) Embriones expuestos a 9 mg/L MA. Nótese la gran cantidad de células que expresan la proteína ODC (ver flechas en figura B) en comparación con los embriones control.

3.4. Efectos de metilazinfos sobre la actividad de enzimas del sistema antioxidante y sobre GSH en embriones de *R. arenarum*

3.4.1. Catalasa

La actividad específica de CAT promedió un valor de 110 UI/mg proteína y se mantuvo constante a lo largo del desarrollo embrionario (Figura 35). No se detectaron diferencias significativas entre embriones control y aquellos expuestos a MA en los estadios embrionarios evaluados.

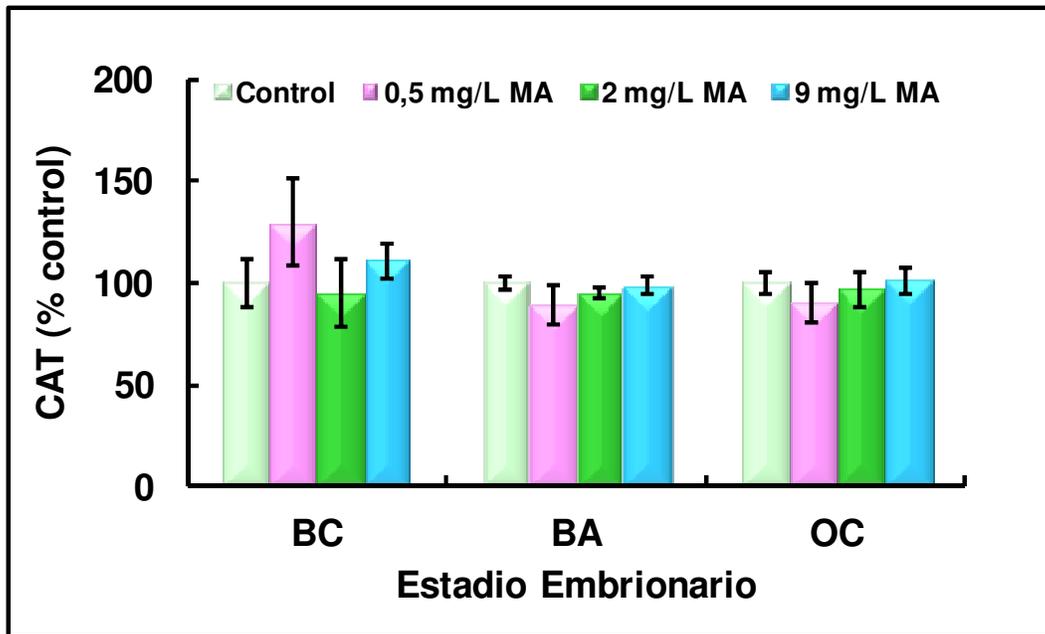


Figura 35: Actividad de CAT, expresada como porcentaje de la actividad control. Embriones de *Rhinella arenarum* fueron expuestos a 0 mg/L, 0.5 mg/L, 2 mg/L y 9 mg/L MA desde su fertilización hasta el estadio de OC. Los datos representan la Media \pm ESM de 3 experimentos independientes; cada tratamiento se realizó por duplicado (n=6). La actividad control de CAT se mantuvo constante a lo largo del desarrollo embrionario y promedió un valor de 110 UI/mg proteína. No se detectaron diferencias significativas por ANOVA. CAT: catalasa; MA: metilazinfos; BC: brote caudal; BA: boca abierta; OC: opérculo completo.

3.4.2. Superóxido dismutasa

Los embriones de *R. arenarum* mostraron una actividad de SOD mayor en el estadio de BC (33 UI/mg proteína) respecto a estadios más avanzados (6 UI/mg proteína en estadio de BA y 4 UI/mg proteína en estadio de OC). Los embriones de *R. arenarum* en estadio de BC expuestos a 2 mg/L y 9 mg/L MA sufrieron una disminución significativa de la actividad de SOD de 39% y 51%, respectivamente, respecto de los valores controles (Figura 36). El nivel de inhibición se acentuó cuando los embriones alcanzaron el estadio de BA y llegó a

valores de 41%, 47% y 56% en embriones expuestos a 0,5 mg/L, 2 mg/L y 9 mg/L MA, respectivamente. Al alcanzar el estadio de OC, los individuos expuestos a 0,5 mg/L y 2 mg/L MA recuperaron valores control de actividad de SOD, mientras que aquellos expuestos a 9 mg/L MA alcanzaron un 78% de inhibición de la actividad enzimática.

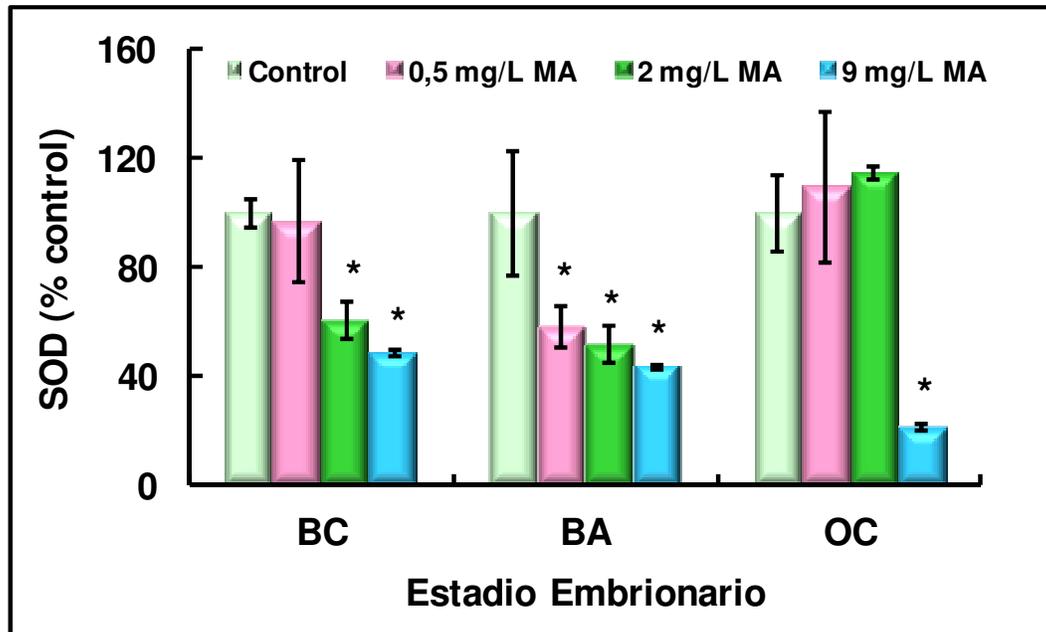


Figura 36: Actividad de SOD, expresada como porcentaje de la actividad control. Embriones de *Rhinella arenarum* fueron expuestos a 0 mg/L, 0,5 mg/L, 2 mg/L y 9 mg/L MA desde su fertilización hasta el estadio de OC. Los datos representan la Media \pm ESM de 3 experimentos independientes; cada tratamiento se realizó por duplicado (n=6). Las medidas de actividad se realizaron en cuatro volúmenes de muestra (ver Materiales y Métodos). La actividad control de SOD fue de 33 UI/mg proteína en estadio de BC, 6 UI/mg proteína en estadio de BA y 4 UI/mg proteína en estadio de OC. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto de los valores control (* $p \leq 0,05$) determinadas por ANOVA-Fisher LSD. SOD: superóxido dismutasa; MA: metilazinfos; BC: brote caudal; BA: boca abierta; OC: opérculo completo.

3.4.3. Glutación reductasa

La actividad control de GR fue similar entre los estadios de BC y BA y sufrió un incremento significativo cuando los embriones alcanzaron el estadio de OC ($p \leq 0,001$). Los embriones de *R. arenarum* en estadio de BC expuestos a 9 mg/L MA sufrieron un incremento significativo del 94% en la actividad específica de GR con respecto a los valores de embriones control. No se encontraron diferencias significativas en los valores de actividad de GR en embriones expuestos al insecticida en estadios embrionarios más avanzados (Figura 37).

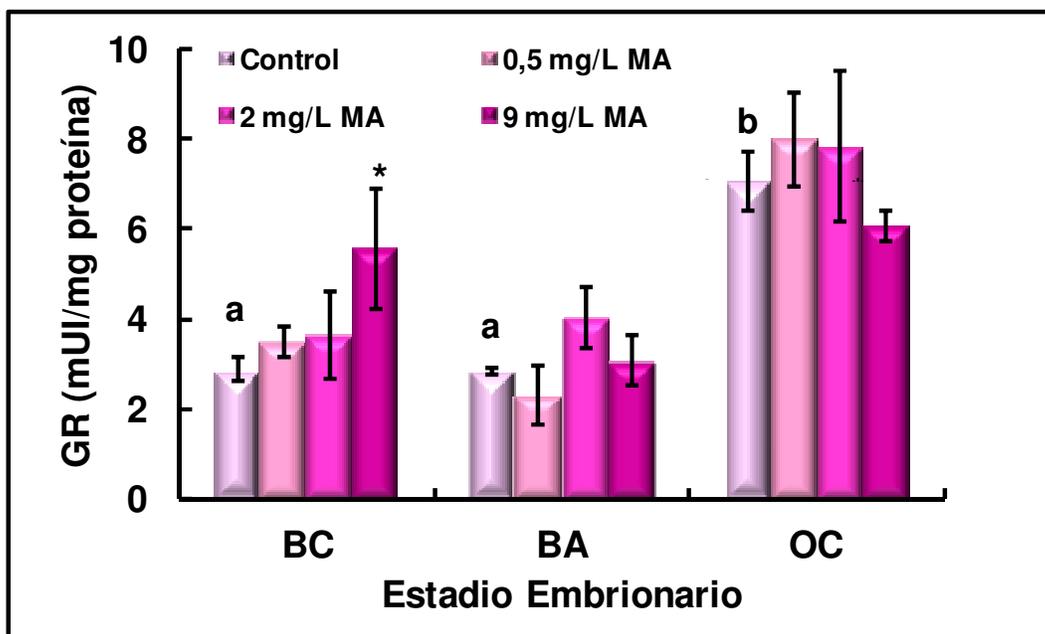


Figura 37: Actividad de GR en embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a 0 mg/L, 0,5 mg/L, 2 mg/L y 9 mg/L MA desde su fertilización hasta el estadio de OC. Los datos representan la Media \pm ESM de 3 experimentos independientes; cada tratamiento se realizó por duplicado (n=6). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto de los valores control (* $p \leq 0,05$) y letras diferentes indican diferencias significativas de los valores control entre los diferentes estadios embrionarios ($p \leq 0,001$) determinadas por ANOVA-Fisher LSD. GR: glutatión reductasa; MA: metilazinfos; BC: brote caudal; BA: boca abierta; OC: opérculo completo.

3.4.4. Glutación S-transferasa

La actividad control de GST disminuyó significativamente en el estadio de BA (28%) con respecto al estadio de BC, mientras que al llegar al estadio de OC la actividad de GST alcanzó sus mayores niveles (2,4 veces respecto de BA y 1,7 veces respecto de BC) ($p \leq 0,0001$). Se registró un incremento significativo en la actividad de GST en embriones en el estadio de BC expuestos a 2 mg/L y 9 mg/L MA, alcanzando 48% y 63% de aumento, respectivamente, respecto de valores control (Figura 38). En los estadios de BA y OC no se detectaron diferencias significativas entre embriones control y aquellos expuestos a MA.

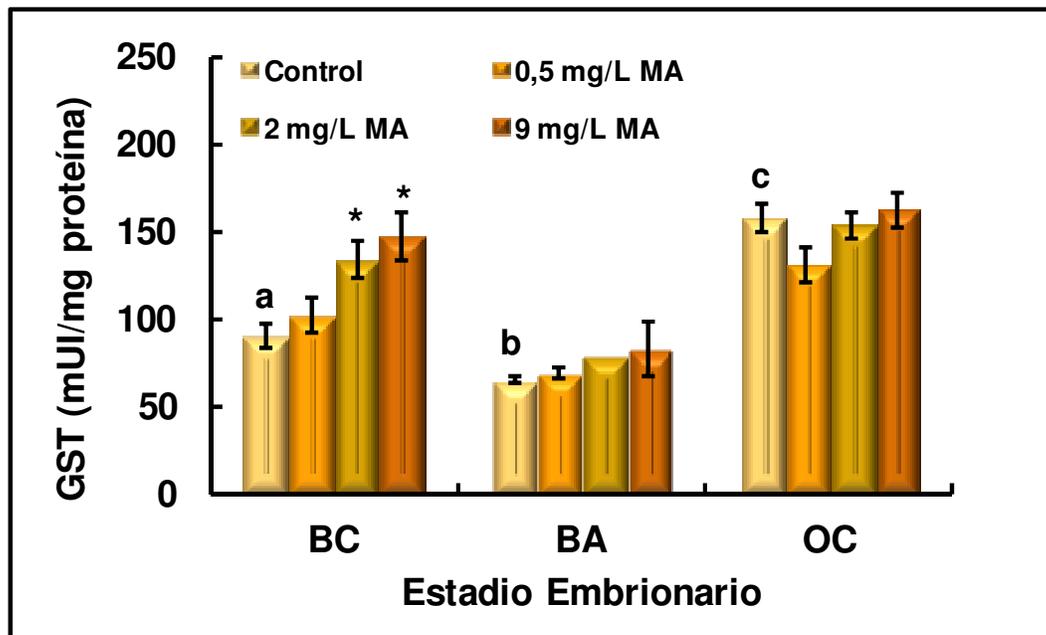


Figura 38: Actividad de GST en embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a 0 mg/L, 0,5 mg/L, 2 mg/L y 9 mg/L MA desde su fertilización hasta el estadio de OC. Los datos representan la Media \pm ESM de 3 experimentos independientes; cada tratamiento se realizó por duplicado (n=6). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto de los valores control ($*p \leq 0,05$) y letras diferentes indican diferencias significativas de los valores control entre los diferentes estadios embrionarios ($p \leq 0,0001$) determinadas por ANOVA-Fisher LSD. GST: glutatión S-transferasa; MA: metilazoxinofos; BC: brote caudal; BA: boca abierta; OC: opérculo completo.

3.4.5. Glutación peroxidasa Se-dependiente

La actividad control de SeGPx se incrementó progresivamente a lo largo del desarrollo embrionario, llegando a 2,7 veces en OC respecto a BC ($p \leq 0,0001$). La exposición de embriones de *R. arenarum* a 0,5 mg/L y 2 mg/L MA no afectó la actividad de SeGPx en los estadios embrionarios evaluados. Sin embargo, los embriones en estadio de BC expuestos a 9 mg/L MA mostraron una tendencia hacia la disminución de la actividad de SeGPx que se hizo significativa en el estadio de BA, alcanzando un 47%. Los embriones expuestos a 9 mg/L MA recuperaron los valores controles al alcanzar el estadio de OC (Figura 39).

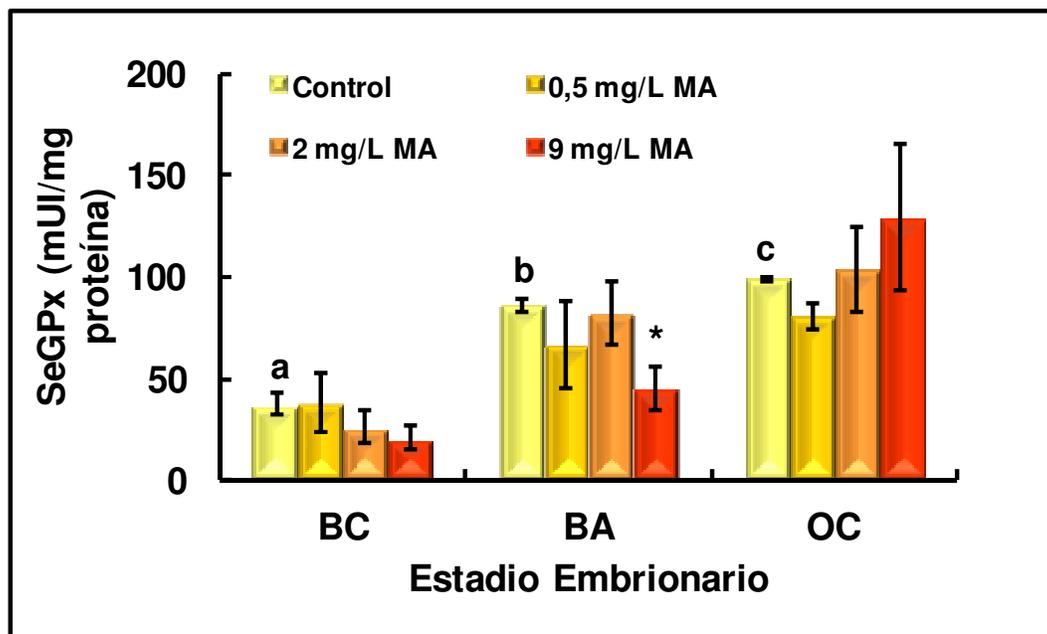


Figura 39: Actividad de SeGPx en embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a 0 mg/L, 0,5 mg/L, 2 mg/L y 9 mg/L MA desde su fertilización hasta el estadio de OC. Los datos representan la Media \pm ESM de 3 experimentos independientes; cada tratamiento se realizó por duplicado ($n=6$). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto de los valores control ($*p \leq 0,05$) y letras diferentes indican diferencias significativas de los valores control entre los diferentes estadios embrionarios ($p \leq 0,0001$) determinadas por ANOVA-Fisher LSD. SeGPx: glutación peroxidasa Se-dependiente; MA: metilazinfos; BC: brote caudal; BA: boca abierta; OC: opérculo completo.

3.4.6. Nivel de glutatión reducido

Los niveles control de GSH experimentaron un incremento continuo y muy significativo a lo largo del desarrollo embrionario ($p \leq 0,001$), siendo 5,2 veces mayores en BA y 7,5 veces mayores en OC con respecto al estadio de BC. Los embriones de *R. arenarum* en los estadios de BC y BA expuestos a MA no sufrieron la alteración de los niveles del antioxidante GSH. Sin embargo, cuando alcanzaron el estadio de OC, los niveles de GSH disminuyeron un 26% y un 33% en individuos expuestos a 2 mg/L y 9 mg/L MA, respectivamente ($p \leq 0,001$) (Figura 40).

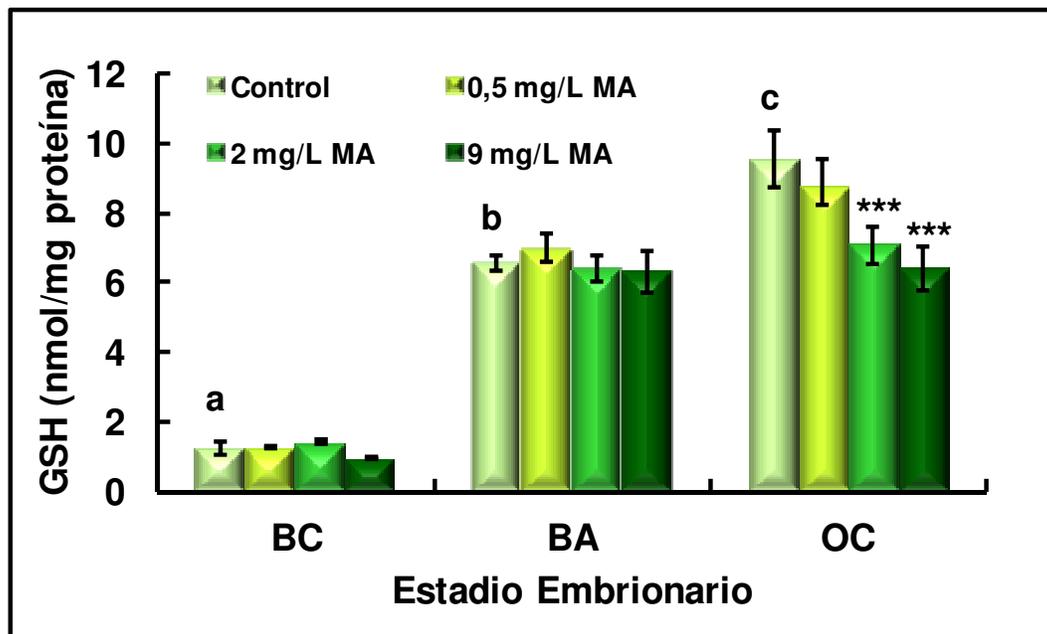


Figura 40: Niveles de GSH en embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a 0 mg/L, 0,5 mg/L, 2 mg/L y 9 mg/L MA desde su fertilización hasta el estadio de OC. Los datos representan la Media \pm ESM de 3 experimentos independientes; cada tratamiento se realizó por duplicado ($n=6$). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto de los valores control ($***p \leq 0,001$) y letras diferentes indican diferencias significativas de los valores control entre los diferentes estadios embrionarios ($p \leq 0,001$) determinadas por ANOVA-Fisher LSD. GSH: glutatión reducido; MA: metilazinfos; BC: brote caudal; BA: boca abierta; OC: opérculo completo.

3.5. Efectos bioquímicos generales de metilazinfos: Niveles de Proteínas Totales

El contenido de proteínas totales en embriones control de *Rhinella arenarum* no sufrió modificaciones entre los estadios de BC y BA y promedió un valor de 0,047 mg/embrión. Sin embargo, los niveles control de proteínas se elevaron 1,7 veces en embriones en OC respecto del estadio de BA, hecho que coincide con el aumento de tamaño de los embriones (Figura 41). La exposición a MA no alteró significativamente el contenido de proteínas de los embriones en estadio de BC. Sin embargo, la exposición de los embriones a 9 mg/L MA desde fertilización y hasta los estadios de BA y OC produjo un descenso significativo en sus niveles del 14% ($p \leq 0,05$) y del 30% ($p \leq 0,01$), respectivamente.

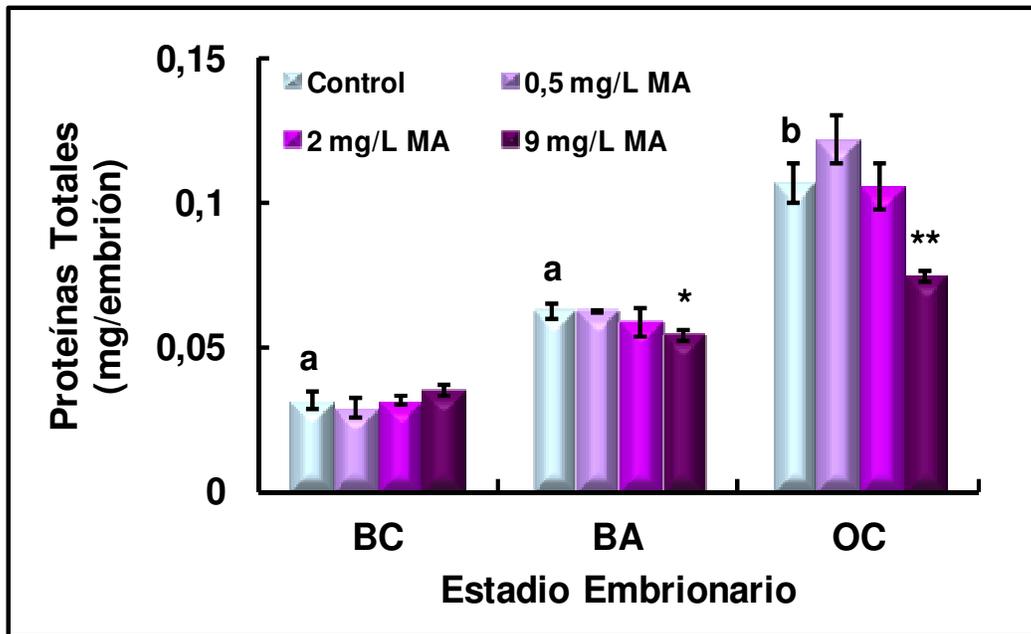


Figura 41: Niveles de proteínas totales en embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a 0 mg/L, 0,5 mg/L, 2 mg/L y 9 mg/L MA desde su fertilización hasta el estadio de OC. Los datos representan la Media \pm ESM de 3 experimentos independientes; cada tratamiento se realizó por duplicado (n=6). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto de los valores control (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$) y letras diferentes indican diferencias significativas de los valores control entre los diferentes estadios embrionarios ($p \leq 0,01$) determinadas por ANOVA-Fisher LSD. MA: metilazinfos; BC: brote caudal; BA: boca abierta; OC: opérculo completo.

3.6. Análisis de correlación entre aparición de malformaciones, niveles de poliaminas y respuesta del sistema antioxidante

Se hizo un análisis de correlación entre las variables de respuesta: poliaminas, incidencia de malformaciones, actividad de ChE, contenido de proteínas, componentes del sistema antioxidante dependientes de GSH (GSH, SeGPx, GR, GST), sistema SOD-CAT, o detoxificante (GST). Para ello, se construyó una matriz de respuesta de 12 variables en función de 12 “casos” que corresponden a los 3 estadios embrionarios,

cada uno con 4 tratamientos (un control y tres concentraciones de MA). Esta matriz se introdujo en el programa NTSYS para el Análisis de Componentes Principales. La primer componente de variabilidad abarca el 60,8% de la respuesta al desarrollo embrionario y los tratamientos con MA, mientras que la segunda componente agrega un 18,5% (79,3% acumulado de variabilidad del sistema experimental). Al evaluar la participación de las variables en ambas componentes, los niveles de poliaminas y la actividad de AChE resultaron ser quienes determinan principalmente la primera componente de variabilidad (C1). La segunda componente de respuesta siempre se encontró ligada a la primera (variabilidad en diagonales), agrupándose las variables GSH-SeGPx, y GST-GR-Proteínas Totales en diferentes direcciones (C2) (Figura 42). El índice de malformaciones claramente mostró una distancia intermedia a todas las demás variables. Al considerar un tercer componente (C3) en el análisis, se observa que éste explica un 14,2% adicional de variabilidad alcanzando un total del 93,5% acumulado de variabilidad; el tercer componente principal está comprendido mayoritariamente por el índice de malformaciones (Figura 43).

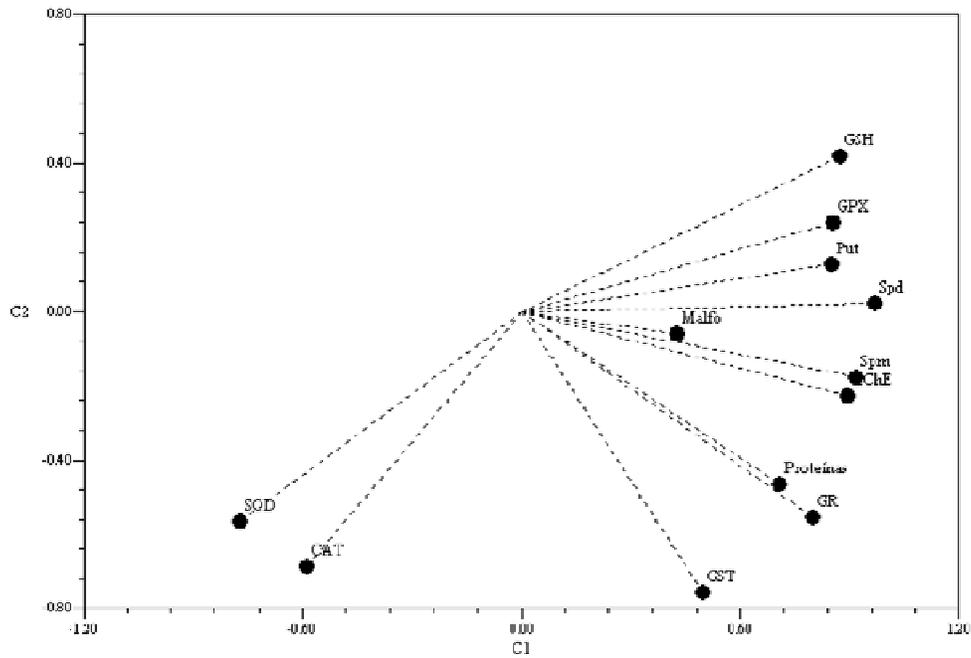


Figura 42: Análisis de componentes principales en la contribución a la variabilidad de la respuesta. Los niveles de poliaminas y la actividad de ChE determinan principalmente la primera componente de variabilidad (60,8%). La segunda componente de respuesta agrupa a las variables GSH-SeGPx, y GST-GR-Proteínas Totales en diferentes direcciones y agrega un 18,5%. ChE: colinesterasa; GR: glutatión reductasa; GSH: glutatión reducido; GST: glutatión S-transferasa; GPX: glutatión peroxidasa Se-dependiente; SOD: superóxido dismutasa; CAT: catalasa; Put: putrescina; Spd: espermidina; Spm: espermina; Malfo: malformaciones; C1: componente principal de variabilidad; C2: segundo componente de variabilidad.

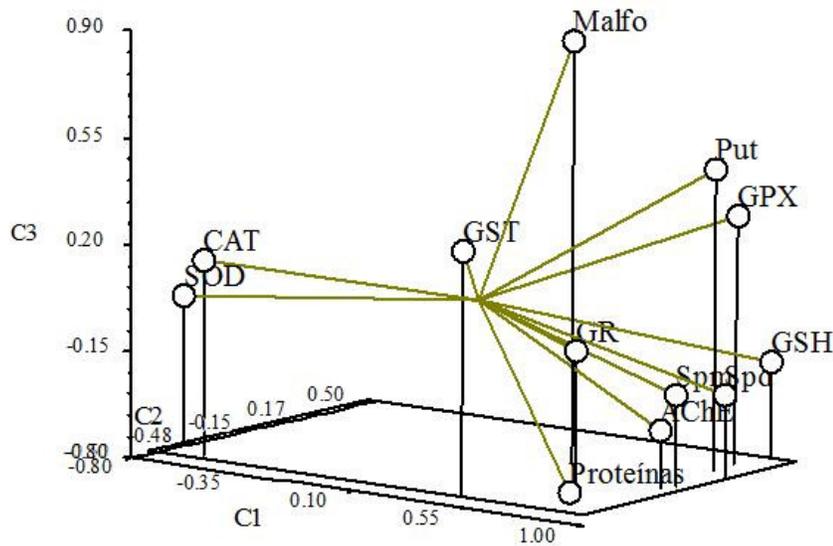


Figura 43: Efecto del tercer componente en la explicación de la variabilidad en el análisis de componentes principales. El tercer componente, correspondiente al índice de malformaciones, explica un 14,2% adicional de variabilidad alcanzando un total del 93,5%. ChE: colinesterasa; GR: glutación reductasa; GSH: glutación reducido; GST: glutación S-transferasa; GPX: glutación peroxidasa Se-dependiente; SOD: superóxido dismutasa; CAT: catalasa; Put: putrescina; Spd: espermidina; Spm: espermina; Malfo: malformaciones; C1: componente principal de variabilidad; C2: segundo componente de variabilidad; C3: tercer componente de variabilidad.

Estas asociaciones pueden analizarse también en la tabla de correlaciones entre variables (Tabla 7). Se observa que el índice de malformaciones se correlaciona bien con los niveles de Put y parcialmente con la actividad de SeGPx. Los niveles de GSH, GR y SeGPx se correlacionan muy bien además con los niveles de poliaminas y con ChE. Los niveles de Proteínas Totales se correlacionan con las poliaminas Spd y Spm, no así con Put; también presentan una buena correlación con ChE y GR. SOD por el contrario se correlaciona inversamente con poliaminas y GSH-SeGPx, situación que ocurriría sólo

parcialmente para CAT que se correlaciona negativamente con GSH. SOD y CAT están altamente correlacionadas, lo cual se explicaría por el hecho de que ambas constituyen uno de los sistemas antioxidantes.

La proyección de casos sobre el plano de las Componentes Principales muestra claramente la separación de las respuestas de las variables en los tres estadios embrionarios (Figura 44). La diferenciación de la respuesta de los 3 estadios está marcada principalmente en la primera componente, dada por la variación de los niveles de poliaminas y la actividad de AChE, también por los niveles de GSH y la actividad de SeGPx, y en menor medida por los niveles de proteína y la actividad de GR. Se observan además diferencias en la respuesta dentro de cada estadio, como producto de los distintos tratamientos con MA. En BC, si bien los tratamientos presentan una cierta distancia entre sí, se observa un leve apartamiento del tratamiento de 9 mg/L MA, que estaría relacionado con un aumento de la actividad de GST y GR. La respuesta diferenciada del tratamiento de 9 mg/L MA se hace más notoria en el estadio de BA; esta diferencia estaría marcada por una caída en la actividad de SeGPx, pero también parece probable que esté indicando la tendencia causada por este tratamiento sobre una disminución de las poliaminas Spd y Spm y sobre la actividad de AChE.

Tabla 7: Coeficientes de Correlación entre las variables de respuesta al tratamiento con MA a lo largo del desarrollo embrionario de *Rhinella arenarum*. El análisis de correlación múltiple entre las variables se realizó mediante el programa NTSYS.

	Put	Spd	Spm	Malfo	Proteína	AChE	GSH	SOD	CAT	GST	GR	SeGPx
Put	1											
Spd	0,73	1										
Spm	0,66	0,92	1									
Malfo	0,79	0,21	0,25	1								
Proteínas	0,3	0,76	0,84	-0,07	1							
AChE	0,58	0,93	0,92	0,11	0,84	1						
GSH	0,72	0,89	0,75	0,19	0,49	0,76	1					
SOD	-0,72	-0,76	-0,55	-0,27	-0,28	-0,54	-0,92	1				
CAT	-0,49	-0,59	-0,43	-0,1	-0,22	-0,37	-0,79	0,83	1			
GST	0,47	0,39	0,49	0,52	0,54	0,53	0,07	0	0,2	1		
GR	0,61	0,77	0,77	0,36	0,84	0,81	0,46	-0,35	-0,11	0,82	1	
SeGPx	0,91	0,78	0,72	0,64	0,32	0,64	0,79	-0,74	-0,55	0,29	0,52	1

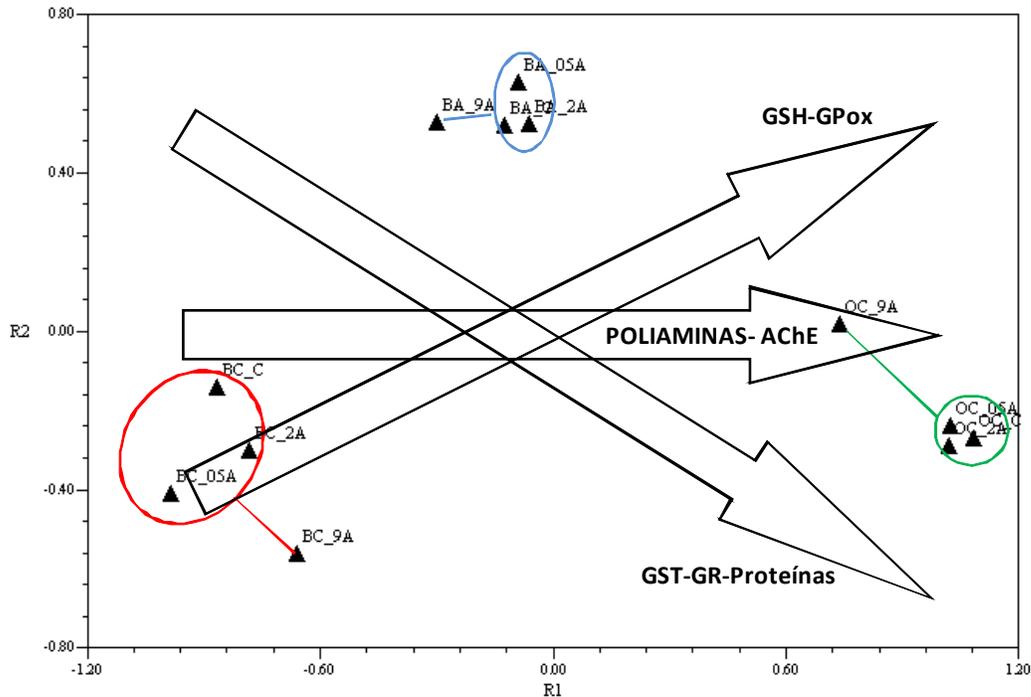


Figura 44: Proyección de estadios embrionarios y tratamientos sobre el plano de los componentes principales de variación. La diferenciación de la respuesta de los 3 estadios está marcada principalmente en la primera componente. Se observan además diferencias en la respuesta dentro de cada estadio debido al tratamiento con 9 mg/L MA. BC: brote caudal; BA: boca abierta; OC: opérculo completo; AChE: acetilcolinesterasa; GR: glutatión reductasa; GSH: glutatión reducido; GST: glutatión S-transferasa; GPox: glutatión peroxidasa Se-dependiente; R1: componente principal de variabilidad; R2: segundo componente de variabilidad.

Cuando se analiza la proyección en el espacio 3D de las componentes principales, se puede ver que en la respuesta al tratamiento con 9 mg/L MA en el estadio de BA contribuye además el índice de malformaciones (Figura 45). La respuesta diferenciada del tratamiento de 9 mg/L MA es máxima y completamente diferente a los otros tratamientos para el estadio de OC. El aporte de las variables de respuesta está dado en este caso también por la

disminución de las poliaminas Spd y Spm junto con la caída de la actividad de ChE y los niveles de proteínas totales y GSH, lo que refleja el deterioro general de los embriones. El análisis de proyección en 3D marca la fuerte influencia de las malformaciones en las respuestas de los embriones que alcanzan el OC bajo el tratamiento con 9 mg/L MA, que también comienza a reflejarse para 2 mg/L MA.

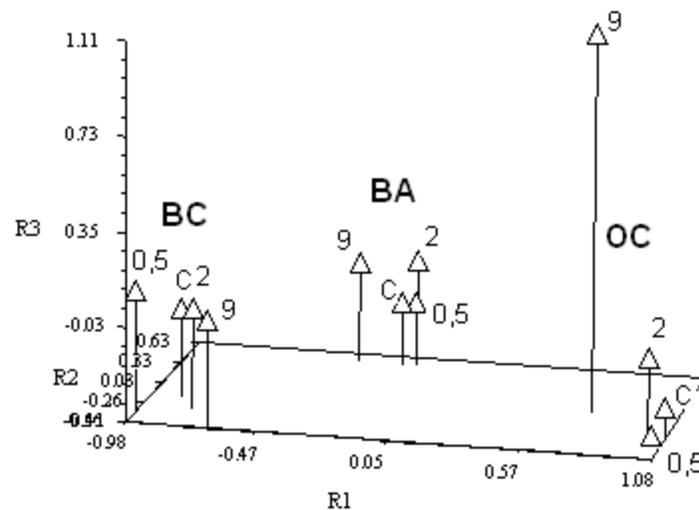


Figura 45: Proyección de estadios embrionarios y tratamientos sobre el espacio 3D de los componentes principales de variación. Se observa la clara influencia de las malformaciones a la variabilidad de la respuesta en embriones expuestos a 9 mg/L MA en el estadio de OC. BC: brote caudal; BA: boca abierta; OC: opérculo completo; C: control; R1: componente principal de variabilidad; R2: segundo componente de variabilidad; R3: tercer componente de variabilidad.

4. DISCUSIÓN

4.1. Metabolismo de poliaminas en embriones de *Rhinella arenarum*

Las poliaminas están involucradas en diferentes procesos biológicos (Igarashi y Kashiwagi, 2000; Wallace et al., 2003). Además, su participación en el desarrollo embrionario ha sido documentada en organismos tales como erizo de mar (Kusunoki y Yasumasu, 1978), peces (Srivastava, 1992), ranas (Russell, 1971; Osborne et al., 1993) y ratones (López-García et al., 2008; Zhao et al., 2008). Se ha demostrado, asimismo, que la regulación coordinada del metabolismo de las poliaminas es indispensable para el funcionamiento del ciclo celular. Se ha determinado en fibroblastos dérmicos humanos que un incremento en el contenido de poliaminas es necesario para la replicación del ADN, mientras que una disminución posterior en sus niveles por acetilación a través de SSAT es necesaria para que culmine el proceso de mitosis (Bettuzzi et al., 1999). La interrupción del ciclo celular así como también el daño al ADN han sido reportados en células epiteliales de riñón que sobreexpresan la enzima SSAT (Zahedi et al., 2007).

El patrón de poliaminas determinado en embriones de *Rhinella arenarum* es coincidente con el de otros anfibios como *Xenopus laevis*. Put es mayoritaria, seguida de Spd, mientras que Spm es la minoritaria o incluso indetectable (Osborne et al., 1993; Russell, 1971). Resultados similares se obtuvieron al analizar los niveles de poliaminas en el gastrópodo *Biomphalaria glabrata* (Cochón et al., 2007). En algunos casos, sin embargo, las poliaminas Spd y/o Spm se vuelven más abundantes que Put, como ocurre en el oligoqueto *Lumbriculus variegatus* (Cochón et al., 2007) y en células en cultivo (Kwak et al., 2003). De acuerdo con lo reportado por Igarashi y Kashiwagi (2010), las poliaminas Put y Spd predominan en células procariotas, de rápido crecimiento, mientras que Spd y Spm predominan en células eucariotas, de proliferación más lenta. Por lo tanto, los altos niveles de Put detectados en embriones de *R. arenarum* en este trabajo podrían ser consecuencia de la elevada proporción de división celular que

experimentan los individuos durante su desarrollo embrionario. Se ha reportado, además, que la alteración del metabolismo de poliaminas y por ende la alteración de sus niveles, afectan el normal desarrollo embrionario. Osborne et al. (1993) reportaron que la concentración intracelular de Spd debe ser mantenida dentro de ciertos niveles con respecto a la de Put para permitir el desarrollo embrionario normal en *X. laevis*. Particularmente, esto se explica por los bajos niveles de ARNm y proteína SAMDC (Shinga et al., 1996). Otra característica observada durante el desarrollo embrionario de *R. arenarum* es el incremento de los niveles de Spd y Spm con respecto a Put a medida que el desarrollo embrionario avanza. En estudios realizados por Ogasawara et al. (1989) se determinó que Spm es la poliamina más potente en la estimulación de la síntesis proteica, seguida por Spd y Put en orden de potencia. Por lo tanto, Igarashi y Kashiwagi (2010) sugieren que la existencia de Spm en organismos eucariotas de crecimiento lento sería una condición favorable tanto a nivel bioquímico como energético.

La enzima ODC es una de las enzimas clave en la regulación del metabolismo de poliaminas. En el presente trabajo, la actividad control de la enzima biosintética ODC disminuyó significativamente al alcanzar el estadio de OC (estadio final del desarrollo embrionario). Estos resultados concuerdan con los reportados por Russell (1971) en el anfibio *X. laevis*, quien determinó que la actividad ODC se incrementaba hasta el estadio 40 (equivalente al estadio de BA en *R. arenarum*) y a partir de ese momento disminuía rápidamente. Sin embargo, estos resultados se diferencian de los obtenidos por Osborne et al. (1991) quienes determinaron que la actividad de ODC se incrementaba desde el estadio de dos células hasta el momento de la *transición de la blástula media* (TBM) y luego decaía rápidamente en la misma especie. La TBM es el momento a partir del cual los embriones comienzan a transcribir sus propios genes. Los estadios embrionarios previos a la TBM se caracterizan por las divisiones celulares sincronizadas (Masui y Wang, 1998), por la represión de la expresión genética del cigoto (Meehana et al., 2005) y por la traducción de ARNm maternos heredados (Sibon et al.,

1997). En *R. arenarum*, la TBM tiene lugar 2 días y medio antes del primer estadio embrionario utilizado en este trabajo (BC), de acuerdo a Del Conte y Sirlin (1952).

La enzima DAO es responsable de la degradación oxidativa de Put y es considerada como la enzima limitante en el catabolismo terminal de poliaminas *in vivo* (Missala y Sourkes, 1980). La actividad de DAO en embriones control de *R. arenarum* sigue una respuesta similar a la de ODC, aunque su magnitud es diferente. Entre los estadios de BC y BA, la actividad DAO se incrementa 4 veces y decae un 21% entre los estadios de BA y OC. Su incremento en el estadio de BA es superior al de ODC mientras que su caída en OC es leve si se la compara con el descenso que experimenta ODC. La razón por la cual las actividades de ODC y DAO disminuyeron significativamente en embriones control de *R. arenarum* en OC no está clara; sin embargo, el incremento sostenido en los niveles de Put, Spd y Spm sugiere un efecto regulatorio de las poliaminas sobre dichas actividades. Por una parte, la actividad de ODC es regulada por las poliaminas a nivel de transcripción y traducción, así como a nivel de la estabilidad del ARNm y la proteína (Pegg, 2009). Por otra parte, se ha reportado que la actividad de DAO es regulada por el contenido de Put en tejidos de rata en una respuesta que involucra la transcripción del gen *dao* y la síntesis de nueva proteína (Perin et al., 1986).

4.2. Efectos del plaguicida metilazinfos sobre el metabolismo de poliaminas en embriones de *Rhinella arenarum*

Considerando la importancia de los anfibios como bioindicadores del estado de contaminación de un ambiente y a pesar de que las poliaminas son reconocidas como policiones esenciales para el desarrollo embrionario normal y que en consecuencia sus niveles se

encuentran altamente regulados, pocos estudios se han realizado a fin de analizar los efectos de sustancias contaminantes sobre el metabolismo de poliaminas. Tal como se mencionó anteriormente, los niveles intracelulares de poliaminas deben ser mantenidos dentro de ciertos límites ya que su disminución interfiere en el crecimiento celular, mientras que un exceso es aparentemente tóxico (Coffino, 2000; Thomas y Thomas, 2001).

La relación entre el metabolismo de poliaminas y la exposición a insecticidas OF ha sido abordada por Venturino et al. (1992, 2001) utilizando larvas de *R. arenarum*. La exposición conjunta de larvas al OF malatión y a Spd exógena potenció la toxicidad del insecticida al incrementar la inhibición de la enzima blanco AChE e impedir la recuperación de su actividad una vez finalizado el ensayo (Venturino et al., 1992). Además, la degradación oxidativa de Spd, con la consecuente producción de sustancias reactivas, compite con el insecticida malatión por la utilización de las reservas del antioxidante GSH y contribuye también a la potenciación de la toxicidad del insecticida (Venturino et al., 2001).

En el presente estudio, la exposición de embriones de *R. arenarum* al insecticida MA alteró el metabolismo de poliaminas. Los embriones expuestos a 9 mg/L MA sufrieron un incremento significativo en las actividades de ODC y DAO en los estadios de BA y OC. El incremento de la actividad de ODC fue acompañado por el aumento significativo de los niveles de Put en dichos embriones en estadio de OC, junto con un descenso significativo de los niveles de Spd y Spm. El incremento en los niveles de Put observado en embriones expuestos a MA en el presente estudio podría constituir un mecanismo de respuesta para compensar la disminución de los niveles de las poliaminas superiores Spd y Spm. El incremento de la actividad ODC en dichos embriones justificaría en parte el incremento observado en los niveles de Put. Del mismo modo, concentraciones subletales del OF malatión inducen un aumento en los niveles de Put y una disminución significativa de Spd y Spm en embriones de *R. arenarum* que alcanzan el estadio de OC. Esta

respuesta de los embriones sería un impulso de recuperación frente a los efectos tóxicos del compuesto, por la cual estimularían la síntesis de Put para mantener los niveles de las poliaminas superiores Spd y Spm (Venturino et al., 2003). Un incremento en los niveles de Put también ha sido reportado en larvas de *X. laevis* expuestas a un agente convulsionante, lo que sugiere un papel neuroprotector de Put debido a su conversión en el neurotransmisor ácido γ -aminobutírico (Bell et al., 2011). Una situación similar ha sido observada en ratones transgénicos expuestos a choques eléctricos a fin de inducir en ellos convulsiones, donde los autores del estudio atribuyeron al incremento de Put un efecto neuroprotector (Halonen et al., 1993). El incremento en los niveles de Put junto a un aumento de los niveles de ODC también ha sido reportado en un modelo de porfiria aguda en rata (Cochón et al., 2002) y en ratas expuestas a hexaclorobenceno (Randi et al., 2003).

La respuesta de los niveles de poliaminas en embriones expuestos a MA coincide con un patrón correspondiente a la sobreexpresión de SSAT, tal como se deduce por modelado matemático del metabolismo de poliaminas (Rodríguez-Caso et al., 2006) y como ha sido comprobado en modelos de ratones transgénicos que sobreexpresan dicha enzima (Cerrada-Giménez et al., 2011). Por otra parte, Bayoumi et al. (2000) reportaron cambios similares en los niveles de poliaminas en células CHO-K1 expuestas al herbicida paraquat por inhibición de la actividad de SAMDC. Sin embargo, Cochón et al. (2007) reportaron que la exposición de *L. variegatus* a una concentración subletal de una formulación comercial de paraquat produjo un efecto opuesto al reportado aquí para *R. arenarum*. Luego de pocas horas en presencia del herbicida, los niveles de Put descendieron significativamente mientras que los niveles de Spd y Spm sufrieron un incremento significativo en el oligoqueto. Los autores sugieren que los niveles incrementados de poliaminas en *L. variegatus* actuarían como barredores de radicales libres y limitarían procesos de lipoperoxidación.

El incremento de las proporciones poliamina/ODC en el presente estudio fue resultado del aumento en los niveles de las tres poliaminas y

la subsecuente disminución de la actividad de ODC en el estadio de OC en embriones control. Por otra parte, a medida que los embriones de *R. arenarum* progresan desde estadios intermedios de desarrollo hacia el estadio de OC, concentraciones crecientes de MA hacen disminuir la proporción Put/ODC. Esto sugiere que los niveles de Put están controlados no sólo por síntesis a través de ODC sino también a través de su degradación por DAO, tal como se verifica en el presente estudio. Debido a que Spd y Spm participan en la regulación de ODC (Pegg, 2006), su disminución en embriones de *R. arenarum* explicaría el efecto que concentraciones crecientes de MA producen sobre las proporciones de Spd/ODC y Spm/ODC en el presente estudio.

De acuerdo con lo expuesto en la Sección 1.4.1., el catabolismo de poliaminas conduce a la producción de especies reactivas tales como el aldehído acroleína y peróxido de hidrógeno. En el caso de pacientes con falla renal crónica, se ha observado que los niveles de Put y de actividad de aminooxidasa se encuentran elevados mientras que los niveles de Spd y Spm se encuentran disminuidos en el plasma. También se observó un incremento en los niveles de acroleína libre y unida a proteína en plasma de dichos pacientes. Resultados similares se observaron en pacientes con otras patologías renales (Sakata et al., 2003). Se ha reportado en células en cultivo, además, que la acroleína dispara la expresión de múltiples genes de fase 2, incluyendo *gst A1* y *gst M1*, en respuesta al agregado de poliaminas exógenas (Kwak et al., 2003). Esta respuesta indica un impacto sobre el sistema de defensa antioxidante que cobraría relevancia cuando la exposición a contaminantes altera no sólo el metabolismo de poliaminas sino también el estado redox celular, lo que provocaría efectos aditivos o sinérgicos.

4.3. Respuesta del sistema de defensa antioxidante de embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a metilazinfos

El estudio del sistema antioxidante de anfibios ha sido abordado desde distintas perspectivas al analizar su respuesta frente a diferentes

factores generadores de estrés. Diversos autores han documentado que la exposición a plaguicidas OF modifica el estado redox celular, lo que podría conducir a la alteración del sistema de defensa antioxidante. Este hecho ha sido ampliamente reportado en especies acuáticas (Ferrari et al., 2008; 2009; Isik y Celik, 2008; Kavitha and Rao, 2008; 2009).

En el presente trabajo, los embriones en estadio de BC expuestos a 0,5 mg/L y 2 mg/L MA mostraron una inducción de la actividad enzimática de GST y GR. Ambas enzimas cumplen papeles protectores al participar en la detoxificación de plaguicidas OF (Jokanović, 2001) y en el reciclado de glutatión oxidado a GSH (Stephensen et al., 2002), respectivamente. La transcripción de sus correspondientes genes ocurre por acción del factor de transcripción Nrf2 (*NF-E2-related factor 2*) a través de su unión al elemento de respuesta antioxidante (*antioxidant response element*; ARE), presente en la región promotora de los genes que codifican para GST y GR (Jaiswal et al., 2004; Harvey et al., 2009). Situaciones tales como estrés oxidativo y/o la alteración del estado redox celular llevan a la liberación del factor de transcripción Nrf2 de su proteína inhibidora (INrf2 o Keap1) y su posterior fosforilación y translocación al núcleo con la consecuente transcripción de genes que codifican para las enzimas del sistema de defensa antioxidante, entre otras. El incremento de actividad de GST y GR en embriones en estadio de BC expuestos a MA podría indicar una respuesta adaptativa que protegería a los embriones de *R. arenarum* de la toxicidad del insecticida. La inducción de GST ha sido postulada previamente como un mecanismo de tolerancia a otros insecticidas en embriones tempranos de *R. arenarum* (Anguiano et al., 2001; Ferrari et al., 2009), así como también en larvas luego de la exposición aguda a MA (Ferrari et al., 2011). El contenido de GSH en embriones en BC no se vio afectado por exposición al plaguicida, lo que refleja un correcto reciclaje de glutatión oxidado a GSH a través de GR. Además de las enzimas dependientes de glutatión, CAT y SOD también desempeñan un papel importante en embriones de *R. arenarum* al detoxificar el peróxido de hidrógeno y el anión superóxido, respectivamente. Su relevancia se pone

de manifiesto ya que ambas enzimas mantienen elevados niveles de actividad control a lo largo del desarrollo embrionario de *R. arenarum* (Ferrari et al., 2008). En el presente trabajo, la actividad de CAT no se vio afectada por la exposición de los embriones en estadio de BC al insecticida MA, a diferencia de SOD cuya actividad fue inhibida significativamente por exposición de los mismos a 2 mg/L y 9 mg/L MA. Esta inhibición podría deberse a la oxidación de grupos sulfhidrilo de residuos cisteína presentes en la enzima (Dimitrova et al., 1994) como consecuencia de especies reactivas generadas por la exposición de los embriones al insecticida MA.

Cuando los embriones expuestos a MA alcanzan el estadio de BA, las actividades de GST y GR retornan a valores control. Esto reflejaría el hecho de que la exposición continua a MA no permite mantener la respuesta protectora establecida previamente en embriones en estadio de BC, probablemente debido al daño ocasionado en las proteínas. Por otra parte, es interesante señalar que la actividad control de GST disminuyó significativamente en embriones en estadio de BA respecto de aquellos en estadio de BC, en concordancia con resultados previamente reportados (Ferrari et al., 2008). Este evento podría deberse a un cambio en el patrón de expresión de isoformas de GST que prepara al embrión para un incremento posterior en la producción de EROs, como reportaron Amicarelli et al. (2004) durante el desarrollo del anuro *Bufo bufo*. Respecto de la actividad de SeGPx, se observó una disminución significativa en embriones en estadio de BA expuestos a 9 mg/L MA lo que confirma la tendencia observada en embriones en estadio de BC. De la misma manera que lo sugerido previamente para GST y GR, esta disminución de actividad podría deberse a daños en la proteína ocasionados por especies reactivas ya que el anión superóxido es capaz de oxidar un residuo de selenocisteína del sitio activo de SeGPx (Blum y Fridovich, 1985). Esta interpretación de los hechos es avalada, a su vez, por la disminución significativa en la actividad de SOD en embriones en estadio de BA expuestos a las tres concentraciones de MA ensayadas, situación que conduce a la acumulación de anión

superóxido. Es importante resaltar que incluso la concentración más baja de MA ensayada (0,5 mg/L) condujo a la inhibición de la actividad enzimática de SOD. En conjunto, estos resultados apuntan hacia un incremento en el estrés oxidativo en individuos expuestos al insecticida MA a medida que el desarrollo embrionario avanza. Esta situación de estrés oxidativo sería capaz de ejercer efectos negativos aún cuando los embriones se encuentren expuestos a bajas concentraciones de MA. Además es importante mencionar que, mientras la exposición de embriones a 0,5 mg/L MA ocasiona alteraciones a nivel bioquímico, su exposición a mayores concentraciones del insecticida produce también alteraciones morfológicas. En el estadio de OC, los embriones de *R. arenarum* expuestos a MA mostraron una disminución significativa de los niveles del antioxidante GSH y esta situación estuvo acompañada de la inhibición de las enzimas ChE y SOD. El descenso de los niveles de GSH es considerado como un valioso biomarcador de estrés oxidativo en otros organismos acuáticos como bivalvos y peces (Peña-Llopis et al., 2002; 2003) así como también en anfibios (Ferrari et al., 2009). Además, la capacidad de mantener elevados niveles de este tripéptido ha sido asociada con un aumento de la supervivencia en mejillones expuestos al OF fenitrotión (Peña-Llopis et al., 2002). En nuestro estudio, además de la inhibición de ChE, se detectó una disminución significativa del nivel de GSH y un incremento significativo en el número de embriones malformados en los individuos en estadio de OC expuestos a 2 mg/L y 9 mg/L MA. Las especies reactivas se acumulan en células que tienen menor contenido de GSH (Freeman et al., 1997) y este hecho está asociado con la alteración del desarrollo embrionario o fetal por daño oxidativo a macromoléculas (Wells et al., 2005).

4.4. Malformaciones en embriones expuestos a metilazinfos; relación con la actividad colinesterasa, el sistema de defensa antioxidante y el metabolismo de poliaminas

La progresión del desarrollo en los embriones de anfibios se caracteriza por la utilización de reservas intracelulares denominadas plaquetas vitelinas (Jorgensen et al., 2009). Durante el desarrollo de *R. arenarum*, los embriones utilizan lípidos neutros como fuente de energía y continuamente transfieren fosfolípidos desde el vitelo a las nuevas membranas que son sintetizadas (Pechen et al., 1974, 1977). De acuerdo con los resultados obtenidos y las observaciones realizadas durante el desarrollo de los experimentos, los embriones expuestos a la concentración letal de 9 mg/L MA sufren un serio retraso en el desarrollo embrionario. A simple vista es posible advertir la disminución del tamaño corporal de dichos embriones y la persistencia de ciertas características morfológicas propias de estadios embrionarios previos, tales como la presencia de branquias externas. Estas observaciones también fueron realizadas en estudios histológicos básicos, a través de los cuales fue posible corroborar el retraso en el desarrollo embrionario. En embriones de *R. arenarum*, las branquias externas comienzan a atrofiarse en el estadio de pliegue opercular y para el final del desarrollo embrionario se encuentran totalmente reabsorbidas. La presencia de branquias externas denota un claro retraso en el desarrollo embrionario; de hecho, la morfología de las branquias que se observa en dichos embriones, junto a la longitud de la aleta caudal, sugieren un grado de desarrollo similar al alcanzado por embriones en estadio de BA (7 días de desarrollo). La presencia de grandes cantidades de vitelo en embriones expuestos a 9 mg/L MA prueba que la tasa de desarrollo de dichos embriones es inferior a la de los controles, cuyas reservas internas de vitelo son escasas.

Numerosos estudios han sido conducidos utilizando anfibios a fin de evaluar los posibles efectos teratogénicos derivados de la exposición de larvas y embriones a diferentes plaguicidas. Las causas de las

alteraciones teratogénicas en organismos acuáticos debida a la contaminación por OF pueden ser diversas y entre ellas se propone en diferentes estudios al estrés oxidativo y la inhibición de la enzima ChE (Colombo et al., 2005; Wells et al., 2009). En *Rhinella arenarum*, la actividad control de ChE se incrementa a lo largo del desarrollo embrionario de manera continua. La actividad ChE en embriones en estadio de OC es 22 veces y 5 veces mayor con respecto a los estadios de BC y BA, respectivamente. En este estudio, los embriones en estadio de BC y BA expuestos a MA no vieron afectada su actividad ChE. Sin embargo, cuando *R. arenarum* alcanza el final de su desarrollo embrionario, la exposición continua a MA ocasiona la inhibición significativa de la actividad de ChE. De acuerdo con lo reportado por Milatovic et al. (2006), como resultado de la acumulación del neurotransmisor acetilcolina y de la sobreestimulación de receptores colinérgicos, se intensifica el flujo de electrones por la cadena transportadora con el consiguiente aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno. Esta situación, derivada de la inhibición de ChE, se sumaría al estrés oxidativo generado por la metabolización del insecticida. Las enzimas ChE son los blancos de acción primarios de los insecticidas OF tanto en vertebrados como en invertebrados y se consideran biomarcadores de exposición a este tipo de compuestos (Abdel-Halim et al., 2006; Laguerre et al., 2009). La exposición de embriones de *X. laevis* a los insecticidas OF clorpirifós y malatión produjo daños a nivel muscular derivados de la inhibición de AChE que se reflejaron principalmente en el aparato muscular de la cola (Bonfanti et al., 2004; Colombo et al., 2005). Sin embargo, en embriones de *R. arenarum* no se verificó correlación entre la aparición de malformaciones y la actividad de ChE. Por otra parte, el edema fue una alteración morfológica detectada con frecuencia en embriones de *R. arenarum* expuestos a MA, al igual que en larvas de *Hyla arborea* y de *Rana ridibunda* expuestas a los OFs dimetoato y malatión, respectivamente (Sayim y Kaya, 2006; Sayim, 2008). Además, las larvas de *R. ridibunda* mostraron retraso en el desarrollo y retuvieron

características morfológicas correspondientes a estadios de desarrollo previos, al igual que los embriones de *R. arenarum* en OC expuestos a 9 mg/L MA. Asimismo, el edema epitelial o *blistering* observado en el presente estudio fue detectado en larvas de *R. ridibunda* expuestas a malatión, conjuntamente con los pliegues y quiebres de la aleta caudal. Todas las alteraciones morfológicas observadas durante esta investigación perjudicaron a los embriones de *R. arenarum* expuestos a MA al impedir que adoptaran una posición de nado y de alimentación correctas. Además, la exposición al insecticida modificó la conducta natatoria al provocar contracciones musculares no coordinadas. Diversos estudios han reportado modificaciones del comportamiento de anfibios por exposición a OFs, tales como una disminución en la capacidad de nado y en el consumo de alimento (Gurushankara et al., 2007; Wijesinghe et al., 2010). Todas las alteraciones observadas podrían repercutir en el desempeño de los embriones de *R. arenarum* en su hábitat natural, así como también podrían afectar su progresión hacia la metamorfosis (Sparling y Fellers, 2009).

Recientemente se analizó la respuesta del sistema de defensa antioxidante en embriones de *R. arenarum* expuestos al herbicida paraquat y se documentaron las malformaciones durante su desarrollo (Mussi y Calcaterra, 2010). A pesar de que la exposición al herbicida fue de sólo 2 horas, fue suficiente para reducir la capacidad de desarrollo normal de los embriones y causó arresto en el desarrollo y malformaciones severas. También se observó una respuesta del sistema de defensa antioxidante por incremento de la actividad de SOD. En el presente trabajo, la exposición de embriones de *R. arenarum* al insecticida organofosforado MA ocasionó un incremento en el porcentaje de embriones malformados que llegó a ser del 100% en embriones en el estadio OC expuestos a 9 mg/L MA. Dichos embriones también sufrieron una alteración en su sistema de defensa antioxidante, con una inhibición significativa de la actividad de SOD y una disminución de las reservas de GSH.

Es importante asimismo tener en cuenta las alteraciones en los niveles de poliaminas observadas en el estadio de OC en embriones de *Rhinella arenarum* expuestos MA. Diversos estudios reportan que la disminución de los niveles de poliaminas impide la normal progresión del ciclo celular así como también la proliferación y el crecimiento celular (Scorcioni et al., 2001; Zahedi et al., 2007). Los embriones de *R. arenarum* expuestos a 9 mg/L MA experimentaron una disminución significativa de los niveles de las poliaminas superiores Spd y Spm, lo que podría explicar la reducción en el grado de desarrollo embrionario observada en dichos individuos. Un incremento significativo en los niveles de Put también fue observado en dichos embriones y se encontró correlacionado positivamente con la aparición de malformaciones. Este aumento del nivel de Put puede deberse al incremento de la actividad de ODC observada en este trabajo. Asimismo, podría asociarse a un aumento de la degradación catabólica de las poliaminas superiores.

4.5. La expresión de protooncogenes y el metabolismo de poliaminas

Las MAPKs (*quinasas de proteínas activadas por mitógenos*) se encuentran conservadas evolutivamente en eucariotas y su función es la de conectar receptores de la superficie celular con sus dianas intracelulares. La familia de MAPK incluye tres subfamilias: ERKs (*quinasas reguladas por señales extracelulares*), JNKs (*quinasas de extremo N-terminal de c-jun*) y p38 MAPKs (Boulton y Cobb, 1991; Han et al., 1995; Kyriakis et al., 1994). Una vez que las ERKs son activadas, se translocan al núcleo celular donde fosforilan y activan diversos factores de transcripción, entre los que se incluye AP-1. El factor AP-1 está compuesto por proteínas pertenecientes a las familias Fos y Jun, cuyos genes *c-fos* y *c-jun* son genes de respuesta temprana. Las vías de señalización por MAPKs regulan la actividad de AP-1 por estimulación de la transcripción de dichos genes y por fosforilación de las proteínas

que lo componen. AP-1 puede estar compuesto por diferentes combinaciones de hetero- u homodímeros y dicha composición determina los genes que regula. La familia de proteínas Fos comprende diversos miembros como c-Fos, FosB, Fra-1 y Fra-2, mientras que la familia de proteínas Jun comprende a c-Jun, JunB y JunD. Miembros de la familia Fos heterodimerizan con miembros de la familia Jun para constituir el factor de transcripción AP-1. Los heterodímeros Jun-Fos son más estables y más potentes en su unión al ADN que los homodímeros Jun-Jun, mientras que los homodímeros Fos-Fos no son estables. La quinasa JNK fosforila a c-Jun sobre su dominio de transactivación con lo que potencia su capacidad para inducir la transcripción. De manera similar, ERK fosforila a c-Fos potenciando su capacidad de transactivación y estabiliza los heterodímeros de AP-1 (Halazonetis et al., 1988; Kouzarides y Ziff, 1988; Smeal et al., 1992). En el caso de células PC12 se ha determinado que c-Fos estimula en forma directa la transcripción del gen *odc* al unirse a secuencias regulatorias *cis* (Wrighton y Busslinger, 1993).

En el presente trabajo se analizó el nivel de expresión de la proteína c-Fos en embriones de *R. arenarum*. La expresión de dicho factor de transcripción varió ampliamente dependiendo del estadio embrionario analizado. La presencia de bandas de diferentes pesos moleculares podría deberse a que el anticuerpo utilizado reconoce diferentes miembros de la familia Fos, tales como c-Fos, FosB, Fra-1 y Fra-2. Se ha reportado en *Rana esculenta* la presencia de proteínas Fra de 43 kDa en testículo de adultos, junto a otra proteína de 68 kDa correspondiente a Fos (Cobellis et al., 2002, 2003). La señal de 33-34 kDa podría corresponder a proteínas Fra en embriones de *Rhinella arenarum* y las señales de 64-67,4 kDa corresponderían a c-Fos. La banda de 20 kDa detectada en embriones en OC expuestos a 9 mg/L MA podría corresponder a productos de degradación de proteínas de la familia Fos. En el estadio de BA, la señal correspondiente a c-Fos fue detectada tanto en embriones control como expuestos a MA y tanto en sobrenadante como en extractos nucleares, mientras que la señal

correspondiente a proteínas Fra fue detectada sólo en sobrenadante de 1000 x *g*. La exposición de dichos embriones a las tres concentraciones de MA utilizadas en este estudio ocasionó un incremento significativo de los niveles de c-Fos en núcleo, coincidiendo con el aumento de actividad de ODC en embriones expuestos a 9 mg/L MA. Resultados similares fueron obtenidos por Randi et al. (2003) en ratas expuestas al carcinógeno HCB, quienes sugieren que el incremento de actividad de ODC sería consecuencia de la inducción de protooncogenes, entre ellos c-Fos, lo que contribuiría a la promoción de tumores por HCB. En embriones de *R. arenarum*, los cambios a nivel de proteínas de la familia Fos ocurren antes de que se registren alteraciones a nivel bioquímico en los niveles de poliaminas y ODC y a bajas concentraciones de MA en las cuales no se registra alteración alguna en el metabolismo de poliaminas. No fue posible analizar los niveles de la proteína c-Jun, que heterodimeriza con c-Fos, ya que el anticuerpo utilizado no reconoció dicha proteína en *R. arenarum*. Sin embargo, los estudios realizados en *R. arenarum* con el OF clorpirifós, indican también una relación entre la regulación sobre AP-1 y la actividad de ODC que se expresa de manera temprana (Sotomayor, 2011). En este caso, la exposición a una concentración subletal de clorpirifós (2 mg/L) causa en embriones en estadio de BC una disminución de los niveles proteicos de los factores de transcripción c-Jun, c-Fos y del estado activado de AP-1, acompañado de una disminución de ERK1/2. Esta alteración de la señalización por clorpirifós precedería también a la disminución de la actividad de ODC y de los niveles de Put y Spd, que se observa a concentraciones subletales mayores (4 mg/L).

4.6. Análisis integrado de los efectos observados en embriones de *Rhinella arenarum* por exposición a metilazinfos

Se llevó a cabo un análisis estadístico cualitativo de las respuestas de todas las variables bioquímicas analizadas en el presente trabajo, en función de los dos factores en juego: el avance del desarrollo embrionario y el tratamiento con las diferentes concentraciones de MA. El mismo tuvo por objeto determinar si hay respuestas paralelas en algunas variables (covarianza, correlación) y cuáles parámetros bioquímicos son los que podrían responder de manera preponderante a ambos factores. El análisis de componentes principales muestra una clara separación de los 3 estadios embrionarios analizados en el plano de los componentes principales de variabilidad. La mayor fuente de variabilidad entre los estadios está marcada por el patrón creciente de las poliaminas y la actividad de ChE en primer término. También intervienen, en ambas componentes principales de respuesta, el GSH y las enzimas del sistema antioxidante dependientes de GSH. Esto coincide con el aumento de la participación de este sistema antioxidante en la protección de los embriones de anfibio al alcanzar estadios que tienen una mayor exposición al oxígeno ambiental (Ferrari et al., 2008; Rizzo et al., 2007). A su vez, el tratamiento con la concentración letal de 9 mg/L MA se aleja del agrupamiento constituido por los tratamientos control y con concentraciones subletales de MA. Esto demuestra que los embriones responden fuertemente al ser expuestos a 9 mg/L MA. La variabilidad que aportan los diferentes estadios embrionarios es superior a la variabilidad que se verifica entre los tratamientos, con la excepción de la respuesta a 9 mg/L MA, principalmente en el estadio de OC. Esta situación remarca la importancia que tiene la evolución de los distintos sistemas de protección y/o blancos de acción de tóxicos a lo largo del desarrollo embrionario. Por otra parte, desde el punto de vista de un buen biomarcador temprano o sensible, resulta importante destacar que concentraciones subletales de MA como las utilizadas en

este trabajo generaron la respuesta de la actividad enzimática de SOD y los niveles proteicos del factor de transcripción c-Fos. Se observa además que cuando se incluye el tercer componente principal, la aparición de malformaciones tiene una elevada contribución a la variabilidad. Al mismo tiempo se observa una contribución inversa de las variables Proteínas Totales y ChE, lo que refleja el elevado deterioro generalizado de los embriones malformados como consecuencia de la exposición a MA.

Concluyendo, los niveles de poliaminas se vieron afectados en el estadio de OC por exposición a MA, con un incremento de Put y un descenso en los niveles de Spd y Spm. Tanto la actividad de ODC (enzima limitante en la biosíntesis de Put) como la de DAO (enzima limitante en el catabolismo de Put), se incrementaron en los estadios de BA y de OC como consecuencia de la exposición a MA. Un probable mecanismo de inducción de ODC sería la activación y translocación de c-Fos al núcleo, como consecuencia de la activación vía ERK1/2 por estrés oxidativo (Sotomayor, 2011).

Como se ha mencionado anteriormente, el incremento de Put se condice con el aumento de actividad de ODC y sería una consecuencia directa de su elevada actividad. Sin embargo, las poliaminas sintetizadas a partir de Put sufren un descenso en sus niveles, hecho que no concuerda con un posible incremento del flujo de intermediarios a través de la vía metabólica. La disminución de los niveles de Spd y Spm en embriones expuestos a MA podría deberse a dos circunstancias:

- a) una inhibición de la actividad de SAMDC;
- b) un incremento en la degradación oxidativa de Spd y Spm a través de SSAT/APAO.

En caso de que la actividad de SAMDC estuviese inhibida, los embriones serían incapaces de sintetizar Spd y Spm debido a la carencia de grupos aminopropilo, proporcionados por SAMDC, que se adicionarían sobre Put. De este modo, Put se acumularía pero no sería

posible convertirla en las poliaminas superiores Spd y Spm. En el caso de que estuviese incrementada la degradación oxidativa de Spd y Spm a través de SSAT/APAO, el incremento de Put no sólo sería consecuencia de la mayor actividad de ODC sino que también se debería a la conversión de Spd y Spm en Put, hecho que supondría una actividad normal de SAMDC. Cualquiera sea la circunstancia imperante, el incremento de la actividad de DAO aumentaría la tasa de degradación de Put, disminuyendo los efectos tóxicos derivados de su acumulación. Esto conduciría a un “ciclo” continuo de síntesis de Put a través de ODC con posterior degradación vía DAO. Los mecanismos de acción y respuesta de MA sobre el desarrollo embrionario de *Rhinella arenarum* a través del metabolismo de poliaminas se resumen en la Figura 46.

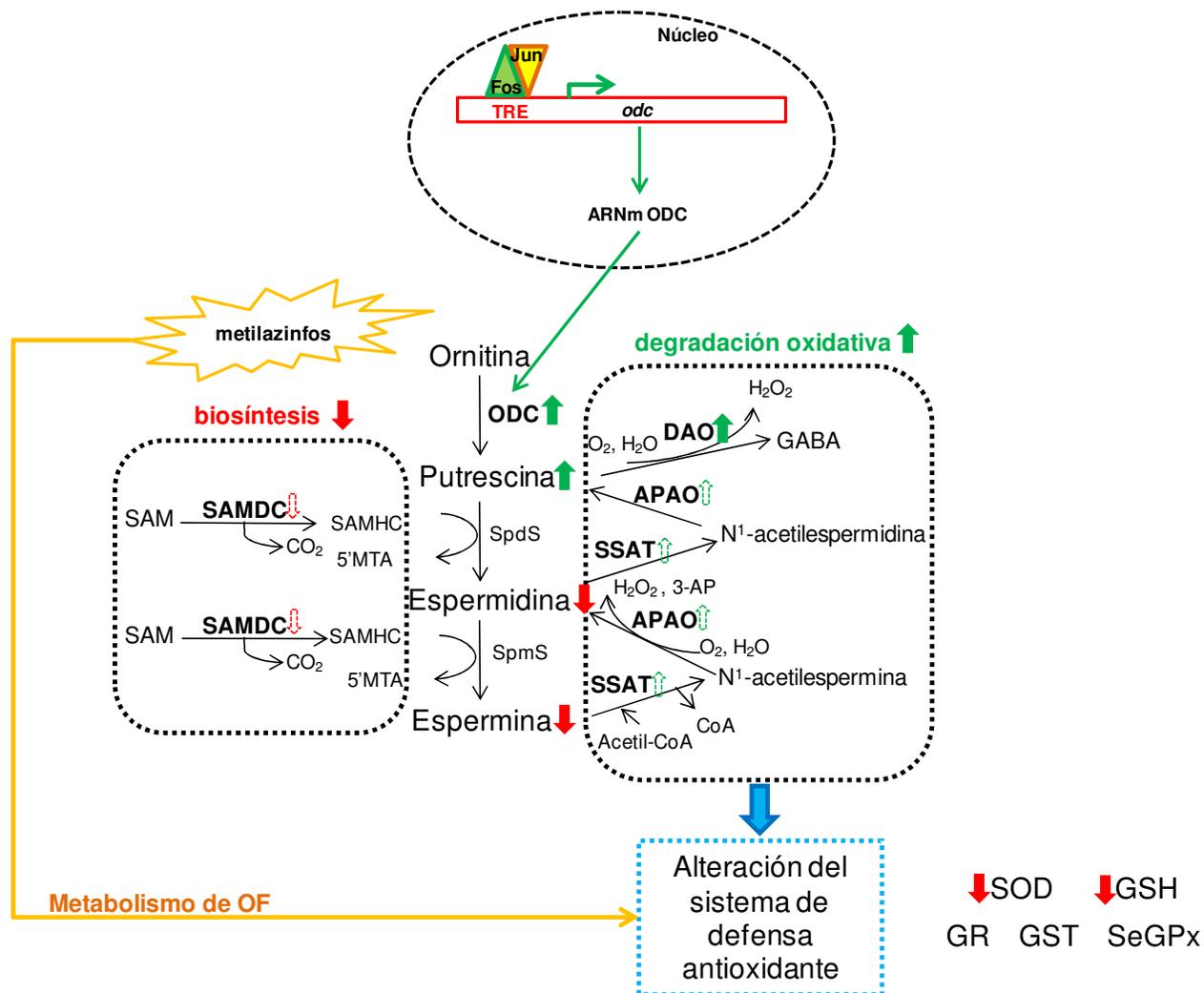


Figura 46: Resumen de los efectos observados en embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a MA. Las flechas llenas indican que los efectos han sido establecidos en este trabajo de tesis. Las flechas vacías indican la respuesta posible del parámetro de acuerdo con la interpretación de los resultados obtenidos. AP: 3-aminopropanal; CoA: Coenzima A; DAO: diamino oxidasa; GABA: ácido γ -aminobutírico; ODC: ornitina decarboxilasa; APAO: acetilpoliamino oxidasa; SAM: S-adenosilmetionina; SAMDC: S-adenosilmetionina decarboxilasa; SAMHC: S-adenosilmetionina homocisteína; SpdS: espermidina sintetasa; SpmS: espermina sintetasa; SSAT: espermidina/espermina N¹-acetiltransferasa; 5'MTA: 5'-metiltioadenosina; SOD: superóxido dismutasa; GSH: glutatión reducido; GR glutatión reductasa; GST: glutatión S-transferasa; SeGpx: glutatión peroxidasa Se-dependiente.

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que las defensas antioxidantes de *Rhinella arenarum* se ven alteradas en embriones tempranos expuestos a MA. Estos efectos tempranos fueron seguidos por la aparición de alteraciones morfológicas, mientras que el contenido de GSH y la actividad de ChE disminuyeron en los embriones expuestos sobre el final del desarrollo embrionario, luego de 10 días de exposición a MA. Las alteraciones observadas en la actividad de las enzimas SOD y GST en estadios tempranos de desarrollo y a concentraciones subletales de MA podrían ser consideradas como marcadores tempranos de exposición a dicho insecticida.

A medida que progresa el desarrollo embrionario normal de *Rhinella arenarum*, los niveles de poliaminas se incrementan y adquieren mayor importancia las poliaminas superiores Spd y Spm con respecto a Put. Esta situación involucra un cambio dramático en las actividades de ODC y DAO, enzimas limitantes en la biosíntesis y degradación de Put, respectivamente. El insecticida MA altera el metabolismo de poliaminas al provocar un descenso en los niveles de Spd y Spm en paralelo con una disminución en el grado de desarrollo embrionario.

Los resultados obtenidos demuestran que el insecticida MA, aún a concentraciones subletales, constituye una seria amenaza para los embriones de *Rhinella arenarum* que se desarrollan en ambientes acuáticos naturales ya que las alteraciones bioquímicas y morfológicas podrían disminuir su capacidad de hacer frente a una situación de estrés ambiental.

5. CONCLUSIONES

La exposición continua/sub-crónica al insecticida MA desde fertilización afecta, en forma progresiva y dependiente de la concentración, el desarrollo embrionario de *Rhinella arenarum*.

La alteración y el arresto del desarrollo embrionario de *Rhinella arenarum* por exposición a MA están relacionados con su efecto sobre el metabolismo de las poliaminas, particularmente con el incremento de Put y la disminución de Spd y Spm.

El efecto de MA sobre el metabolismo de poliaminas puede estar conectado con el estrés oxidativo a través de efectos sobre cascadas de fosforilación y factores de transcripción como c-Fos, que regulan la enzima clave ODC.

Las alteraciones del desarrollo embrionario pueden también estar relacionadas con el aumento de estrés oxidativo asociado a la degradación de poliaminas y/o detoxificación del OF.

A concentraciones subletales de MA, las respuestas de las enzimas GST y SOD, así como del factor de transcripción c-Fos, constituyen biomarcadores tempranos que se manifiestan antes que el daño irreversible en el desarrollo embrionario.

Los embriones de *Rhinella arenarum* que se desarrollan en ambientes acuáticos de la región productiva del Alto Valle de Río Negro y Neuquén pueden verse expuestos a concentraciones subletales del insecticida MA y de esta manera sufrir alteraciones bioquímicas que pueden alterar su desarrollo, disminuir su capacidad para hacer frente a situaciones de estrés ambiental y afectar su supervivencia.

6. PERSPECTIVAS
FUTURAS

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, resulta interesante plantear las siguientes líneas de avance:

1. Profundizar el estudio del impacto de plaguicidas organofosforados sobre el metabolismo oxidativo de poliaminas. Las alteraciones en el desarrollo embrionario observadas en el presente estudio podrían ser debidas a un aumento en la generación de especies reactivas como consecuencia de la degradación oxidativa de poliaminas. Por lo tanto, el estudio a nivel transcripcional, traduccional y post-traduccional de las enzimas SSAT y APAO, limitantes en el catabolismo de poliaminas, permitiría determinar las causas principales por las cuales se observan alteraciones en los niveles de poliaminas como consecuencia de la exposición a MA.
2. Realizar el análisis inmunohistoquímico de dichas enzimas como así también de marcadores de daño oxidativo y especies reactivas generadas por degradación de poliaminas. Esto permitiría establecer su distribución tisular en los embriones de *Rhinella arenarum* y determinar el sitio de mayor impacto.
3. Completar el estudio de la biosíntesis de poliaminas y el efecto del OF sobre el mismo. La actividad de la enzima SAMDC es otro punto interesante sobre el cual se podría progresar ya que su actividad es limitante durante la biosíntesis de poliaminas y una disminución de la misma también explicaría las variaciones en los niveles de poliaminas observados en el presente estudio.
4. Completar el estudio de la expresión de ODC en el desarrollo embrionario de *Rhinella arenarum* y los efectos de plaguicidas OF sobre el mismo. En este trabajo no se logró determinar la proteína ODC por Western Blot, ni la expresión de su ARNm por RT-PCR. Se plantea por una parte la búsqueda de otros anticuerpos que puedan reconocer epitopes de ODC de *Rhinella arenarum* en su forma desnaturalizada y/o utilizar otras técnicas semicuantitativas para detectar su forma nativa. Por otra parte, se

analizará si los cebadores utilizados a partir de las secuencias de *odc* 1 y 2 de *Xenopus laevis* reconocen zonas conservadas a fin de decidir si diseñan nuevos cebadores o si se ensayan nuevas condiciones para la retrotranscripción y la reacción de PCR.

5. Profundizar en los estudios de cascadas de fosforilación y señalización, así como en los factores de transcripción involucrados en la regulación de *odc* y la acción de metilazinfos, en embriones de *Rhinella arenarum*.

De esta manera, se establecería fehacientemente el efecto de plaguicidas organofosforados, como MA, sobre el metabolismo de poliaminas en embriones de *Rhinella arenarum*. El avance en las líneas de trabajo citadas anteriormente permitiría aportar información concluyente sobre la utilidad de los distintos actores de la vía metabólica de las poliaminas como biomarcadores en la evaluación del impacto ambiental de plaguicidas organofosforados.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Halim KY, Salama AK, El-khateeb EN, Barky NM. Organophosphorus pollutants (OPP) in aquatic environment at Damietta Governorate, Egypt: implications for monitoring and biomarker responses. *Chemosphere*. 2006; 63:1491-1498.
- Amicarelli F, Falone S, Cattani F, Alamanou MT, Bonfiglia A, Zarivia O, Miranda M, Ragnelli AM, Di Ilio C. Amphibian transition to the oxidant terrestrial environment affects the expression of glutathione S-transferases isoenzymatic pattern. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1691:181-192.
- Anguiano OL, Caballero de Castro AC, Pechen de D'Angelo AM. The role of glutathione conjugation in the regulation of early toad embryos' tolerance to pesticides. *Comp Biochem Physiol*. 2001; 128C:35-43.
- Anguiano OL, Ferrari A, Soleño J, Martínez MC, Venturino A, Pechen de D'Angelo AM, Montagna CM. Enhanced esterase activity and resistance to azinphosmethyl in target and nontarget organisms. *Environ Toxicol Chem*. 2008; 27(10):2117-2123.
- Anguiano OL, Montagna CM, Chifflet de Llamas M, Pechen de D'Angelo AM. Comparative toxicity of parathion in early embryos and larvae of the toad, *Bufo arenarum* Hensel. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1994; 52:649-655.
- Anguiano OL, Pechen de D'Angelo AM. Provincia de Río Negro y Provincia de Neuquén, en: La problemática de los agroquímicos y sus envases, la incidencia en la salud de los trabajadores, la población expuesta y el ambiente. Ministerio de Salud de la Nación, OPS/OMS, Buenos Aires. 2007. p 181-201.
- Auvinen M, Laine A, Paasinen SA, Kangas A, Kangas L, Saksela O, Andersson LC, Holta E. Human ornithine decarboxylase-overproducing NIH3T3 cells induce rapidly growing, highly vascularized tumors in nude mice. *Cancer Res*. 1997; 57:3016-3025.
- Bachrach U, Wang YC, Tabib A. Polyamines: new cues in cellular signal transduction. *News Physiol Sci*. 2001; 16:106-109.
- Bagnyukova TV, Chahrak OI, Lushchak VI. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. *Aquat Toxicol*. 2006; 78:325-331.
- Bantle JA, Dumont JN, Finch RA, Linder G. Atlas of Abnormalities: A Guide for the Performance of FETAX. Stillwater, OK: Oklahoma State Publications, 1991.
- Barbieri FD. Biochemical mechanisms of fertilization. En: *Physiopathology of hypophysial disturbances and diseases of reproduction*. 1982, Ed Riss, AR, Inc New York, USA.

- Basack SB, Oneto ML, Fuchs JS, Wood EJ, Kesten EM. Esterases of *Corbicula fluminea* as biomarkers of exposure to organophosphorus pesticides. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1998; 61(5):569-76.
- Bayoumi AE, Perez-Pertejo Y, Ordóñez C, Reguera RM, Cubría JC, Balaña-Fouce R, Ordóñez D. Alterations on polyamine content and glutathione metabolism induced by different concentrations of paraquat in CHO-K1 cells. *Toxicol In Vitro*. 2000; 14(3):211-217.
- Becker CG, Fonseca CR, Haddad CF, Prado PI. Habitat split as a cause of local population declines of amphibians with aquatic larvae. *Conserv Biol*. 2010; 24(1):287-294.
- Bell MR, Belarde JA, Johnson HF, Aizenman CD. A neuroprotective role for polyamines in a *Xenopus* tadpole model of epilepsy. *Nat Neurosci*. 2011; 14(4):505-512.
- Bettuzzi S, Davalli P, Astancolle S, Pinna C, Roncaglia R, Boraldi F, Tiozzo R, Sharrard M, Corti A. Coordinate changes of polyamine metabolism regulatory proteins during the cell cycle of normal human dermal fibroblasts. *FEBS Lett*. 1999; 446(1):18-22.
- Blum J, Fridovich I. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch Biochem Biophys*. 1985; 240(2):500-508.
- Bonfanti P, Colombo A, Orsi F, Nizzetto I, Andrioletti M, Bacchetta R, Mantecca P, Fascio U, Vailati G, Vismara C. Comparative teratogenicity of Chlorpyrifos and Malathion on *Xenopus laevis* development. *Aquat Toxicol*. 2004; 70:189-200.
- Boulton TG, Cobb MH. Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. *Cell Regul*. 1991; 2:357-371.
- Brackett BG. *In vitro* fertilization: a potential means for toxicity testing. *Environ Health Perspect*. 1978; 24:1893-1900.
- Brigelius-Flohé R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Rad Biol Med*. 1999; 27(9-19):951-965.
- Buratti FM, Volpe MT, Meneguz A, Vittozzi L, Testai E. CYP-specific bioactivation of four organophosphorothioate pesticides by human liver microsomes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2003; 186(3):143-54.
- Caballero de Castro AC, Rosenbaum EA, Pechen de D'Angelo AM. Effect of malathion on *Bufo arenarum* Hensel development-I. Esterase inhibition and recovery. *Biochem Pharmacol*. 1991; 41:491-495.
- Cantore ML, De Recondo ME, Recondo EF. Nucleotides and sugar nucleotides in early development of *Bufo arenarum*. Coelomic oocytes. *Arch Biochem Biophys*. 1977; 180:269-275.

- Cao Y, Zhao H, Hollemann T, Chen Y, Grunz H. Tissue-specific expression of an Ornithine decarboxylase paralogue, XODC2, in *Xenopus laevis*. *Mech Dev*. 2001; 102:243-246.
- Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol*. 1985; 113, 484-490.
- Casero Jr RA, Pegg AE. Polyamine catabolism and disease. *Biochem J*. 2009; 421:323-338.
- Cerrada-Gimenez M, Pietilä M, Loimas S, Pirinen E, Hyvönen MT, Keinänen TA, Jänne J, Alhonen L. Continuous oxidative stress due to activation of polyamine catabolism accelerates aging and protects against hepatotoxic insults. *Transgenic Res*. 2011; 20(2):387-396.
- Clark AG. The comparative enzymology of the glutathione S-transferases from non-vertebrates organisms. *Comp Biochem Physiol*. 1989; 92B:419-446.
- Cobellis G, Meccariello R, Fienga G, Pierantoni R, Fasano S. Cytoplasmic and nuclear Fos protein forms regulate resumption of spermatogenesis in the frog, *Rana esculenta*. *Endocrinology*. 2002; 143(1):163-170.
- Cobellis G, Meccariello R, Minucci S, Palmiero C, Pierantoni R, Fasano S. Cytoplasmic versus nuclear localization of Fos-related proteins in the frog, *Rana esculenta*, testis: in vivo and direct in vitro effect of a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biol Reprod*. 2003; 68(3):954-960.
- Cochón AC, Della Penna AB, Kristoff G, Piol MN, San Martín de Viale LC, Verrengia Guerrero NR. Differential effects of paraquat on oxidative stress parameters and polyamine levels in two freshwater invertebrates. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2007; 68(2):286-292.
- Cochón AC, González N, San Martín de Viale LC. Effects of the porphyrinogenic compounds hexachlorobenzene and 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine on polyamine metabolism. *Toxicology* 2002; 176:209-219.
- Coffino P. Polyamines in spermiogenesis: not now, darling. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2000; 97(9):4421-4423.
- Colombo A, Orsi F, Bonfanti P. Exposure to the organophosphorus pesticide chlorpyrifos inhibits acetylcholinesterase activity and affects muscular integrity in *Xenopus laevis* larvae. *Chemosphere*. 2005; 61:1665-1671.
- Cona A, Rea G, Botta M, Corelli F, Federico R, Angelini R. Flavin-containing polyamine oxidase is a hydrogen peroxide source in the oxidative response to the protein phosphatase inhibitor cantharidin in *Zea mays* L. *J Exp Bot*. 2006; 57:2277-2289.

- Corbett JR. The biochemical mode of action of pesticides. Academic Press Inc. London, 1974.
- Costa LG. Basic Toxicology of Pesticides. Occupational Medicine: State of Art Reviews. Philadelphia, Hanley & Belfus, Inc. 1997; 12(2):251–267.
- Costa MJ, Monteiro DA, Oliveira-Neto AL, Rantin FT, Kalinin AL. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original. *Ecotoxicology*. 2008; 17:153–163.
- Crawford AJ, Lips KR, Bermingham E. Epidemic disease decimates amphibian abundance, species diversity, and evolutionary history in the highlands of central Panama. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 3;107(31):13777–13782.
- Czarniewska A, Kasprzyk A, Ziemnicki K. Effect of paraquat and metoxychlor on antioxidant enzymes in frog *Rana esculenta* L liver. *Biol Lett*. 2003 ;40:125–133.
- Davies KJA. Oxidative stress, the paradox of aerobic life. En: Free Radical and Oxidative Stress: Environment, Drugs and Food Additives Ed. Rice-Evans C, Halliwell B, Land GG. London; Portland Press; 1995. p 1–31.
- de Llamas MC, Caballero de Castro AC, Pechen de D'Angelo AM. Cholinesterase activities in developing amphibian embryos following exposure to the insecticides dieldrin and malathion. *Arch Environ Contam Toxicol*. 1985; 14:161–166.
- Del Conte E, Sirling JL. Pattern series of the first embryonary stages in *Bufo arenarum*. *Anat Rec*. 1952; 112:125–130.
- Devillers J, Exbrayat JM. Ecotoxicity of chemicals to amphibians. Handbooks of ecotoxicological data. 1992; Vol I. Gordon and Breach Science Publishers.
- Dimitrova MST, Tsanova V, Velcheva V. Combined effect of zinc and lead on the hepatic superoxide dismutase–catalase system in carp (*Cyprinus carpio*). *Comp Biochem Physiol C*. 1994; 108:43–46.
- Donato NJ, Rotbein J, Rosenblum MG. Tumor necrosis factor stimulates ornithine decarboxylase activity in human fibroblasts and tumor target cells. *J Cell Biochem*. 1991; 46:69–77
- Dumpert K, Zeits CA. Platanna (*Xenopus laevis*) as a test organism for determining the embryotoxic effects of environmental chemicals. *Ecotoxicol Environ Saf*. 1984; 8:55–74.
- Durmaz H, Sevgiler Y, Üner N. Tissue-specific antioxidative and neurotoxic responses to diazinon in *Oreochromis niloticus*. *Pestic Biochem Physiol*. 2006; 84:215–226.

- Echandi G, Algranati ID. Defective 30S ribosomal particles in a polyamine auxotroph of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1975; 67:1185-1191.
- Ecobichon DJ. Introduction En: *Pesticides and Neurological diseases*. Ecobichon DJ and Joy RM. 1982, Chapter 1, pp 1-12. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Elias S, Bercovich B, Kahana C, Coffino P, Fischer M, Hilt W, Wolf DH, Ciechanover A. Degradation of ornithine decarboxylase by the mammalian and yeast 26S proteasome complexes requires all the components of the protease. *Eur J Biochem*. 1995; 229:276-283.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres Jr. V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961; 7:88-95.
- Erez O, Goldstaub D, Friedman J, Kahana C. Putrescine Activates Oxidative Stress Dependent Apoptotic Death in Ornithine Decarboxylase Overproducing Mouse Myeloma Cells. *Exp Cell Res*. 2002; 281:148-156.
- Ertl RP, Winston GW. The microsomal mixed function oxidase system of amphibians and reptiles: components, activities and induction. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 1998; 121:85-105.
- Eto M. Organophosphorus pesticides: Organic and biological chemistry. Third Edition, CRC Press. 1974, Florida, USA.
- Falfushinska H, Loumbourdis N, Romanchuk L, Stolyar O. Validation of oxidative stress responses in two populations of frogs from Western Ukraine. *Chemosphere*. 2008; 73(7):1096-101.
- Falfushynska HI, Stolyar OB. Responses of biochemical markers in carp *Cyprinus carpio* from two field sites in Western Ukraine. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2009; 72(3):729-36.
- FAO "Código internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas (Versión revisada)". 2003; Roma. 31 pp.
- Fellers GM, McConnell LL, Pratt D, Datta S. Pesticides in mountain yellow-legged frogs (*Rana muscosa*) from the Sierra Nevada Mountains of California, USA. *Environ Toxicol Chem*. 2004; 23:2170-2177.
- Feng T, Li ZB, Guob XQ, Guo JP. Effects of trichlorfon and sodium dodecyl sulphate on antioxidant defense system and acetylcholinesterase of *Tilapia nilotica in vitro*. *Pestic Biochem Physiol*. 2008; 92:107-113.
- Ferrari A, Anguiano L, Lascano C, Sotomayor V, Rosenbaum E, Venturino A. Changes in the antioxidant metabolism in the embryonic development of the common South American toad *Bufo arenarum*: differential

- responses to pesticide in early embryos and autonomous-feeding larvae. *J Biochem Mol Toxicol*. 2008; 22:259-267.
- Ferrari A, Lascano C, Pechen de D'Angelo AM, Venturino A. Effects of azinphos methyl and carbaryl on *Rhinella arenarum* larvae esterases and antioxidant enzymes. *Comp Biochem Physiol C*. 2011; 153(1):34-39.
- Ferrari A, Lascano CI, Anguiano OL, Pechen de D'Angelo AM, Venturino A. Antioxidant responses to azinphos methyl and carbaryl during the embryonic development of the toad *Rhinella (Bufo) arenarum* Hensel. *Aquat Toxicol*. 2009; 93:37-44.
- Ferrari A, Venturino A, Pechen de D'Angelo AM. Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes. *Pestic Biochem Physiol*. 2007; 88:134-142.
- Ferrari A, Venturino A, Pechen de D'Angelo AM. Time course of brain cholinesterase inhibition and recovery following acute and subacute azinphosmethyl, parathion and carbaryl exposure in the goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol Environ Saf*. 2004; 57:420-425.
- Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000; 408:239-246.
- Flamigni F, Facchini A, Capanni C, Stefanelli C, Tantini B, Caldarera CM. p44/42 mitogen-activated protein kinase is involved in the expression of ornithine decarboxylase in leukaemia L1210 cells. *Biochem J*. 1999; 341(2):363-369.
- Fonovich de Schroeder TM, Pechén de D'Angelo AM. Dieldrin effects on phospholipid and phosphoinositide metabolism in *Bufo arenarum* oocytes. *Comp Biochem Physiol*. 1991; 98C:287-292.
- Fonovich de Schroeder TM, Pechen de D'Angelo AM. Dieldrin modifies the hydrolysis of PIP2 and decreases the fertilization rate in *Bufo arenarum* oocytes. *Comp Biochem Physiol*. 1995; 112C:61-67.
- Freeman ML, Huntley SA, Meredith MJ, Senisterra GA, Lepock J. Destabilization and denaturation of cellular protein by glutathione depletion. *Cell Stress Chaperones*. 1997; 2:191-198.
- Fujioka K, Casida JE. Glutathione S-Transferase Conjugation of Organophosphorus Pesticides Yields S-Phospho-, S-Aryl-, and S-Alkylglutathione Derivatives. *Chem Res Toxicol*. 2007; 20(8):1211-1217.
- Fukami JI. Metabolism of several insecticides by glutathione S-transferase. Differential toxicities of insecticides and halogenated aromatics. Ed. Matsumura F. Pergamon Press Oxford, England. 1984; Cap. 4 pp 223-261.

- Fukuto RT. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ. Health Persp.* 1990; 87:245-254.
- Gaines DW, Friedman L, Braunberg RC. Facilitated micromethod for measurement of metabolically generated $^{14}\text{CO}_2$, with application to measurement of ornithine decarboxylase. *Anal Biochem.* 1989; 178:52-56.
- Gauna L, Caballero de Castro A, Chifflet de Llamas M, Pechen de D'Angelo AM. Effects of dieldrin treatment on physiological and biochemical aspects of the toad embryonic development. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1991; 46:633-640.
- Gronwald JW, Plaisance KL. Isolation and characterization of glutathione S-transferase isozymes from sorghum. *Plant Physiol.* 1998; 117:877-892.
- Gurushankara HP, Krishnamurthy SV, Vasudev V. Effect of malathion on survival, growth, and food consumption of Indian cricket frog (*Limnonectes limnocharis*) tadpoles. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2007; 52:251-256.
- Ha HC, Sirisoma NS, Kuppusamy P, Zweier JL, Woster PM, Casero Jr RA. The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998b; 95:11140-11145.
- Ha HC, Yager JD, Woster PA, Casero Jr RA. Structural specificity of polyamines and polyamine analogues in the protection of DNA from strand breaks induced by reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998a; 244:298-303.
- Habig WH, Pabst MJ, Jacoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 1974; 249:7130-7139.
- Halazonetis TD, Georgopoulos K, Greenberg ME, Leder P. c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell.* 1988; 55:917-924
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 4th Ed. Clarendon Press, Oxford, 2006.
- Halonen T, Sivenius J, Miettinen R, Halmekyto M, Kauppinen R, Sinervirta R, Alakuijala L, Alhonen L, MacDonald E, Janne J, Reikkinen Sr PJ. Elevated seizure threshold and impaired spatial learning in transgenic mice with putrescine overproduction in the brain. *Eur J Neurosci.* 1993; 5:1233-1239.
- Han J, Richter B, Li Z, Kravchenko V, Ulevitch RJ. Molecular cloning of human p38 MAP kinase. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1265:224-227.

- Harvey CJ, Thimmulappa RK, Singh A, Blake DJ, Ling G, Wakabayashi N, Fujii J, Myers A, Biswal S. Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2009; 46:443-453.
- Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005; 45:51-88.
- Hayes JD, McLellan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res.* 1999; 31: 273-300.
- Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1995; 30:445-600.
- Hernandez SA, Sanchez MS, Schwarcz de Tarlovsky MN. Polyamines as a defense mechanism against lipoperoxidation in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 2006; 98:94-102.
- Hill EF. Organophosphorus and carbamate pesticides. En *Cholinesterase Inhibiting insecticides: Their impact on Wildlife and the Environment. Chemicals in Agriculture Vol II.* Ed. Marzu, 1991. Cap. 12 pp. 243-274.
- Hoet PH, Nemery B. Polyamines in the lung: polyamine uptake and polyamine-linked pathological or toxicological conditions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; 278(3):417-433.
- Houlahan JE, Findlay CS, Schmidt BR, Meyer AH, Kuzmin SL. Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature.* 2000; 404:752-755.
- Hyne RV, Maher WA. Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2003; 54(3):366-374.
- Igarashi K, Kashiwagi K. Modulation of cellular function by polyamines. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010; 42:39-51.
- Igarashi K, Kashiwagi K. Polyamines: Mysterious Modulators of Cellular Functions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 271:559-564.
- INTA y Estación Experimental Agropecuaria Alto Valle de Río Negro. Guía de pulverizaciones para frutales de pepita y carozo. General Roca; Río Negro, Argentina. 1993.
- Isik I, Celik I. Acute effects of methyl parathion and diazinon as inducers for oxidative stress on certain biomarkers in various tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pestic Biochem Physiol.* 2008; 92:38-42.

- Jaiswal AK. Nrf2 signalling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic. Biol. Med.* 2004; 36:1199–1207.
- Jänne J, Williams–Ashman HG. On the purification of L–ornithine decarboxylase from rat prostate and effects of thiol compounds on the enzyme. *J Biol Chem.* 1971; 246:1725–1732.
- Janssens BJ, Le Gall R, Rees JF. Peroxide–triggered erythrocytes haemolysis as a model for the study of oxidative damage in marine fishes. *J Fish Biol.* 2002; 61:71–84.
- Johnson LR, McCormack SA. Healing of gastrointestinal mucosa: involvement of polyamines. *News Physiol Sci.* 1999; 14:12–17.
- Jokanović M. Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicol.* 2001; 166:139–160.
- Jorgensen P, Steen JAJ, Steen H, Kirschner MW. The mechanism and pattern of yolk consumption provide insight into embryonic nutrition in *Xenopus*. *Development.* 2009; 136:1539–1548.
- Kashiwagi K, Yamaguchi Y, Sakai Y, Kobayashi H, Igarashi K. Identification of the polyamine–induced protein as a periplasmic oligopeptide binding protein. *J Biol Chem.* 1990; 265(15):8387–8391.
- Kasukabe Y, He L, Nada K, Misawa S, Ihara I, Tachibana S. Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up–regulates the expression of various stress–regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 2004; 45:712–722.
- Kavitha P, Rao JV. Toxic effects of chlorpyrifos on antioxidant enzymes and target enzyme acetylcholinesterase interaction in mosquito fish, *Gambusia affinis*. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2008; 26:192–198.
- Kavitha P, Venkateswara Rao J. Oxidative stress and locomotor behaviour response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos. *Pestic Biochem Physiol.* 2007; 87:182–188.
- Kavitha P, Venkateswara Rao J. Sub–lethal effects of profenofos on tissue–specific antioxidative responses in a Euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2009; 72:1727–1733.
- Khan AU, Mei YH, Wilson T. A proposed function for spermine and spermidine: protection of replicating DNA against damage by singlet oxygen. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89:11426–11427.
- Kostaropoulos I, Papadopoulos AI, Metaxakis A, Boukouvala E, Papadopoulou–Mourkidou E. Glutathione S–transferase in the defense against pyrethroids in insects. *Insect Biochem Mol Biol.* 2001; 15:313–319.

- Kouzarides T, Ziff E. The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction. *Nature*. 1988; 336:646-651.
- Kusunoki S, Yasumasu Y. Inhibitory effect of alpha-hydrazinoornithine on egg cleavage in sea urchin eggs. *Dev Biol*. 1978; 67:336-345.
- Kwak M-K, Kensler TW, Casero Jr RA. Induction of phase 2 enzymes by serum oxidized polyamines through activation of Nrf2: effect of the polyamine metabolite acrolein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 305:662-670.
- Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*. 1994; 369:156-160.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680-685.
- Laguerre C, Sánchez-Hernández JC, Köhler HR, Triebkorn R, Capowiez Y, Rault M, Mazzia C. B-type esterases in the snail *Xeropicta derbentina*: an enzymological analysis to evaluate their use as biomarkers of pesticide exposure. *Environ Pollut*. 2009; 157(1):199-207.
- Lefcort H., Meguire RA, Wilson LH, Ettinger WF. Heavy metals alter the survival, growth, metamorphosis, and antipredatory behavior of Columbia spotted frog (*Rana luteiventris*) tadpoles. *Arch Environ Contam Toxicol*. 1998; 35:447-456.
- Levi PE, Hogdson E. Metabolism of organophosphorus compounds by the Flavin-containing Monooxygenase. En: *Organophosphates: Chemistry, Fate, and Effects*. Ed. Chambers JE, Levi PE. Academic Press. 1992; Cap 6 pp:141-168.
- Li L, Rao JN, Guo X, Liu L, Santora R, Bass BL, Wang JY. Polyamine depletion stabilizes p53 resulting in inhibition of normal intestinal epithelial cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001; 281(3):941-953.
- Liu L, Guo X, Rao JN, Zou T, Xiao L, Yu T. Polyamines regulate E-cadherin transcription through c-Myc modulating intestinal epithelial barrier function. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009; 296:801-810.
- Livingstone DR. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comp Biochem Physiol Part A*. 1998; 120:43-49.
- Loewy M, Kirs V, Carvajal G, Venturino A, Pechen de D'Angelo AM. Groundwater contamination by azinphos methyl in the Northern Patagonic Region (Argentina). *Sci Total Environ*. 1999; 225:211-218.

- Loewy RM, Carbajal LG, Novelli M, Pechen de D´Angelo AM. Effect of pesticide use in fruit production orchards on shallow ground water. *J Environ Sci Health B*. 2003; 38:317–325.
- Loewy RM, Monza LB, Kirs VE, Savini MC. Pesticide distribution in an agricultural environment in Argentina. *J Environ Sci Health B*. 2011; 46(8):662–670.
- López-García C, López-Contreras AJ, Cremades A, Castells MT, Marín F, Schreiber F, Peñafiel R. Molecular and morphological changes in placenta and embryo development associated with the inhibition of polyamine synthesis during midpregnancy in mice. *Endocrinology*. 2008; 149(10):5012–5023.
- Lötters S, Kielgast J, Bielby J, Schmidlein S, Bosch J, Veith M, Walker SF, Fisher MC, Rödder D. The link between rapid enigmatic amphibian declines and the globally emerging chytrid fungus. *Ecohealth*. 2009; 6(3):358–372.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193:265–275.
- Lu J, Holmgren A. Selenoproteins. *J Biol Chem*. 2009; 284:723–727.
- Manchester KM, Heston WD, Donner DB. Tumour necrosis factor-induced cytotoxicity is accompanied by intracellular mitogenic signals in ME-180 human cervical carcinoma cells. *Biochem J*. 1993; 290:185–190.
- Masui Y, Wang P. Cell cycle transition in early embryonic development of *Xenopus laevis*. *Biol. Cell* 1998; 90:537–548.
- Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*. 2000; 153:83–104.
- Matsumura F. *Toxicology of insecticides*, 2nd edition. Plenum Press, 1985, New York, NY, USA.
- Meehana R, Dunicana D, Ruzova A, Penning S. Epigenetic silencing in embryogenesis. *Exp Cell Biol*. 2005; 309:241–249.
- Milatovic D, Gupta RC, Aschner M. Anticholinesterase Toxicity and Oxidative Stress. *Scientific World Journal*. 2006; 6:295–310.
- Mileson BE, Chambers JE, Chen WL, Dettbarn W, Ehrich M, Eldefrawi AT, Gaylor DW, Hamernik K, Hodgson E, Karczmar AG, Padilla S, Pope CN, Richardson RJ, Saunders DR, Sheets LP, Sultatos LG, Wallace KB. Common mechanism of toxicity: a case study of organophosphorus pesticides. *Toxicol Sci*. 1998; 41(1):8–20.
- Miller JK, Brzezinska-Slebodzinska E. Oxidative stress, antioxidants and animal function. *J Dairy Sci*. 1993; 6:2812–2823.

- Missala K, Sourkes TL. Putrescine catabolism in rats given heparin or aminoguanidine. *Eur J Pharmacol.* 1980;27; 64(4):307-11.
- Monteiro DA, Alves de Almeida J, Rantin TF, Kalinin AL. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comp Biochem Physiol.* 2006; 143C:141-149.
- Moruzzi MS, Marverti G, Piccinini G, Frassinetti C, Monti MG. Effect of spermine on membrane-associated and membrane-inserted forms of protein kinase C. *Mol Cell Biochem.* 1993; 124(1):1-9.
- Motoyama N, Dauterman WC. Glutathione S-transferases: Their role in the metabolism of organophosphorus insecticides. *Reviews in Biochemical Toxicology.* Ed. Hodgson E, Bend JR, Philpot RM. Elsevier, NY. 1980; Vol. 2 pp 49-69.
- Müller WA. Model organisms in developmental biology. En: *Developmental Biology.* Springer-Verlag, New York, Inc. 1997; Chapter 3. pp 21-121.
- Muscari C, Guarnieri C, Stefanelli C, Giaccari A, Caldarera CM. Protective effect of spermine on DNA exposed to oxidative stress. *Mol Cell Biochem.* 1995; 144:125-129.
- Mussi MA, Calcaterra NB. Paraquat-induced oxidative stress response during amphibian early embryonic development. *Comp Biochem Physiol C.* 2010; 151:240-247.
- Netting J. Pesticides implicated in declining frog numbers. *Nature.* 2000; 408:760.
- Nilsson JA, Maclean KH, Keller UB, Pendeville H, Baudino TA, Cleveland JL. Mnt loss triggers Myc transcription targets, proliferation, apoptosis, and transformation. *Mol Cell Biol.* 2004; 24:1560-1569.
- Noctor G, Gomez L, Vanacker H, Foyer CH. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. *J Exp Bot.* 2002; 53(372): 1283-1304.
- Ogasawara T, Ito K, Igarashi K. Effect of polyamines on globin synthesis in a rabbit reticulocyte polyamine-free protein synthetic system. *J Biochem.* 1989; 105(2):164-167.
- Oruc EO, Sevgiler Y, Uner N. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comp Biochem Physiol.* 2004; 137C:43-51.
- Osborne B, Duval C, Ghoda L, Omilli F, Bassez T, Coffino P. Expression and post-transcriptional regulation of ornithine decarboxylase during early *Xenopus* development. *Eur J Biochem.* 1991; 202:575-581.

- Osborne HB, Cormier P, Lorillon O, Maniey D, Bellé R. An appraisal of the developmental importance of polyamine changes in early *Xenopus* embryos. *Int J Dev Biol*. 1993; 37:615–618.
- Palanimurugan R, Scheel H, Hofmann K, Dohmen RJ. Polyamines regulate their synthesis by inducing expression and blocking degradation of ODC antizyme. *EMBO J*. 2004; 23:4857–4867.
- Panemangalore M, Bebe FN. Dermal exposure to pesticides modifies antioxidant enzymes in tissues of rats. *J Environ Health. B* 2000; 35:399–416.
- Paoletti F, Aldinucci D, Mocali A, Caparrini A. A sensitive spectrophotometric method for determination of superoxide dismutase activity in tissue extract. *Anal Biochem*. 1985; 154:536–541.
- Pechen AM, Bazán NG. Lipid metabolism in early development using labeled precursors incorporated during oogenesis and in cell-free embryo homogenates. *Lipids*. 1977; 12(2):131–134.
- Pechen AM, Bazán NG. Membrane ³²P-phospholipid labeling in early developing toad embryos. *Exp Cell Res*. 1974; 88(2):432–435.
- Pedreno E, López-Contreras AJ, Cremades A, Peñafiel R. Protecting or promoting effects of spermine on DNA strand breakage induced by iron or copper ions as a function of metal concentration. *J Inorg Biochem*. 2005; 99:2074–2080.
- Pegg AE. Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life*. 2009; 61(9):880–894.
- Pegg AE. Regulation of Ornithine Decarboxylase. *J Biol Chem*. 2006; 281(21):14529–14532.
- Peña-Llopis S, Ferrando MD, Peña JB. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. *Aquat Toxicol*. 2003; 65:337–360.
- Peña-Llopis S, Ferrando MD, Peña JB. Impaired glutathione redox status is associated with decreased survival in two organophosphate-poisoned marine bivalves. *Chemosphere*. 2002; 47:485–497.
- Perin A, Sessa A, Desiderio MA. Response of tissue diamine oxidase activity to polyamine administration. *Biochem J*. 1986; 234(1):119–123.
- Pilliod DS, Muths E, Scherer RD, Bartelt PE, Corn PS, Hossack BR, Lambert BA, McCaffery R, Gaughan C. Effects of amphibian chytrid fungus on individual survival probability in wild boreal toads. *Conserv Biol*. 2010; 24(5):1259–1267.

- Pisanó A, Rengel D. Biología del desarrollo de anfibios. Manual del Curso de posgrado. 1982. Laboratorio de Investigaciones Embriológicas (CONICET) y Universidad Nacional del Comahue. Neuquén, Argentina.
- Pisanó A. Efficienza funzionale e struttura dell'ipofisi di anfibio nantenuta in medio oleoso. Arch Zool Ital. 1957; 42:221-227.
- Plaisance KL, Gronwald JW. Enhanced catalytic constant for glutathione S-transferase (atrazine) activity in an atrazine-resistant *Abutilon theophrasti* biotype. Pestic Biochem Physiol. 1999; 63:34-49.
- Pollard KJ, Samuels ML, Crowley KA, Hansen JC, Peterson CL. Functional interaction between GCN5 and polyamines: a new role for core histone acetylation. EMBO J. 1999; 18:5622-5633.
- Pope CN, Karanth S, Liu J, Yan B. Comparative carboxylesterase activities in infant and adult liver and their in vitro sensitivity to chlorpyrifos oxon. Regul Toxicol Pharmacol. 2005; 42(1):64-69.
- Pope CN, Liu J. Age-related differences in sensitivity to organophosphorus pesticides. Environ Toxicol Pharmacol. 1997; 4(3-4):309-314.
- Pope CN. Organophosphorus pesticides: do they all have the same mechanism of toxicity? J Toxicol Environ Health. 1999; 2:161-181.
- Pounds JA, Puschendorf R. Ecology: clouded futures. Nature. 2004; 8:107-109.
- Pounds JA. Climate and amphibian declines. Nature. 2001; 410:639-640.
- Prapanthadara L, Promtet N, Koottathep S, Somboon P, Ketterma AJ. Isoenzymes of glutathione S-transferase from the mosquito *Anopheles dirus* species B: the purification, partial characterization and interaction with various insecticides. Insect Biochem Mol Biol. 2000; 30:395-403.
- Primo Yufera E. Toxicidad para el hombre y daños ecológicos de los insecticidas actuales. En Ecología Química. Nuevos métodos de lucha contra insectos. 1991, Capítulo I pp 13-20. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. España.
- Qin C, Samudio I, Ngwenya S, Safe S. Estrogen-dependent regulation of ornithine decarboxylase in breast cancer cells through activation of nongenomic cAMP-dependent pathways. Mol Carcinog. 2004; 40:160-170.
- Randi AS, Hernández S, Alvarez L, Sánchez M, Schwarcz M, Kleiman de Pisarev DL. Hexachlorobenzene-Induced Early Changes in Ornithine Decarboxylase and Protein Tyrosine Kinase Activities, Polyamines and c-Myc, c-Fos and c-Jun Proto-Oncogenes in Rat Liver. Toxicol Sci. 2003; 76:291-298.

- Regoli F, Nigro M, Benedetti M, Fattorini D, Gorbi S. Antioxidant efficiency in early life stages of the Antarctic silverfish, *Pleuragramma antarcticum*: responsiveness to pro-oxidant conditions of platelet ice and chemical exposure. *Aquat Toxicol.* 2005; 75:43–52.
- Rewitz KF, Styrisshave B, Lobner-Olesen A, Andersen O. Marine invertebrates cytochrome P450: Emerging insights from vertebrates and insect analogies. *Comp Biochem Physiol Part C.* 2006; 143:363–381.
- Rizzo AM, Adorni L, Montorfano G, Rossi F, Berra B. Antioxidant metabolism of *Xenopus laevis* embryos during the first days of development. *Comp Biochem Physiol B.* 2007; 146:94–100.
- Rodríguez-Caso C, Montañez R, Cascante M, Sánchez-Jiménez F, Medina MA. Mathematical modeling of polyamine metabolism in mammals. *J Biol Chem.* 2006; 281(31):21799–21812.
- Rosenbaum EA, Caballero de Castro A, Gauna L, Pechen de D'Angelo AM. Early biochemical changes produced by malathion on toad embryos. *Arch Environ Contam Toxicol.* 1988; 17:831–835.
- Rufingier C, Pasteur N, Lagnel J, Martín C, Navajas M. Mechanisms of insecticide resistance in the aphid *Nasonovia ribisnigri* (Homoptera: aphididae) from France. *Insect Biochem Mol Biol.* 1999; 29:385–391.
- Russell DH. Putrescine and Spermidine Biosynthesis in the Development of Normal and Anucleolate Mutants of *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971; 68(3):523–527.
- Sakata K, Kashiwagi K, Sharmin S, Ueda S, Igarashi K. Acrolein produced from polyamines as one of the uraemic toxins. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31:371–374.
- Sava IG, Battaglia V, Rossi CA, Salvi M, Toninello A. Free radical scavenging action of the natural polyamine spermine in rat liver mitochondria. *Free Radic Biol Med.* 2006; 41:1272–1281.
- Saxena A, Viragh C, Scott Frazier D, Kovach IM, Maxwell DM, Lockridge O, Doctor BP. The pH dependence of dealkylation in Soman-inhibited cholinesterases and their mutants: further evidence for a push-pull mechanism. *Biochem.* 1998; 37:15086–15096.
- Sayim F, Kaya U. Effects of Dimethoate on Tree Frog (*Hyla arborea*) Larvae. *Turk J Zool.* 2006; 30:261–266.
- Sayim F. Acute Toxic Effects of Malathion on the 21st Stage Larvae of the Marsh Frog. *Turk J Zool.* 2008; 32:99–106.
- Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defences. *Braz J Med Biol Res.* 2005; 38(7):995–1014.

- Scandalios JG. The rise of ROS. Trends in Biochem Sci. 2002; 27(9):483–486.
- Schaedle M, Bassham JA. Chloroplast glutathione reductase. Plant Physiol. 1977; 59:1011–1012.
- Schenkel E, Dubois JG, Helson-Cambier M, Hanocq M. Cytotoxicity of polyamines to *Amoeba proteus*: Role of polyamine oxidase. Cell Biol Toxicol. 1996; 12:1–9.
- Schipper RG, Penning LC, Verhofstad AAJ. Involvement of polyamines in apoptosis. Facts and controversies: effectors or protectors? Semin Cancer Biol. 2000; 10(1):55–68.
- Scorcioni F, Corti A, Davalli P, Astancolle S, Bettuzzi S. Manipulation of the expression of regulatory genes of polyamine metabolism results in specific alterations of the cell-cycle progression. Biochem J. 2001; 354:217–223.
- SENASA-FUNBAPA. Programa Nacional de Supresión de la Carpocapsa, Región Patagonia, Temporada 2009–2010. Informe técnico.
- Shantz LM, Hu R-H, Pegg AE. Expression of an ornithine decarboxylase dominant-negative mutant reverses eukaryotic initiation factor 4E-induced cell transformation. Cancer Res. 1996; 56:3265–3269.
- Shantz LM, Pegg AE. Ornithine decarboxylase induction in transformation by H-Ras and RhoA. Cancer Res. 1998; 58:2748–2753.
- Shantz LM, Pegg AE. Translational regulation of ornithine decarboxylase and other enzymes of the polyamine pathway. Int J Biochem Cell Biol. 1999; 31(1):107–122.
- Shantz LM. Transcriptional and translational control of ornithine decarboxylase during Ras transformation. Biochem. J. 2004; 377:257–264.
- Shinga J, Kashiwagi K, Tashiro K, Igarashi K, Shiokawa K. Maternal and zygotic expression of mRNA for S-adenosylmethionine decarboxylase and its relevance to the unique polyamine composition in *Xenopus* oocytes and embryo. Biochim Biophys Acta. 1996; 1308(1):31–40.
- Shirose L, Bishop C, Gendron A. Amphibians and reptiles in Great Lakes wetlands: Threats and conservation. Minister of Public Works and Government Services Canada, 1996.
- Sibon O, Stevenson V, Theurkauf W. DNA-replication checkpoint control at the *Drosophila* midblastula transition. Nature. 1997; 388:93–97
- Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. Free Radic Biol Med. 1999; 27(9/10):916–921.

- Slack JMW, Forman D. An interaction between dorsal and ventral regions of the marginal zone in early amphibian embryos. *Embryol Exp Morphol*. 1980; 56:283–299.
- Smeal T, Binetruy B, Mercola D, Grover–Bardwick A, Heidecker G, Rapp U R, Karin M. Oncoprotein–mediated signalling cascade stimulates c-Jun activity by phosphorylation of serines 63 and 73. *Mol Cell Biol*. 1992; 12:3507–3513
- Snyder MJ. Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrates: recent advances and future directions. *Aquatic Toxicol*. 2000; 48:529–547.
- Solé M, Livingstone DR. Components of the cytochrome P450–dependent monooxygenase system and NADPH–independent benzo[a]pyrene hydroxylase activity in a wide range of marine invertebrate species *Comp Biochem Physiol Part C*. 2005; 141:20–31.
- Sotomayor V. Efectos de los plaguicidas organofosforados sobre la expresión génica de embriones de *Rhinella arenarum*. Mecanismos de acción y vías de señalización. 2011. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.
- Sparling DW, Fellers GM. Toxicity of two insecticides to California, USA, anurans and its relevance to declining amphibian populations. *Environ Toxicol Chem*. 2009; 28:1696–1703.
- Srivastava RK. Changes in polyamines during embryonic development of atlantic salmon *Salmo salar*. *Comp Biochem Physiol B*. 1992; 102:97–101.
- Stegeman JJ, Hahn ME. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. En: *Aquatic Toxicology. Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. Ed. Malins DC, Ostrand GK. Lewis Publishers. Boca Raton – Ann Arbor – London – Tokyo. 1994; Cap 3 pp: 87–206.
- Stephensen E, Sturve J, Förllin L. Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione–related enzymes in rainbow trout liver. *Comp. Biochem. Physiol. C*. 2002; 33:435–442.
- Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues ASL, Fischman DL, Waller RW. Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science*. 2004; 306:1783–1786.
- Tabib A, Bachrach U. Polyamines induce malignant transformation in cultured NIH 3T3 fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol*. 1998; 30:135–146.

- Tabib A, Bachrach U. Role of polyamines in mediating malignant transformation and oncogene expression. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1999; 31:1289-1295.
- Thomas T, Thomas TJ. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci.* 2001; 58(2):244-258.
- Thomaz JM, Martins ND, Monteiro DA, Rantin FT, Kalinin AL. Cardio-respiratory function and oxidative stress biomarkers in Nile tilapia exposed to the organophosphate insecticide trichlorfon (NEGUVON®). *Ecotoxicol Environ Saf.* 2009; 72:1413-1424.
- Tkachenko A, Nesterova L, Pshenichnov M. The role of the natural polyamine putrescine in defense against oxidative stress in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol.* 2001; 176:155-157.
- Tome ME, Gerner EW. Hypusine modification in eukaryotic initiation factor 5A in rodent cells selected for resistance to growth inhibition by ornithine decarboxylase-inhibiting drugs. *Biochem J.* 1996; 320:55-60.
- Ufer C, Wang CC. The roles of glutathione peroxidases during embryo development. *Front Mol Neurosci.* 2011; 4(12):1-14.
- Valdéz Toledo CL, Pisanó A. Fases ovogenéticas en *Bufo arenarum*. *Reproducción.* 1980; 4:315-330.
- Venturino A, Anguiano OL, Gauna L, Cocca C, Bergoc RM, Pechen de D'Angelo AM. Thiols and polyamines in the potentiation of malathion toxicity in larval stages of the toad *Bufo arenarum*. *Comp Biochem Physiol C.* 2001; 130:191-198.
- Venturino A, Gauna L, Bergoc RM, Pechen de D'Angelo AM. Effect of exogenously applied polyamines on malathion toxicity in the toad *Bufo arenarum* Hensel. *Arch Environ Contam Toxicol.* 1992; 22:135-139.
- Venturino A, Rosenbaum E, Caballero de Castro A, Anguiano OL, Gauna L, Fonovich de Schroeder T, Pechen de D'Angelo AM. Biomarkers of effect in toads and frogs. *Biomarkers.* 2003; 8(3-4):167-186.
- Vilanova E, Sogorb MA. The role of phosphotriesterases in the detoxication of organophosphorus compounds. *Crit Rev Toxicol.* 1999; 29:21-57.
- Vontas JG, Small GJ, Hemingway J. Glutathione S-transferases as oxidant defense agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem J.* 2001; 357:65-72.
- Wake DB. Declining amphibian populations. *Science.* 1991; 253:860.
- Wallace HM, Fraser AV, Hughes A. A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J.* 2003; 376:1-14

- Wells PG, Bhuller Y, Chen CS, Jeng W, Kasapinovic S, Kennedy JC, Kim PM, Laposa RR, McCallum GP, Nicol CJ, Parman T, Wiley MJ, Wong AW. Molecular and biochemical mechanisms in teratogenesis involving reactive oxygen species. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005; 207:354-366.
- Wells PG, McCallum GP, Chen CS, Henderson JT, Lee CJJ, Perstin J, Preston TJ, Wiley MJ, Wong AW. Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer, *Toxicol Sci.* 2009; 108:4-18.
- Wijesinghe MR, Bandara MG, Ratnasooriya WD, Lakraj GP. Chlorpyrifos-induced toxicity in *Duttaphrynus melanostictus* (Schneider 1799) larvae. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2010; 17:1411-1421.
- Williams K. Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem J.* 1997; 325:289-297.
- Wilson BW, Hooper MJ, Hansen M.E, Nieberg PS. Reactivation of organophosphorus inhibited AChE with oximes. En: *Organophosphates: Chemistry, fate, and effects.* Ed. Chambers J.E., Levi P.E. 1992, Academic Press Inc. Cap. 5 pp: 107-137.
- Wrighton C, Busslinger M. Direct transcriptional stimulation of the ornithine decarboxylase gene by Fos in PC12 cells but not in fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 1993; 13(8):4657-4669.
- Ye B, Muller HH, Zhang J, Gressel J. Constitutively elevated levels of putrescine and putrescine-generating enzymes correlated with oxidant stress resistance in *Conyza bonariensis* and Wheat. *Plant Physiol.* 1997; 115:1443-451.
- Yovanovich CAM, Jungblut LD, Heer T, Pozzi AG, Paz DA. Amphibian larvae and zinc sulphate: a suitable model to study the role of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the neuronal turnover of the olfactory epithelium. *Cell Tissue Res.* 2009; 336:1-9.
- Zahedi K, Bissler JJ, Wang Z, Josyula A, Lu L, Diegelman P, Kisiel N, Porter CW, Soleimani M. Spermidine/spermine N¹-acetyltransferase overexpression in kidney epithelial cells disrupts polyamine homeostasis, leads to DNA damage, and causes G2 arrest. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 292(3):1204-1215.
- Zhao YC, Chi YJ, Yu YS, Liu JL, Su RW, Ma XH, Shan CH, Yang ZM. Polyamines are essential in embryo implantation: expression and function of polyamine-related genes in mouse uterus during peri-implantation period. *Endocrinology.* 2008; 149(5):2325-2332.
- Zhou Y, Ma C, Karmouch J, Katbi HA, Liu XJ. Antiapoptotic role for ornithine decarboxylase during oocyte maturation. *Mol Cell Biol.* 2009; 29(7):1786-1795.

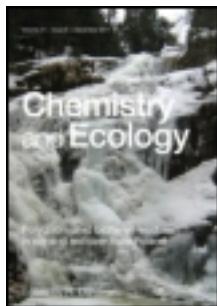
8. TRABAJOS DE RESPALDO

This article was downloaded by: [Cecilia Inés Lascano]

On: 12 December 2011, At: 10:08

Publisher: Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Chemistry and Ecology

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/gche20>

Sublethal concentrations of azinphos-methyl induce biochemical and morphological alterations in *Rhinella arenarum* embryos

Cecilia Inés Lascano ^{a c}, Ana Ferrari ^{a b} & Andrés Venturino ^{a c}

^a Instituto Multidisciplinario de Investigación y Desarrollo de la Patagonia Norte (IDEPA), CONICET - Universidad Nacional del Comahue, Neuquén Capital, Argentina

^b Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional del Comahue, Cipolletti, Argentina

^c Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue, Cinco Saltos, Argentina

Available online: 22 Aug 2011

To cite this article: Cecilia Inés Lascano, Ana Ferrari & Andrés Venturino (2011): Sublethal concentrations of azinphos-methyl induce biochemical and morphological alterations in *Rhinella arenarum* embryos, *Chemistry and Ecology*, 27:6, 557-568

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/02757540.2011.602971>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae, and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings,

demand, or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

Sublethal concentrations of azinphos-methyl induce biochemical and morphological alterations in *Rhinella arenarum* embryos

Cecilia Inés Lascano^{a,c,*}, Ana Ferrari^{a,b} and Andrés Venturino^{a,c}

^aInstituto Multidisciplinario de Investigación y Desarrollo de la Patagonia Norte (IDEPA), CONICET - Universidad Nacional del Comahue, Neuquén Capital, Argentina; ^bFacultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional del Comahue, Cipolletti, Argentina; ^cFacultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue, Cinco Saltos, Argentina

(Received 31 December 2010; final version received 28 June 2011)

Considering that amphibians are good sentinels of environmental conditions, *Rhinella arenarum* embryos were used to investigate the effects of sublethal concentrations of the organophosphorus insecticide azinphos-methyl, focusing on its anticholinesterasic or pro-oxidant actions and its possible connection with the appearance of morphological alterations. Early amphibian embryos exposed to azinphos-methyl displayed a protective response through glutathione *S*-transferase induction, along with superoxide dismutase inhibition. At intermediate embryonic stages, embryos exposed to azinphos-methyl displayed superoxide dismutase inhibition and morphological alterations, although cholinesterase activity was not altered, suggesting that molecular targets other than cholinesterase were involved in the development of morphological alterations. At the end of embryonic development, decreases in reduced glutathione and cholinesterase inhibition were observed, along with a significant increase in the number of malformed embryos. The connection between biochemical alterations and the appearance of malformations was not evident in *R. arenarum* embryos. However, increased glutathione *S*-transferase and decreased superoxide dismutase activities could be considered as early markers of exposure to azinphos-methyl. The results obtained demonstrate that sublethal concentrations of azinphos-methyl are a serious threat to toad embryos in their natural habitats because biochemical and morphological alterations could impair their ability to deal with environmental stresses.

Keywords: organophosphorus pesticide; cholinesterase; glutathione *S*-transferase; superoxide dismutase; reduced glutathione; amphibian

1. Introduction

Azinphos-methyl (phosphorodithioic acid, *O,O*-dimethyl *S*-[(4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3(4H)-yl)methyl] ester) (AM; CAS RN 86-50-0) is an organophosphorus pesticide intensively applied in the Valley of Rio Negro and Neuquén, northern Patagonia, Argentina. Of the major organophosphorus pesticides applied to foliage, AM is one of the most persistent in water. It is moderately

*Corresponding author. Email: lascano.cecilia@gmail.com

persistent at acid and neutral pH, while its half-life in alkaline water is in the order of several days [1]. The fact that 0.6 kg of AM is applied per hectare every 15 days during the productive season and 600 tons of product are released annually into the environment [2], makes this insecticide a threat for nontarget species such as the amphibians that inhabit the area. In this regard, amphibian populations are experiencing widespread declines due to several factors, including pesticide exposure [3–5]. Although the concentrations of AM detected (in the order of $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) in surface water and groundwater of the Valley of Río Negro and Neuquén, generally range below lethal concentrations for aquatic vertebrates [6,7], samplings revealed that the AM concentration exceeded criteria for the protection of aquatic life and remained high throughout the growing season [7]. Moreover, in studies carried out in channels in the region and in the Negro river, toad larvae showed significant responses in biomarkers such as cholinesterase, carboxylesterase, glutathione *S*-transferase (GST) and reduced glutathione. These results suggest that field concentrations, immediately after pesticide application, must temporarily exceed those reported for surface water [8]. The organophosphorus pesticide AM exerts its insecticidal action by inhibition of acetylcholinesterase [9], which is considered a biomarker of exposure to this class of pesticides [10]. Several authors have reported a relationship between cholinesterase (ChE) inhibition and teratogenesis in amphibian embryos and larvae exposed to organophosphorus and carbamate insecticides [11–13]. In addition to the anticholinesterasic action of AM, it is well documented that exposure of aquatic species to this insecticide elicits alterations in cellular redox status, which may lead to modification of the antioxidant defence system [14–17]. Likewise, a critical involvement of reactive oxygen species (ROS) in the appearance of developmental alterations by means of oxidative damage to macromolecules in animal models and cell cultures exposed to drugs, environmental chemicals and gamma irradiation has been noted [18]. In this regard, we previously analysed the effects of lethal concentrations of organophosphorus pesticides, including AM, and carbamates on antioxidant defences in *Rhinella arenarum* embryos [16]. *Rhinella arenarum* is a native toad of Argentina and inhabits the productive area of the Valley of Río Negro and Neuquén, spending its embryonic and larval stages in water bodies in the region. Accordingly, water quality greatly influences growth and development of this species. At the end of embryonic development, significant effects driven by oxidative stress were proportionally related to the appearance of malformations and death in *R. arenarum* embryos chronically exposed to organophosphorus and carbamate insecticides [16]. Recent studies on the effects of acute exposure to AM using premetamorphic toad larvae showed that an adaptive response of GST occurs earlier than morphological alterations or mortality [19].

The antioxidant defence system present in aerobic organisms is complex and includes enzymatic and nonenzymatic defences to counteract ROS actions [20]. The enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) constitute the first line of defence against ROS in toad embryos [21]. The antioxidant defence system also comprises a set of enzymes which make use of reduced glutathione (GSH) as a substrate, including glutathione peroxidases (GPox), glutathione reductases (GR) and GSTs. Development of the antioxidant system in amphibian embryos protects them against pro-oxidant environments because GSH levels and the activities of GSH-related enzymes increase after hatching and gill development [21].

Although previous studies in *R. arenarum* embryos and larvae have contributed to greater knowledge of AM-induced oxidative stress and mechanisms of toxicity [16,19], experiments involving sublethal concentrations of the organophosphorus pesticide would allow more sensitive evaluation of toxicological mechanisms and would provide useful information on the assessment of AM pollution in aquatic ecosystems. In this study, we investigate the effects of sublethal concentrations of AM, in the order of those transiently expected in irrigation channels and ponds, in *R. arenarum* embryos. We focus on the anticholinesterasic or pro-oxidant actions and their possible connection with the appearance of morphological alterations.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Azinphos-methyl (AM; 99.0% purity) was purchased from Chem Service (West Chester, PA, USA). Acetylthiocholine iodide, 5,5'-dithio-2-bis-nitrobenzoate (DTNB), GSH, bovine serum albumin (BSA), 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), glutathione reductase (GR) (lot 78H74301, 173 U/mg) and β -NADPH were purchased from Sigma Co. (St. Louis, MO, USA). GSSG was purchased from ICN Biomedicals Inc. (Aurora, OH, USA). Sodium azide was purchased from Mallinckrodt (Phillipsburg, NJ, USA). All the other reagents used were of analytical grade.

2.2. Toad embryo culture and insecticide exposure

Three independent experiments were performed using three different pairs of parents. Ovulation of females was induced by intraperitoneal injection of 2500 international units (IU) of human chorionic gonadotropin. *Rhinella arenarum* embryos were obtained by *in vitro* fertilisation, as described previously [22]. Groups of 1000 newly fertilised embryos were transferred to glass recipients containing either amphibian Ringer's solution ($0.65 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$; $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KCl}$; $0.02 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2$) (control group) or pesticide solution, keeping a ratio of $1 \text{ embryo} \cdot \text{mL solution}^{-1}$. Pesticide solutions of 0.5 and $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ AM}$ were prepared by diluting the insecticide standard solution, prepared in acetone, with an appropriate amount of amphibian Ringer's solution, keeping acetone to 0.3%. The exact concentration of the insecticide in the standard solution was checked by gas chromatography with a nitrogen and phosphorus detector (GC-NPD). Controls of 0.3% acetone were also performed because this solvent concentration has no adverse effects on embryonic development [19]. Both concentrations tested were sublethal (96 h LC_{50} value: $15.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) [23]. In addition, a lethal concentration of $9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ AM}$ was used in parallel to confirm data reported previously [16]. Treatments were carried out by duplicate. Solutions were renewed every 48 h until embryos reached the stage of complete operculum (CO; 10 days of development) [24]. Embryos were maintained at $18\text{--}20^\circ\text{C}$ in a 12:12 h light/dark photoperiod. The viability of individuals was monitored using a stereoscopic microscope [16]. Morphological alterations were recorded according to the *Atlas of Abnormalities* [25]. Control embryos at the end of development displayed <5% of mortality and <15% of malformations under laboratory conditions. Embryonic development was assessed in samples of nontreated embryos and embryonic stages were determined according to Del Conte and Sirlin [24]. Samples were taken at three different embryonic stages: tail bud (TB), open mouth (OM) and CO, which correspond to 3, 7 and 10 days of development, respectively.

All the methodologies employed were in accordance with the bioethical normative of the University Committee for Care and Use of Laboratory Animals, Universidad Nacional del Comahue.

2.3. Sampling and homogenisation for enzymatic determinations

Each sample consisted of a total of 50 embryos at TB stage or 25 embryos at OM and CO stages. Embryos were thoroughly washed with cold Ringer's solution, briefly cooled on ice and homogenised in 1 mL of 143 mM potassium phosphate buffer pH 7.5 with 6.3 mM EDTA. The homogenates were centrifuged at $10,000 \text{ g}$ for 20 min at 4°C and the resulting supernatants were divided into aliquots and kept frozen until the enzymatic activity determinations. For superoxide dismutase (SOD) determination, embryos were homogenised in the same buffer and centrifuged at $20,000 \text{ g}$ for 20 min at 4°C .

2.4. Cholinesterase activity

Cholinesterase activity was determined according to Ellman *et al.* [26]. Reactions were performed in 1.03 mL of 100 mM phosphate buffer, pH 8.0 containing 0.2 mM DTNB and 0.75 mM acetylthiocholine iodide as substrate and 0.1 mL of 10,000 g supernatant were added to initiate the reaction. Activity was recorded continuously at 412 nm. Specific activity was expressed as mIU · mg protein⁻¹ using a molar extinction coefficient of 13.6 mM⁻¹ · cm⁻¹.

2.5. Antioxidant enzyme determinations

2.5.1. Glutathione S-transferase

GST (EC 2.5.1.18) activity was assayed in a final volume of 1 mL of 100 mM phosphate buffer pH 6.5 containing 0.5 mM CDNB dissolved in 1% v/v acetonitrile and 2.5 mM GSH as substrates. Baseline (nonenzymatic reaction) was continuously recorded at 340 nm and 30 µL of the supernatant was added [27]. The international units of enzymatic activity were calculated using a molar extinction coefficient of 9.6 mM⁻¹ · cm⁻¹.

2.5.2. Glutathione reductase

GR (EC 1.6.4.2) activity was determined in 1 mL of 143 mM potassium phosphate buffer pH 7.5 with 6.3 mM EDTA, containing 0.21 mM NADPH and 0.5 mM GSSG as substrates and 0.1 mL embryo supernatant (modified from Schaedle and Bassham [28]). NADPH oxidation was recorded at 340 nm. Activity values were corrected by unspecific NADPH oxidation omitting GSSG in the reaction mixture, and converted to mIU using a molar extinction coefficient of 5.886 mM⁻¹ · cm⁻¹ according to our experimental conditions.

2.5.3. Selenium-dependent glutathione peroxidase

Se-GPox (EC 1.11.1.9) activity was determined using 0.3 mM H₂O₂ as substrate in a final volume of 1 mL of 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.4 containing 1 mM GSH as cosubstrate, 0.5 IU · mL⁻¹ GR plus 0.21 mM NADPH as a recycling system, and 1 mM sodium azide as a CAT inhibitor [29]. Fifty microlitres of supernatant were used to measure Se-GPox activity by continuously recording NADPH oxidation at 340 nm. The values were corrected by unspecific NADPH oxidation and were converted to mIU using the same extinction coefficient as for GR.

2.5.4. Catalase

CAT (EC 1.11.1.6) activity was determined according to Beers and Sizer [30], with slight modifications. The reaction was performed in 3 mL sodium phosphate buffer 50 mM pH 7.0 containing 25 mM H₂O₂. Baseline absorbance was controlled to be equal to one unit of absorbance and stable and 20 µL of supernatant were added to initiate the reaction. Specific activity (at 25 mM H₂O₂) was expressed as IU · mg protein⁻¹ using a molar extinction coefficient of 40 M⁻¹ · cm⁻¹.

2.5.5. Superoxide dismutase

SOD (EC 1.15.1.1) activity was measured through enzyme competition of NADH oxidation by superoxide anion, recording the consumption of NADH at 340 nm [31]. The reaction was performed in a final volume of 1.065 mL of 100 mM triethanolamine (TEA)–100 mM diethanolamine

(DEA) buffer pH 7.4 containing 0.28 mM NADH, 1.17 mM MnCl₂, 2.35 mM EDTA and 0.95 mM β-mercaptoethanol to initiate the chemical generation of superoxide anion. Control (maximum) NADH oxidation was competed with 10, 20, 40 and 60 μL of 20,000 g supernatant to determine SOD activity in each sample [21]. One unit of SOD activity is defined as the amount of SOD leading to a 50% inhibition of NADH chemical oxidation by superoxide anion.

2.6. GSH content determination

Fifty TB embryos or 25 OM and CO embryos from each duplicate treatment were randomly separated. Embryos were rinsed with cold amphibian Ringer's solution and homogenised in 5% trichloroacetic acid at 4°C. The homogenates were centrifuged 10 min at 10,000 g and GSH content was immediately measured as acid-soluble thiols in triplicate in 0.1 mL of the supernatant, using 1 mL of 1.5 mM DTNB in 0.25 M sodium phosphate buffer, pH 8.0 [21]. The mixture was incubated for 10 min and the absorbance at 412 nm was measured. Acid soluble thiols were quantified using a calibration curve with pure GSH as standard.

2.7. Protein determination

Protein content was determined according to Lowry *et al.* [32] using BSA as standard.

2.8. Data analysis

Three independent experiments were performed. Within each assay, different treatments were tested in duplicate. For the statistical analysis, data from the three experiments were pooled ($n = 6$ for each embryo stage and treatment) because no significant differences were observed between experiments. Statistical differences between treatments were assessed by ANOVA and Fisher's lowest significant differences (LSD) *post hoc* test.

3. Results

3.1. Effects of azinphos-methyl on embryonic development

At the early embryonic stage of TB (3 days of development), embryos exposed to both concentrations of AM displayed no significant differences in the percentage of malformations when compared with controls. However, when they reached the OM stage, the percentage of malformed embryos increased significantly at exposure to 2 mg · L⁻¹ AM when compared with control values (10.3 vs. 6.5% respectively; $p \leq 0.05$) (Figure 1). Finally, at the end of embryonic development, CO embryos exposed to 2 mg · L⁻¹ AM displayed a significant increase in the frequency of malformations when compared with control values (23.5 vs. 14.4% respectively; $p \leq 0.001$) (Figure 1). The morphological abnormalities commonly found included gills atrophy, axial shortening, body blistering, dorsal tail flexure and oedema. Control OM embryos were 7 mm long and displayed external gills (Figure 2A). At this stage, the embryonic mouth opens and the embryo begins to feed on external substrates. The CO stage is the last embryonic stage in *R. arenarum* and is characterised by complete reabsorption of the external gills (Figure 2D,E). Control CO embryos were 10 mm long and showed a rounded anterior area well differentiated from their caudal fin. In this study, a generalised shortening of the embryonic axis was frequently observed in *R. arenarum* embryos exposed to 2 mg L⁻¹ AM and was usually associated with other abnormalities such as oedema (Figure 2B,C,F). Abdominal oedema appeared as a transparent and swollen fluid-filled

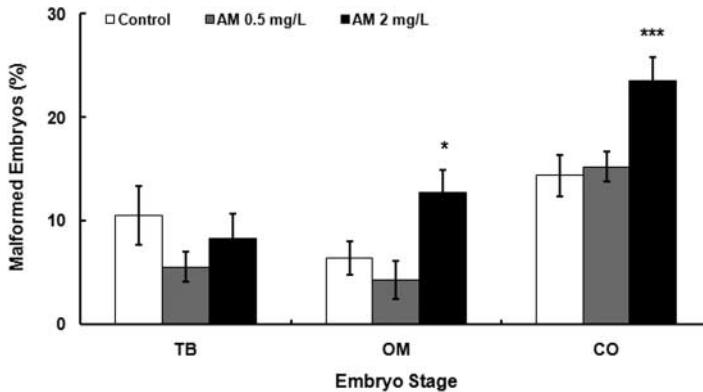


Figure 1. Percentage of malformed *Rhinella arenarum* embryos exposed to 0, 0.5 and 2 mg · L⁻¹ AM from fertilization until the CO stage. Data represent mean ± SE from six replicates. Asterisks indicate significant differences with respect to control values (**p* ≤ 0.05; ****p* ≤ 0.001) determined by ANOVA and Fisher's LSD test. AM, azinphos-methyl; TB, tail bud; OM, open mouth; CO, complete operculum.

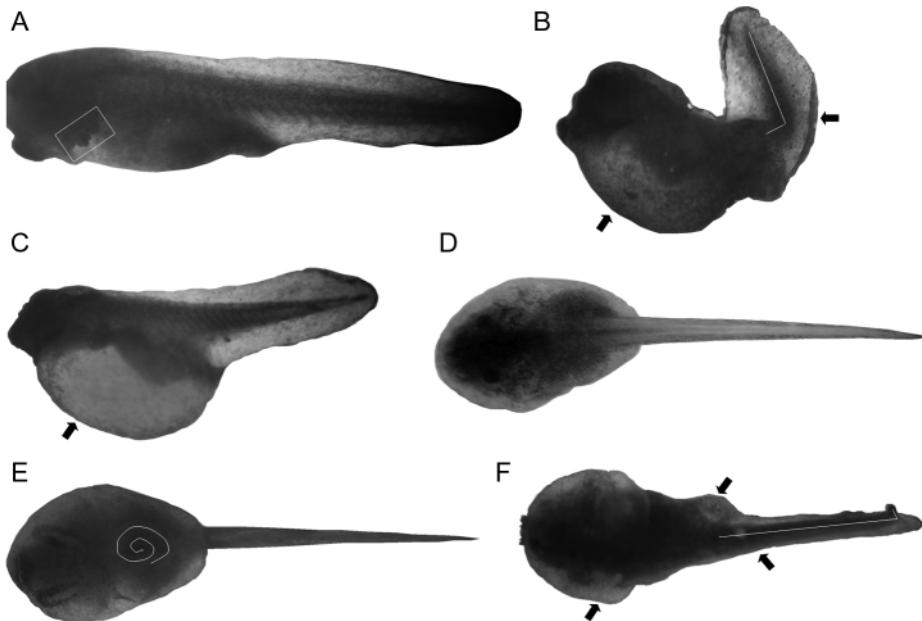


Figure 2. Malformations observed in *Rhinella arenarum* embryos exposed to 2 mg · L⁻¹ AM. The arrows indicate the different morphological abnormalities observed. (A) Lateral view of a control OM embryo (length: 7 mm; × 16). Normally developed gills are evident. (B) Lateral view of a malformed OM embryo showing severe abdominal oedema along with developmental failure of the gut. (C) Lateral view of a malformed OM embryo showing severe abdominal oedema and dorsal tail flexure. (D) Dorsal view of a control CO embryo (length: 10 mm; × 4). Gills have been completely reabsorbed. (E) Ventral view of a control CO embryo. The line indicates the normal coiling of the gut. (F) Ventral view of a malformed CO embryo showing severe oedema, body blistering and decreased body size. Malformed embryos fail to develop their gut normally.

area and was often accompanied by an impairment in gut development (Figure 2C,F). Pronounced dorsal tail flexure was observed in OM embryos exposed to AM, and epidermal oedema (blistering) was also evident in CO embryos exposed to this insecticide (Figure 2F). We also observed that the external gills of OM *R. arenarum* embryos exposed to AM were atrophied when compared with control embryos and lacked from their characteristic ramifications. No significant increase in the number of malformations was found in embryos exposed to 0.5 mg · L⁻¹ AM. As

Table 1. GSH-dependent enzymes and GSH levels in *Rhinella arenarum* embryos exposed to sublethal concentrations of azinphos-methyl.

Embryo stage	Treatment (mg · L ⁻¹ AM)	GST (mIU · mg protein ⁻¹)	GR (mIU · mg protein ⁻¹)	Se-GPox (mIU · mg protein ⁻¹)	GSH (nmol · mg protein ⁻¹)
TB	0	90.17 ± 6.47 ^a	2.87 ± 0.27 ^a	37.53 ± 5.48 ^a	1.27 ± 0.19 ^a
	0.5	102.01 ± 9.51	3.5 ± 0.35	38.08 ± 14.42	1.28 ± 0.02
	2	133.80 ± 10.9 [*]	3.65 ± 0.98	26.53 ± 8.12	1.42 ± 0.06
OM	0	65.27 ± 1.68 ^b	2.84 ± 0.08 ^a	86.15 ± 3.10 ^b	6.55 ± 0.21 ^b
	0.5	69.42 ± 3.18	2.3 ± 0.66	66.96 ± 21.73	6.98 ± 0.46
	2	78.42 ± 0.18	4.04 ± 0.67	81.95 ± 15.68	6.40 ± 0.40
CO	0	157.42 ± 8.26 ^c	7.06 ± 0.67 ^b	98.91 ± 1.07 ^c	9.56 ± 0.84 ^c
	0.5	131.21 ± 9.87	8.01 ± 1.05	80.78 ± 6.18	8.79 ± 0.79
	2	153.30 ± 7.80	7.83 ± 1.68	104.02 ± 20.93	7.06 ± 0.53 [*]

Notes: Data represent mean ± SE from six replicates. Different letters denote significant differences between control embryos of different embryonic stages ($p \leq 0.01$). Asterisks indicate significant differences between azinphos-methyl-exposed (AM) embryos and the corresponding control ($p \leq 0.05$). TB, tail bud stage; OM, open mouth stage; CO, complete operculum stage.

expected, no significant mortality resulted from continuous exposure to both sublethal concentrations of AM during *R. arenarum* embryonic development. Besides, in malformed OM and CO exposed embryos, some changes in behavioural responses could be observed, such as quietness, over-reaction to stimuli and altered locomotion.

3.2. GSH-dependent enzymes and GSH levels

Among GSH-dependent enzymes, TB embryos exposed to the sublethal concentration of 2 mg · L⁻¹ AM showed a significant increase of 48% in GST activity when compared with control values. In the OM and CO stages, no significant differences were detected between control and AM-exposed embryos. Control GST activity decreased significantly during the OM stage with respect to the TB and CO stages (Table 1).

GR and Se-GPox activities showed no significant differences in embryos exposed to sublethal concentrations of AM when compared with control values (Table 1). Control GR activity was similar between the TB and OM stages, and increased significantly when embryos reached the CO stage, whereas control Se-GPox activity increased along embryonic development.

Exposure to the insecticide did not affect GSH levels in either TB or OM embryos exposed to sublethal concentrations of AM. However, GSH levels decreased significantly by 26% in CO embryos exposed to 2 mg · L⁻¹ AM compared with control values. GSH levels increased continuously in control embryos throughout embryonic development (Table 1).

3.3. Catalase and superoxide dismutase activity

In TB embryos exposed to 2 mg · L⁻¹ AM, SOD activity was significantly decreased by 39% compared with control values (Figure 3A). The effect on SOD inhibition was accentuated when embryos exposed to AM reached the OM stage. When compared with control values, SOD was inhibited by 41 and 47% in OM embryos exposed to 0.5 and 2 mg · L⁻¹ AM, respectively. When embryos reached the end of embryonic development, SOD activity recovered control values. Control SOD activities were ~33 IU · mg protein⁻¹ in the TB stage, 6 IU · mg protein⁻¹ in the OM stage and 4 IU · mg protein⁻¹ in the CO stage. However, no significant differences were detected in CAT activity in *R. arenarum* embryos exposed to sublethal concentrations of AM during embryonic development. Control CAT activity was high and remained constant during embryonic development, averaging 110 IU · mg protein⁻¹. (Figure 3B).

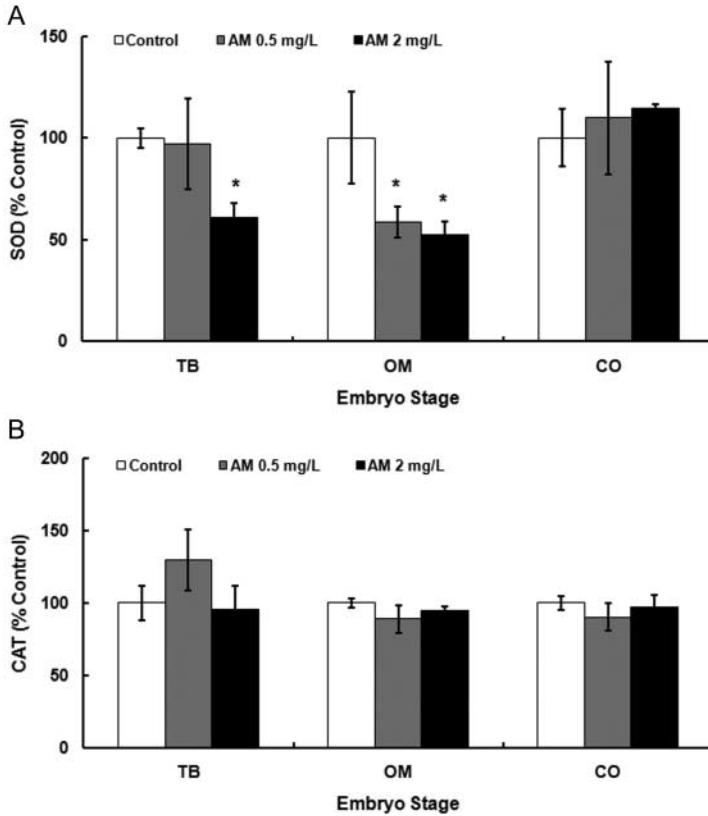


Figure 3. CAT and SOD activity in *Rhinella arenarum* embryos expressed as percentage of control activity. Embryos were exposed to 0, 0.5 and 2 mg · L⁻¹ AM from fertilization until the CO stage. (A) CAT activity in *R. arenarum* embryos. (B) SOD activity in *R. arenarum* embryos. Data represent mean ± SE from six replicates. Asterisks indicate significant differences with respect to control values (**p* ≤ 0.05) determined by ANOVA and Fisher's LSD test.

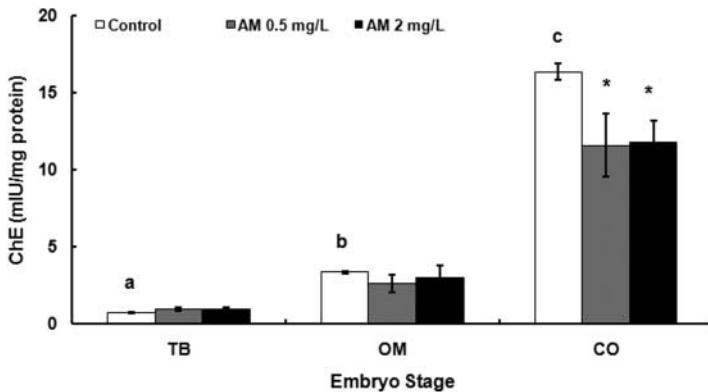


Figure 4. ChE activity in *Rhinella arenarum* embryos exposed to 0, 0.5 and 2 mg · L⁻¹ AM from fertilization until the CO stage. Data represent mean ± SE from six replicates. Asterisks indicate significant differences with respect to control values (**p* ≤ 0.05) and different letters denote significant differences between control values among different embryonic stages (*p* ≤ 0.0001) determined by ANOVA and Fisher's LSD test.

3.4. Cholinesterase activity

The primary target of organophosphorus pesticides, ChE activity, was also evaluated after AM exposure. No significant differences were observed between control embryos and those exposed to sublethal concentrations of AM, at either the TB or OM stage. However, CO embryos continuously exposed to 0.5 and 2 mg · L⁻¹ AM showed a significant decrease of 29 and 27% in ChE activity, respectively (Figure 4). Control ChE activity increased significantly throughout embryonic development.

4. Discussion

It has been documented that exposure of amphibian embryos or larvae to organophosphorus pesticides may induce diverse alterations that affect normal development [11,12,33]. In this study, we observed that 2 mg · L⁻¹ AM was capable of inducing morphological changes in *R. arenarum* embryos and affecting antioxidant defences and cholinesterase activity, whereas 0.5 mg · L⁻¹ AM transiently altered SOD activity at the OM stage and decreased ChE activity at the CO stage. It is important to mention that the highest sublethal concentration evaluated in this study, 2 mg · L⁻¹ AM, was 4.5 times lower than the concentration of 9 mg · L⁻¹ AM previously reported to cause 30% mortality in *R. arenarum* embryos at the end of their embryonic development [16].

Several authors have reported the appearance of malformations in amphibian embryos and larvae exposed to anticholinesterasic pesticides, indicating a connection between teratogenesis and ChE inhibition [11–13]. In this study, despite the fact that ChE is the primary target of AM action, its activity was only significantly inhibited by sublethal concentrations of AM at the end of embryonic development (CO stage), when control ChE specific activity reached its highest value. A lack of inhibition in early stages of *R. arenarum* development due to organophosphorus exposure has been observed previously by Caballero de Castro *et al.* [34]. Although ChE inhibition in the CO stage was not associated with mortality, it could affect vital behavioural responses of tadpoles, as noted in some studies in aquatic species [35]. In amphibians exposed to organophosphorus, the relation between behavioural alterations and ChE activity has not yet been fully assessed. Nevertheless, several studies report modifications in amphibian behaviour such as impaired swimming capacity and a decrease in food consumption due to organophosphorus exposure [36,37]. It is important to mention that the significant ChE inhibition in CO *R. arenarum* embryos exposed to 2 mg · L⁻¹ AM was accompanied by an increase in the number of malformed individuals. The malformations observed in individuals exposed to AM could be due to the inhibition of ChE activity which is crucial for neuromuscular development, as reported previously [11–13]. However, morphological alterations in *R. arenarum* embryos were also evident in earlier stages when ChE activity was not inhibited, suggesting that other molecular targets of organophosphorus are involved in teratogenesis.

Teratogenesis has also been associated with an increase in ROS or alteration in the antioxidant system [38,18]. Also, oxidation of DNA may be particularly critical in situations of oxidative stress and/or low antioxidant defences, leading to generalised teratogenic processes in several tissues. Both concentrations of AM tested in this study had diverse effects on the antioxidant system during *R. arenarum* embryonic development. At the TB stage, a significant increase in GST activity might represent an attempt to protect early embryos from insecticide toxicity by stimulation of pesticide detoxification. It is well known that the enzyme GST plays an important role in the detoxification of AM [39] and its expression is controlled by the transcription factor Nrf2, which binds to the antioxidant response element (ARE) present in the promoter region of the target gene [40,41]. An increase in GST activity has been suggested as an adaptive response to other pesticides in toad embryos [33]. As embryos exposed to sublethal concentrations of AM continue their development,

GST activity returns to control levels, reflecting the fact that continuous exposure to AM prevents the maintenance of the protective response established in TB embryos. Moreover, a significant decrease in GST activity at the end of *R. arenarum* development, caused by a lethal concentration of AM ($9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), has been reported previously [16]. In this study, GSH levels were diminished in CO embryos as a consequence of their sustained exposure to the sublethal concentration of $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AM. Similarly, GSH was depleted in CO embryos exposed to $9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AM [16]. A decrease in GSH is considered a valuable biomarker of oxidative stress in fish [42], as well as amphibians [16]. Besides, the significant decrease of GSH observed in exposed CO embryos might seriously affect their antioxidant response [39]. GSH levels are low in cells that accumulate ROS, which in turn, can damage macromolecules and impair correct embryonic development [18]. Teratogens such as hydroxyurea cause oxidative stress and induce tail and limb malformations in mouse embryos [43]. In this sense, oxidative stress caused by AM in amphibian embryos could be related to caudal alterations such as those observed in this study. At lethal concentrations, anticholinesterasic insecticides caused a situation of oxidative stress in toad embryos, which correlated with the appearance of a high percentage of malformed individuals [16]. Despite the effect on GSH levels, sublethal concentrations of AM caused no significant effects on the GSH-related enzymes GR and Se-GPox in this study. Conversely, whereas GR was significantly inhibited by the lethal concentration of $9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AM, Se-GPox activity was induced by AM at the CO stage [16]. Besides, different organophosphorus pesticides were reported to cause no effect as well as both induction and inhibition of these enzymes in aquatic vertebrates [14,35,42].

CAT and SOD are antioxidant enzymes also involved in the protection against oxidative injuries. In *R. arenarum* embryos, CAT maintained an elevated activity which was not affected by sublethal concentrations of AM along embryonic development. Similar results in *R. arenarum* embryos acutely exposed to the herbicide paraquat, whose mode of action is the generation of ROS, have been reported [44]. In this study, the enzyme SOD was in turn inhibited by sublethal concentrations of AM at the TB and OM stages. SOD inhibition could be due to the oxidation of $-\text{SH}$ groups of cysteine residues of the enzyme [45] as a result of protein damage. The inhibition of SOD activity in *R. arenarum* embryos would lead to the accumulation of superoxide anion. Besides, in individuals exposed to $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AM, SOD inhibition was accompanied by a significant increase in the percentage of malformations. When embryos reached the stage of CO, the previous inhibition of SOD activity was overcome and control values recovered. Exposure of toad embryos to lethal concentrations of AM showed in turn an inhibition in SOD activity followed by its recovery at the CO stage [16]. Similarly, it has been reported that freshwater snails exposed to AM were capable of activating compensatory mechanisms to overcome oxidative stress after an initial inhibition of SOD activity [17].

In *R. arenarum* embryos exposed to sublethal concentrations of AM, morphological abnormalities were not observed at the beginning of embryonic development but were evident from intermediate (OM) to final stages (CO). Although *R. arenarum* embryos were able to survive to $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AM under laboratory conditions, the malformations observed might impair their performance in their habitat and also affect their progression to metamorphosis [46]. In this study, the ability of embryos to adopt a correct position was impaired as a result of the morphological alterations observed, such as oedema, which forced the embryos to rest either on their dorsal surface or on their sides. Under these circumstances, malformed embryos exposed to AM displaced with difficulty and moreover, severe impairment in swimming capacity was evident. In addition, the dorsal tail flexure documented in this study also contributed to embryonic swimming impairment and has also been observed in *Xenopus laevis* larvae exposed to other anticholinesterasic compounds [11–13]. This has been noted in studies performed with different species of amphibians inhabiting agricultural areas or their surroundings [47,48].

Summarising, the results indicate that antioxidant defences were altered in early *R. arenarum* embryos exposed to sublethal concentrations of AM. These effects were followed by transcendent

morphological alterations, while GSH content and ChE activity decreased as a late effect. The connection between these biochemical alterations and the appearance of malformations at sublethal concentrations of AM was not evident in *R. arenarum* embryos. However, increased GST and decreased SOD activities could be considered as early AM expositional markers.

Taken together, these data demonstrate that sublethal concentrations of AM are a serious threat for toad embryos in their natural habitats since biochemical and morphological alterations could impair their ability to deal with an environmental stress situation.

Acknowledgements

The authors greatly appreciate the critical review of the manuscript as well as the suggestions made by Dr Guillermina A. Bongiovanni. This work was supported by grants from the Universidad Nacional del Comahue 04 I 004, from the Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) PICT-2007-00214 and PIP 2010-2012 N° 00655, CONICET.

References

- [1] US Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. *Interim Reregistration Eligibility Decision for Azinphos methyl Case No. 0235*, (2006). Available at http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/REDS/azinphosmethyl_ired.pdf.
- [2] O.L. Anguiano and A.M. Pechen de D'Angelo, *Provincia de Río Negro y Provincia de Neuquén*, in *La problemática de los agroquímicos y sus envases, la incidencia en la salud de los trabajadores, la población expuesta y el ambiente*, Ministerio de Salud de la Nación, 2007, organophosphorusS/OMS, Buenos Aires, pp. 181–201.
- [3] D.W. Sparling, G.M. Fellers, and L.L. McConell, *Pesticides and amphibian population declines in California, USA*, *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (2001), pp. 1591–1595.
- [4] M.D. Boone, R.D. Semlitsch, E.E. Little, and M.C. Doyle, *Multiple stressors in amphibian communities: Effects of chemical contamination, bullfrogs, and fish*, *Ecol. Appl.* 17 (2007), pp. 291–301.
- [5] C. Davidson and R.A. Knapp, *Multiple stressors and amphibian declines: Dual impacts of pesticides and fish on yellow-legged frogs*, *Ecol. Appl.* 17 (2007), pp. 587–597.
- [6] M. Loewy, V. Kirs, G. Carvajal, A. Venturino, and A.M. Pechen de D'Angelo, *Groundwater contamination by azinphos methyl in the Northern Patagonic Region (Argentina)*, *Sci. Total Environ.* 225 (1999), pp. 211–218.
- [7] A.P. Tosi, A.M. Pechen de D'Angelo, M.C. Savini, and R.M. Loewy, *Assesing pesticide hazards on surface water from the northern patagonian region Argentina*, *Acta Toxicol. Arg.* 17 (2009), pp. 1–7.
- [8] L. Duboscq, J. Soleño, E. Rosenbaum, M. Montagna, A. Venturino, and A.M. Pechen de D'Angelo, *Larvas de Bfo arenarum como sistema de biomonitorio en aguas provenientes de explotaciones frutícolas*, *Acta Toxicol. Arg.* 15 (2007), p. 44.
- [9] F. Matsumura, *Toxicology of Insecticides*, 2nd ed., Plenum Press, New York, 1985.
- [10] C.A. Edwards and S.W. Fisher, *The use of cholinesterase measurement in assessing the impact of pesticides on terrestrial and aquatic invertebrates*, in *Cholinesterase Inhibiting Insecticides. Their Impact on Wildlife and the Environment, Vol 2. Chemicals in Agriculture*, P. Mineau, ed., Elsevier, New York, 1991, pp. 255–275.
- [11] P. Bonfanti, A. Colombo, F. Orsi, I. Nizzetto, M. Andrioletti, R. Bacchetta, P. Mantecca, U. Fascio, G. Vailati, and C. Vismara, *Comparative teratogenicity of chlorpyrifos and malathion on Xenopus laevis development*, *Aquat. Toxicol.* 70 (2004), pp. 189–200.
- [12] A. Colombo, F. Orsi, and P. Bonfanti, *Exposure to the organophosphorus pesticide chlorpyrifos inhibits acetylcholinesterase activity and affects muscular integrity in Xenopus laevis larvae*, *Chemosphere* 61 (2005), pp. 1665–1671.
- [13] R. Bacchetta, P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara, and G. Vailati, *Axial-skeletal defects caused by carbaryl in Xenopus laevis embryos*, *Sci. Total Environ.* 392 (2008), pp. 110–118.
- [14] E.O. Oruç, Y. Sevgiler, and N. Uner, *Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl*, *Comp. Biochem. Physiol. C* 137 (2004), pp. 43–51.
- [15] A. Ferrari, A. Venturino, and A.M. Pechen de D'Angelo, *Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) detoxifying enzymes*, *Pest. Biochem. Physiol.* 88 (2007), pp. 134–142.
- [16] A. Ferrari, C.I. Lascano, O.L. Anguiano, A.M. Pechen de D'Angelo, and A. Venturino, *Antioxidant responses to azinphos methyl and carbaryl during the embryonic development of the toad Rhinella (Bufo) arenarum Hensel*, *Aquat. Toxicol.* 93 (2009), pp. 37–44.
- [17] G. Kristoff, N.R. Verrengia Guerrero, and A.C. Cochón, *Effects of azinphos-methyl exposure on enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses in Biomphalaria glabrata and Lumbriculus variegatus*, *Chemosphere* 72 (2008), pp. 1333–1339.
- [18] P.G. Wells, G.P. McCallum, C.S. Chen, J.T. Henderson, C.J.J. Lee, J. Perstin, T.J. Preston, M.J. Wiley, and A.W. Wong, *Oxidative stress in developmental origins of disease: Teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer*, *Toxicol. Sci.* 108 (2009), pp. 4–18.

- [19] A. Ferrari, L. Anguiano, C. Lascano, V. Sotomayor, E. Rosenbaum, and A. Venturino, *Changes in the antioxidant metabolism in the embryonic development of the common South American toad Bufo arenarum: Differential responses to pesticide in early embryos and autonomous-feeding larvae*, J. Biochem. Mol. Toxicol. 22 (2008), pp. 259–267.
- [20] B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed., Oxford University Press, New York, 2007.
- [21] A. Ferrari, C. Lascano, A.M. Pechen de D'Angelo, and A. Venturino, *Effects of azinphos methyl and carbaryl on Rhinella arenarum larvae esterases and antioxidant enzymes*, Comp. Biochem. Physiol. C 153 (2011), pp. 34–39.
- [22] T. Fonovich Schroeder and A.M. Pechen de D'Angelo, *Dieldrin effects on phospholipid and phosphoinositide metabolism in Bufo arenarum oocytes*, Comp. Biochem. Physiol. C 98 (1991), pp. 287–292.
- [23] J. Soleño, *Mecanismos comunes de toxicidad de plaguicidas: Interacción entre carbaril y metilazinfos*, Graduate thesis, Universidad Nacional del Comahue, 2000.
- [24] E. Del Conte and J.L. Sirlin, *Pattern series of the first embryony stages in Bufo arenarum*, Anat. Rec. 112 (1952), pp. 125–130.
- [25] J.A. Bantle, J.N. Dumont, R.A. Finch, and G. Linder, *Atlas of Abnormalities: A Guide for the Performance of FETAX*, Oklahoma State Publications, Stillwater, 1991.
- [26] G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres Jr, and R.M. Featherstone, *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*, Biochem. Pharmacol. 7 (1961), pp. 88–95.
- [27] W.H. Habig, M.J. Pabst, and W.B. Jacoby, *Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation*, J. Biol. Chem. 249 (1974), pp. 7130–7139.
- [28] M. Schaedle and J.A. Bassham, *Chloroplast glutathione reductase*, Plant Physiol. 59 (1977), pp. 1011–1012.
- [29] C. Di Ilio, G. Polidoro, A. Arduini, A. Muccini, and G. Federici, *Glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione S-transferase and γ -glutamyl transpeptidase activities in human early pregnancy placenta*, Biochem. Med. 29 (1983), pp. 143–148.
- [30] R.F. Beers and I.W. Sizer, *A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase*, J. Biol. Chem. 195 (1952), pp. 133–140.
- [31] F. Paoletti, D. Aldinucci, A. Mocali, and A. Caparrini, *A sensitive spectrophotometric method for determination of superoxide dismutase activity in tissue extract*, Anal. Biochem. 154 (1985), pp. 536–541.
- [32] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall, *Protein measurement with the Folin phenol reagent*, J. Biol. Chem. 193 (1951), pp. 265–275.
- [33] O.L. Anguiano, A. Caballero Castro, and A.M. Pechen de D'Angelo, *The role of glutathione conjugation in the regulation of early toad embryos' tolerance to pesticides*, Comp. Biochem. Physiol. C 128 (2001), pp. 35–43.
- [34] A. Caballero Castro, E.A. Rosenbaum, and A.M. Pechen de D'Angelo, *Effect of malathion on Bufo arenarum Hensel development – I. Esterase inhibition and recovery*, Biochem. Pharmacol. 41 (1991), pp. 491–495.
- [35] P. Kavitha and J. Venkateswara Rao, *Oxidative stress and locomotor behaviour response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, Gambusia affinis after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos*, Pestic. Biochem. Physiol. 87 (2007), pp. 182–188.
- [36] H.P. Gurushankara, S.V. Krishnamurthy, and V. Vasudev, *Effect of malathion on survival, growth, and food consumption of Indian cricket frog (Limnonectes limnocharis) tadpoles*, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 52 (2007), pp. 251–256.
- [37] M.R. Wijesinghe, M.G. Bandara, W.D. Ratnasooriya, and G.P. Lakraj, *Chlorpyrifos-induced toxicity in Duttaphrynus melanostictus (Schneider 1799) larvae*, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 17 (2010), pp. 1411–1421.
- [38] P.A. Denery, *Effects of oxidative stress on embryonic development*, Birth Defects Res. C Embryo Today 81 (2007), pp. 155–162.
- [39] M. Jokanović, *Biotransformation of organophosphorus compounds*, Toxicology 166 (2001), pp. 139–160.
- [40] A.K. Jaiswal, *Nrf2 signalling in coordinated activation of antioxidant gene expression*, Free Radical Biol. Med. 36 (2004), pp. 1199–1207.
- [41] C.J. Harvey, R.K. Thimmulappa, A. Singh, D.J. Blake, G. Ling, N. Wakabayashi, J. Fujii, A. Myers, and S. Biswal, *Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress*, Free Radical Biol. Med. 46 (2009), pp. 443–453.
- [42] S. Peña-Lopis, M.D. Ferrando, and J.B. Peña, *Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine*, Aquat. Toxicol. 65 (2003), pp. 337–360.
- [43] A.E. Schlisser, J. Yan, and B.F. Hales, *Teratogen-induced oxidative stress targets glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the organogenesis stage mouse embryo*, Toxicol. Sci. 118(2) (2010), pp. 686–695.
- [44] M.A. Mussi and N.B. Calcaterra, *Paraquat-induced oxidative stress response during amphibian early embryonic development*, Comp. Biochem. Physiol. C 151 (2010), pp. 240–247.
- [45] M.S.T. Dimitrova, V. Tsinova, and V. Velcheva, *Combined effect of zinc and lead on the hepatic superoxide dismutase-catalase system in carp (Cyprinus carpio)*, Comp. Biochem. Physiol. C 108 (1994), pp. 43–46.
- [46] D.W. Sparling and G.M. Fellers, *Toxicity of two insecticides to California, USA, anurans and its relevance to declining amphibian populations*, Environ. Toxicol. Chem. 28 (2009), pp. 1696–1703.
- [47] M.L. Harris, C.A. Bishop, J. Struger, B. Ripley, and J.P. Bogart, *The functional integrity of northern leopard frog (Rana pipiens) and green frog (Rana clamitans) populations in orchard wetlands. II. Effects of pesticides and eutrophic conditions on early life stage development*, Environ. Toxicol. Chem. 17 (1998), pp. 1351–1363.
- [48] P.A. Spear, M. Boily, I. Giroux, C. Deblois, M.H. Leclair, M. Levasseur, and R. Leclair, *Study design, water quality, morphometrics and age of the bullfrog, Rana catesbeiana, in sub-watersheds of the Yamaska River drainage basin, Québec, Canada*, Aquat. Toxicol. 91 (2009), pp. 110–117.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Pesticide Biochemistry and Physiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pest

Organophosphorus insecticides affect normal polyamine metabolism in amphibian embryogenesis

Cecilia I. Lascano^{a,b}, Ana Ferrari^{a,c}, Lidia E. Gauna^b, Claudia Cocca^d, Adriana C. Cochón^e, Noemí Verrengia^e, Andrés Venturino^{a,b,*}

^aLIBIQUIMA, Facultad de Ingeniería, IDEPA, Universidad Nacional del Comahue – CONICET, Buenos Aires 1400, 8300 Neuquén, Argentina

^bFacultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue, Ruta 151 Km 12.5, 8303 Cinco Saltos, Río Negro, Argentina

^cFacultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional del Comahue, Toschi y Arrayanes, 8324 Cipolletti, Río Negro, Argentina

^dLaboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 954, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

^eDepartamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, Pab. II. 4^{to} piso, Nuñez, 1428 Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 June 2011

Accepted 9 October 2011

Available online 14 October 2011

Keywords:

Organophosphorus pesticides

Putrescine

Spermidine

Spermine

Ornithine decarboxylase

Malformations

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the concentration- and time-dependent effects of the organophosphorus insecticides malathion and azinphos-methyl on polyamine metabolism, and relate them to normal and altered embryonic development of the common toad *Rhinella arenarum*. Control embryos showed that the higher polyamines spermidine and spermine acquired importance with respect to the diamine putrescine as embryonic development progressed. The activity of ornithine decarboxylase significantly decreased in complete operculum embryos. Continuous exposure to malathion caused a decrease in polyamine levels during embryonic development. However, there was an increase in putrescine levels in complete operculum embryos exposed to a sublethal concentration of the insecticide. Embryos exposed to malathion displayed a decrease in fresh weight and size, along with an increase in the number of malformed individuals. *R. arenarum* embryos exposed to a lethal concentration of azinphos-methyl showed an increase in putrescine levels and a decrease in spermidine and spermine levels, accompanied by an increase in ornithine decarboxylase activity. In conclusion, as the embryonic development of the toad *R. arenarum* progresses, polyamine metabolism shifts to higher polyamine levels with a more preponderant contribution of spermidine and spermine with respect to putrescine and involves a dramatic change in ornithine decarboxylase activity, one of the key regulatory enzymes of the pathway. Organophosphorus insecticides are capable of altering polyamine metabolism, slowing embryo development in parallel with a reduction in spermidine and spermine levels. An increase in the oxidative degradation of polyamines might be involved in the toxic action of organophosphorus insecticides and might also be related to other effects such as teratogenesis.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Polyamines are aliphatic polycations essential for normal cell growth, differentiation and progression of developmental processes [1,2]. Due to their polycationic nature, they are capable of interacting with nucleic acids and proteins. Polyamines stimulate protein synthesis [3], regulate the activity of ion channels [4,5], the activity of G-proteins in signal transduction [6] and the expression of proto-oncogenes [7]. Polyamines also act as scavengers of reactive oxygen species [8]. Consequently, organisms have developed complex regulatory machinery to control intracellular levels

of polyamines [9]. The first and key point of control in polyamine metabolism is the activity of ornithine decarboxylase (ODC), which catalyzes the decarboxylation of ornithine into the diamine putrescine (Put). Studies conducted in mice harboring a disrupted ODC gene and in pregnant mice exposed to the suicide ODC inhibitor α -difluoromethylornithine (DFMO), revealed that the enzyme ODC is essential for cell survival during early murine development [10,11].

Many studies, performed with different classes of pesticides, report both delay and arrest of embryonic development in several species [12–14]. In spite of the fact that polyamine metabolism is clearly related to normal and altered development, works connecting the effects of pesticides and polyamines are scarce. The herbicide paraquat has been the main compound employed in this kind of study, as its uptake into the cell is driven by the polyamine transport system. Paraquat's effects on polyamine metabolism

* Corresponding author at: LIBIQUIMA, Facultad de Ingeniería, IDEPA, Universidad Nacional del Comahue – CONICET, Buenos Aires 1400, 8300 Neuquén, Argentina. Fax: +54 299 4490385.

E-mail address: a.venturino@conicet.gov.ar (A. Venturino).

have been studied on plants, mammals, and cultured cells [15–17]. Cochón et al. [18] performed a study in freshwater invertebrates, using a commercial formulation of paraquat, relating oxidative stress parameters to polyamine levels. Several authors have reported that aquatic vertebrates, such as amphibian embryos and larvae, exposed to organophosphorus (OP) and carbamate pesticides display diverse developmental alterations [19–22]. Some studies have been conducted to address the interaction between the toxicological effects of the anticholinesterase OP pesticides and polyamines in aquatic organisms. These studies employed exogenously applied Put, spermidine (Spd) and spermine (Spm). Venturino et al. [23,24] determined that exogenously applied polyamines increased malathion (Mtn) toxicity and acetylcholinesterase inhibition, and decreased glutathione levels in *R. arenarum* larvae.

The objective of the present study was to evaluate the concentration- and time-dependent effects of the OP pesticides Mtn and azinphos-methyl (Azm) on polyamine metabolism, and relate them to normal and to altered embryonic development of the common toad *R. arenarum*.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Azinphos-methyl (99.0% purity) was purchased from Chem Service (West Chester, PA, USA). Malathion (98% purity) was kindly provided by Cyanamid, Argentina, and purified by thin layer chromatography to eliminate possible storage contaminants. Putrescine dihydrochloride, spermidine trihydrochloride, spermine tetrahydrochloride, pyridoxal 5'-phosphate monohydrate, L-ornithine monohydrochloride and bovine serum albumin were purchased from Sigma Co. (St. Louis, MO, USA). L-[14C]-ornithine was purchased from New England Nuclear. Scintillation liquid Optiphase "Hisafe" 3 was purchased from Perkin-Elmer (Shelton, CT, USA). All the other reagents used were of analytical grade.

2.2. Toad embryo development and insecticide exposure

Three independent experiments were performed for each pesticide, using three different sets of parents. Ovulation was induced by intraperitoneal injection of 2500 international units (IU) of human chorionic gonadotrophin. *R. arenarum* embryos were obtained by *in vitro* fertilization as previously described [25]. Groups of 500 newly fertilized embryos were transferred to glass recipients containing either amphibian Ringer's solution (0.65 g/L NaCl; 0.01 g/L KCl; 0.02 g/L Ca₂Cl) (control group) or pesticide solution, keeping a ratio of 1 embryo/mL solution. Pesticide solutions of 0.5 mg/L, 2 mg/L, and 9 mg/L Azm, and 22 mg/L and 44 mg/L Mtn were prepared by diluting an insecticide standard solution prepared in acetone, with an appropriate amount of amphibian Ringer's solution, keeping acetone to 0.3% in the final solution. The exact concentration of the insecticide in the standard solutions was checked by gas chromatography with a nitrogen-phosphorus detector (GC-NPD). Controls of 0.3% acetone were also performed. The treatments were carried out in duplicate. The solutions were renewed every 48 h until embryos reached the stage of complete operculum (CO) [26]. The embryos were maintained at 18–20 °C in a 12 h light–12 h dark photoperiod without feeding. Viability of individuals and malformations were monitored with a stereoscopic microscope [27]. Embryonic development was assessed in samples of non-treated embryos and embryonic stages were determined according to [26]. During the continuous exposure, samples were taken at different embryonic stages to evaluate polyamine levels and ODC activity.

2.3. Ornithine decarboxylase activity

Fifty tail bud-(TB), twenty-five open mouth-(OM), and twenty-five CO embryos were sampled for determination of ODC activity and homogenized in 1 mL of 50 mM Hepes buffer pH 7.4 containing 0.1 mM EDTA, 0.04% Triton X-100, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM pyridoxal-5'-phosphate and protease inhibitors (0.05 mM phenylmethanesulfonyl fluoride and 0.001 µg/µL leupeptin, aprotinin and NaF). Homogenized samples were centrifuged at 20,000g for 40 min at 4 °C and the supernatant was collected for determination of ODC enzymatic activity. ODC activity was assayed by measuring the release of ¹⁴CO₂ from L-[14C]-ornithine according to [28], with slight modifications. The standard reaction mixture consisted of homogenization buffer plus L-ornithine and L-[14C]-ornithine (1 mM, 0.1–0.2 µCi) in a final volume of 50 µL. Enzyme reaction was initiated by the addition of 15 µL of samples. Blank solvent and sample controls were run in parallel, replacing sample with homogenization buffer and difluoromethylornithine (DFMO)-inactivated samples, respectively. The reaction was performed for 1 h at 30 °C in agitation and ¹⁴CO₂ was trapped on a 2 cm × 2 cm piece of filter paper soaked with 2 N KOH. The reaction was stopped by the addition of 50 µL of 0.25 N HClO₄ and maintained under the same conditions for 1 h. Filter papers were then transferred to scintillation vials and 0.5 mL 1% Triton X-100 were added along with 5 mL of scintillation liquid Optiphase "Hisafe" 3. Radioactive CO₂ was then measured in a liquid scintillation counter (Wallac Win-spectral 1414).

2.4. Polyamine content determination

Fifty embryos from early developmental stages were homogenized in 1 mL of 143 mM potassium phosphate buffer pH 7.5 with 6.3 mM EDTA and 0.2 N HClO₄. Twenty-five embryos from OM stage on were also processed in this way. Samples were incubated on ice for 1 h and centrifuged 10 min at 3000g. The supernatant was derivatized with 20 mg/mL dansyl chloride [29] and polyamine content was assessed by HPLC reverse-phase separation and fluorometric quantitation [30]. 1,7-Diamine heptane was used as an internal standard both for samples and calibration standards.

2.5. Evaluation of morphological parameters

Embryo morphology was evaluated with the aid of a stereoscopic microscope, and the type and number of malformations was registered. The malformations were typified according to [31]. Mortality was determined by the absence of blood circulation in the gills and caudal fin, or the lack of a heart beat. Dead embryos were removed and were not included in any morphological or biochemical analysis. Control embryos at the end of development displayed <5% mortality under laboratory conditions.

Embryo length was measured with a submillimetric scale under a stereoscopic microscope. Fresh weight was determined in groups of 20–40 embryos using an analytical balance, after a careful elimination of residual water with filter paper.

2.6. Protein determination

Protein content was determined according to [32] using bovine serum albumin as the standard.

2.7. Data analysis

Three independent experiments were performed for each pesticide and, within each assay, the different treatments were tested in duplicate. For the statistical analysis, data from the three experiments were pooled ($n = 6$ for each embryo stage and treatment)

as no significant differences between experiments were observed. Statistical differences between treatments were assessed by ANOVA and Fisher's lowest significant differences (LSD) *post hoc* test for polyamines and ODC data. Student–Newman–Kewls test was used for the statistical assessment of morphological parameters. Percentage mortality data were transformed by the arcsin of the square root of the probability value previous to the analysis.

The influence of the different biochemical and morphological parameters in the variability of response to OP treatments (concentration- and time-dependent) and possible correlations among them were assessed by principal component analysis (PCA) using the NTSYS program.

3. Results

Among the control embryos, the levels of the three polyamines studied markedly increased from oocyte to the last embryonic stage of CO (Fig. 1). Put was the major polyamine and showed a 15-fold increase at CO, reaching 30 nmol/mg protein. The increase in Spd levels throughout embryonic development was more significant, reaching 10 nmol/mg protein, which was about two orders of magnitude higher than Spd levels in the oocyte. A similar increase in Spm levels was also observed during development of *R. arenarum*, which reached 1.2 nmol/mg protein at CO stage. Thus, the higher polyamines Spd and Spm gained importance with respect to the diamine Put as embryonic development progressed, since

the Put:Spd:Spm ratio varied from 132.5:6.5:1 at fertilization to 24.5:8:1 at CO stage.

3.1. Effects of malathion on polyamine levels and embryonic development

The OP pesticide Mtn caused concentration- and stage-dependent alterations on polyamine levels. The first significant decrease in polyamine levels was observed at intermediate embryonic development, when embryos continuously exposed to Mtn reached the stage of gill circulation (GC; 6 days postfertilization) (Fig. 1). GC embryos exposed to 44 mg/L Mtn (close to LC₅₀) displayed a significant decrease in Put, Spd and Spm levels (50%). Embryos continuously exposed to 22 mg/L Mtn (sublethal concentration) displayed a 50% reduction in Put levels and a 35% decrease in Spd levels, while Spm levels were not affected by insecticide exposure. In turn, at CO stage (10 days of exposure), exposure to 44 mg/L Mtn significantly diminished Put (35%), Spd (50%) and Spm (60%) levels. However, exposure to the sublethal concentration of 22 mg/L Mtn led to an increase in Put levels (65%) while the other two polyamines significantly decreased.

Corporal parameters, i.e. body length and fresh weight, as well as malformations caused by the exposure to Mtn, were also assessed to see if they were correlated with the effect on polyamine levels. Exposure to 44 mg/L Mtn caused a progressive shortening of the embryos, which became noticeable from GC stage on, but the sublethal concentration did not cause visible effects (Table 1). Fresh weight was a more sensitive parameter, since it decreased significantly from the early TB stage in embryos exposed to 44 mg/L Mtn and reached a 43% reduction by CO stage. Fresh weight in embryos exposed to 22 mg/L Mtn was significantly reduced from GC stage on. Teratogenic rates were also increased by exposure to 44 mg/L Mtn during embryonic development. At GC stage, 8% of the embryos displayed malformations when compared to control values (2%). At opercular fold stage (OF), 21% of embryos were malformed when compared to controls (8%). And at the end of embryonic development, 63% of embryos were malformed (control values 10%) (Table 1). The most common alterations registered at CO stage in embryos exposed to 44 mg/L Mtn were lateral flexure of the tail, generalized edema, axial shortening, neural tube closure impairment, organ displacement and deformed body axis. By the end of embryonic development, mortality increased in embryos exposed to 44 mg/L Mtn as a result of the alterations caused by this concentration, with a significant reduction in survival (30%) ($p < 0.01$). Exposure to the sublethal concentration of Mtn showed malformation rates similar to control embryos and no mortality was observed with this treatment.

3.2. Effects of azinphos-methyl on polyamine levels, ODC activity and embryonic development

The study of OP effects on polyamine levels was extended to Azm, another pesticide which is frequently used for pest control in fruit orchards in the northern Patagonic region. In these assays, two sublethal concentrations of Azm were tested (0.5 and 2 mg/L). A third concentration of 9 mg/L Azm was also included, which caused a significant mortality at the end of embryonic development after continuous exposure (18.9%; $p < 0.05$). None of the three concentrations of Azm were able to significantly affect polyamine levels in continuously exposed embryos by the stages of TB and OM (3 days and 7 days of exposure since fertilization, respectively) (Fig. 2A–C). However, after 10 days of exposure to 9 mg/L Azm, embryos reaching CO stage displayed a 61% increase in Put levels and a 42% decrease in the amount of Spd when compared to control values. Spm levels decreased 45% in CO embryos

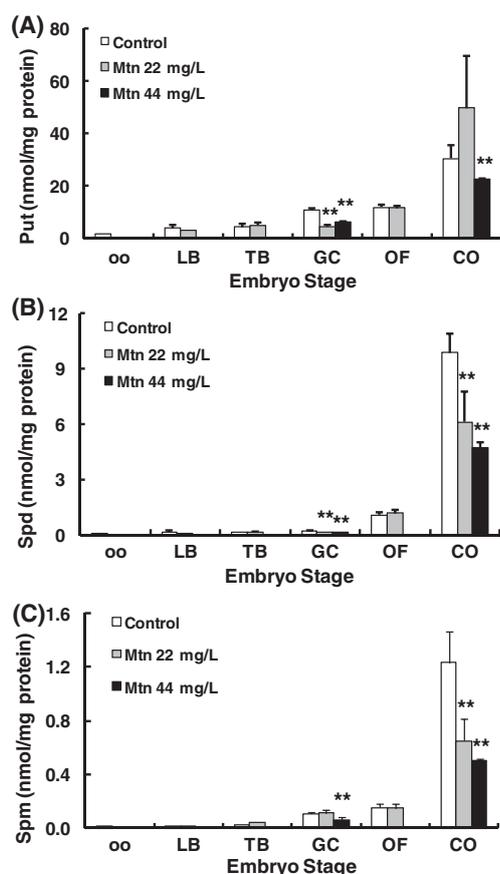


Fig. 1. Polyamine content determined in *Rhinella arenarum* embryos continuously exposed to 22 mg/L Mtn or 44 mg/L Mtn from fertilization until CO stage. (A) Put content. (B) Spd content. (C) Spm content. Data represent Mean \pm SEM from 3 independent experiments with treatments performed in duplicate ($n = 6$). Asterisks indicate significant differences with respect to control values (** $p \leq 0.01$) determined by ANOVA and Fisher's LSD test. CO: complete operculum; GC: gill circulation; LB: late blastulae; OF: opercular fold; oo: oocyte; TB: tail bud.

Table 1
Corporal parameters and malformation rates in *Rhinella arenarum* embryos continuously exposed to malathion.

Stage (exposure duration)	Control	Malathion 22 mg/L	Malathion 44 mg/L
<i>Embryo length (mm)</i>			
TB (3 days)	3.4 ± 0.2	3.4 ± 0.2	3.2 ± 0.3
GC (6 days)	5.5 ± 0.2	5.5 ± 0.1	4.8 ± 0.1****††
OF (8 days)	7.1 ± 0.3	7.1 ± 0.0	6.2 ± 0.2****††
CO (10 days)	7.9 ± 0.2	7.5 ± 0.2	6.5 ± 0.0****††
<i>Fresh weight (mg)</i>			
TB (3 days)	3.13 ± 0.25	2.97 ± 0.50	1.96 ± 0.45****††
GC (6 days)	4.57 ± 0.32	3.99 ± 0.13**	3.00 ± 0.58**
OF (8 days)	7.91 ± 0.75	6.31 ± 0.11*	5.61 ± 0.58*
CO (10 days)	9.50 ± 0.11	8.00 ± 0.58*	5.48 ± 0.05****††
<i>Malformation rate (%)</i>			
TB (3 days)	2.1 ± 1.2	4.3 ± 3.5	8.3 ± 2.4
GC (6 days)	1.4 ± 1.4	2.6 ± 2.1	7.6 ± 1.5*
OF (8 days)	8.1 ± 3.1	9.3 ± 3.6	21.2 ± 5.9*
CO (10 days)	7.5 ± 1.3	10.1 ± 1.5	62.6 ± 5.9****††

Mean ± SEM are shown. Treatments were performed in duplicate and data from three independent assays were pooled for statistical analysis. Total length was measured in 20 embryos of each treatment. Fresh weight was determined in groups of 40 (TB stage) or 20 (GC–CO stages) embryos. Malformations were analyzed in all embryos of each experimental unit. Statistical differences were assessed by ANOVA-Student-Newman-Kewels test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ vs. controls; † $p < 0.01$, †† $p < 0.0001$ vs. Mtn 22 mg/L. TB: tail bud; GC: gill circulation; OF: opercular fold; CO: complete operculum.

exposed to 9 mg/L Azm with respect to control values, although the difference was not statistically significant ($p = 0.08$).

ODC activity was analyzed in the same samples to determine if there was any kind of control at the level of this rate-limiting step of polyamine synthesis. Control ODC activity in *R. arenarum* embryos increased 2-fold between the stages of TB and OM, and subsequently decreased 22-fold when embryos reached the end of embryonic development (Fig. 2D). ODC activity in early TB embryos was not affected by Azm exposure. However, continuous exposure to 9 mg/L Azm caused a 2-fold and 10-fold increase in ODC activity at OM and CO stages, respectively, when compared to control embryos.

Teratogenic effects were also registered in these assays. In summary, 0.5 mg/L Azm did not affect embryonic development, but

2 mg/L Azm caused abnormalities in 12% and 24% of embryos at the OM and CO stages, respectively ($p < 0.05$) when compared to control percentages. Embryos exposed to 9 mg/L Azm at the TB stage displayed no significant differences in the percentage of malformations when compared to controls. However, when they reached the stage of OM, the percentage of malformed embryos increased significantly due to exposure to 9 mg/L Azm (10% vs. 6.5% in controls; $p < 0.05$). Finally, when embryos reached the CO stage at the end of embryonic development, 100% of the individuals exposed to 9 mg/L Azm displayed malformations (control values 14.4%; $p < 0.05$). The morphological abnormalities commonly found included gill atrophy, decreased body size, body blistering, dorsal tail flexure, wavy tail, abdominal edema and axial shortening. Embryos exposed to 9 mg/L AM suffered significant mortality (18%, $p < 0.05$) at the end of embryonic development.

3.3. Correlation analysis

We analyzed the contribution of the different variables and their covariance to the variability of response to different OP treatments, concentration and time of exposure, employing principal component analysis (PCA). The PCA including corporal parameters clearly showed a covariance of polyamines and body weight and length on the main component explaining 71.0% of the variability in embryonic development as a result of OP exposure. The rate of malformations was the single variable of influence in the second component in order of importance (15.8%) (Fig. 3A). The projection of the combined treatments and embryo stages in the main plane of the principal components resulted in two clusters defined by early (TB–GC) and intermediate embryonic stages (OM–OF) (Fig. 3B). This suggests that there were no major effects due to the applied treatments. At CO stage, treatments caused an important separation in the first component (defined by alterations in polyamine levels and body parameters) and the second component (defined by the increase in the number of malformations).

Finally, the correlation of ODC activity and polyamine levels was analyzed. For this purpose, each polyamine/ODC ratio was calculated from data for each embryonic stage and Azm treatment. To compare the three polyamines, ratios were in turn referred to TB ratio values in non-exposed embryos. No significant variations

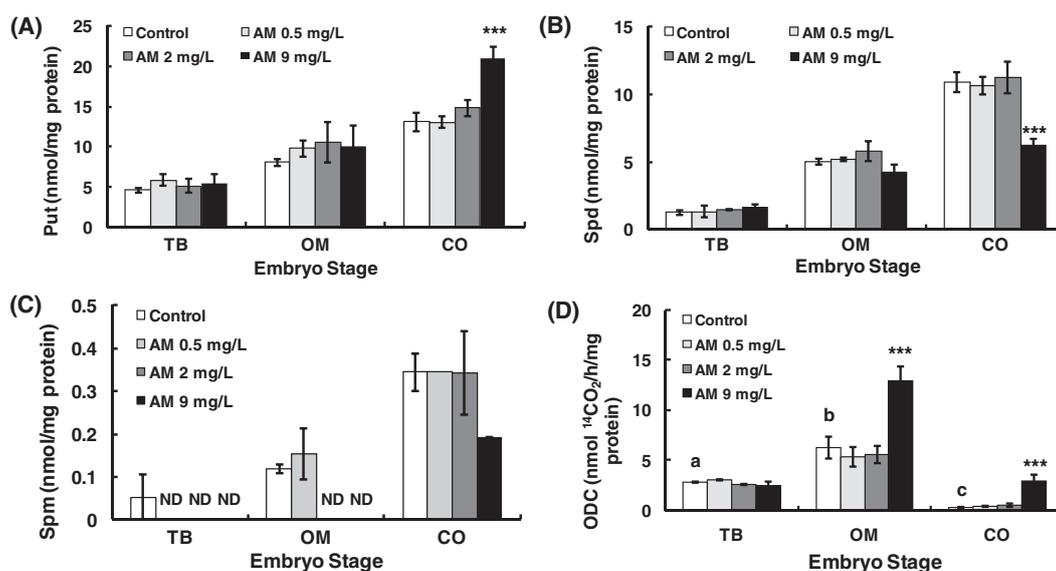


Fig. 2. Polyamine content and ODC activity in *R. arenarum* embryos continuously exposed to 0.5 mg/L Azm, 2 mg/L Azm or 9 mg/L Azm from fertilization until CO stage. (A) Put content. (B) Spd content. (C) Spm content. (D) ODC activity. Data represent Mean ± SEM from 3 independent experiments with treatments performed in duplicate ($n = 6$). Asterisks indicate significant differences with respect to control values (*** $p < 0.001$) and different letters denote significant differences between control values among different embryonic stages ($p \leq 0.05$), determined by ANOVA and Fisher's LSD test. CO: complete operculum; ND: not detected; OM: open mouth; TB: tail bud.

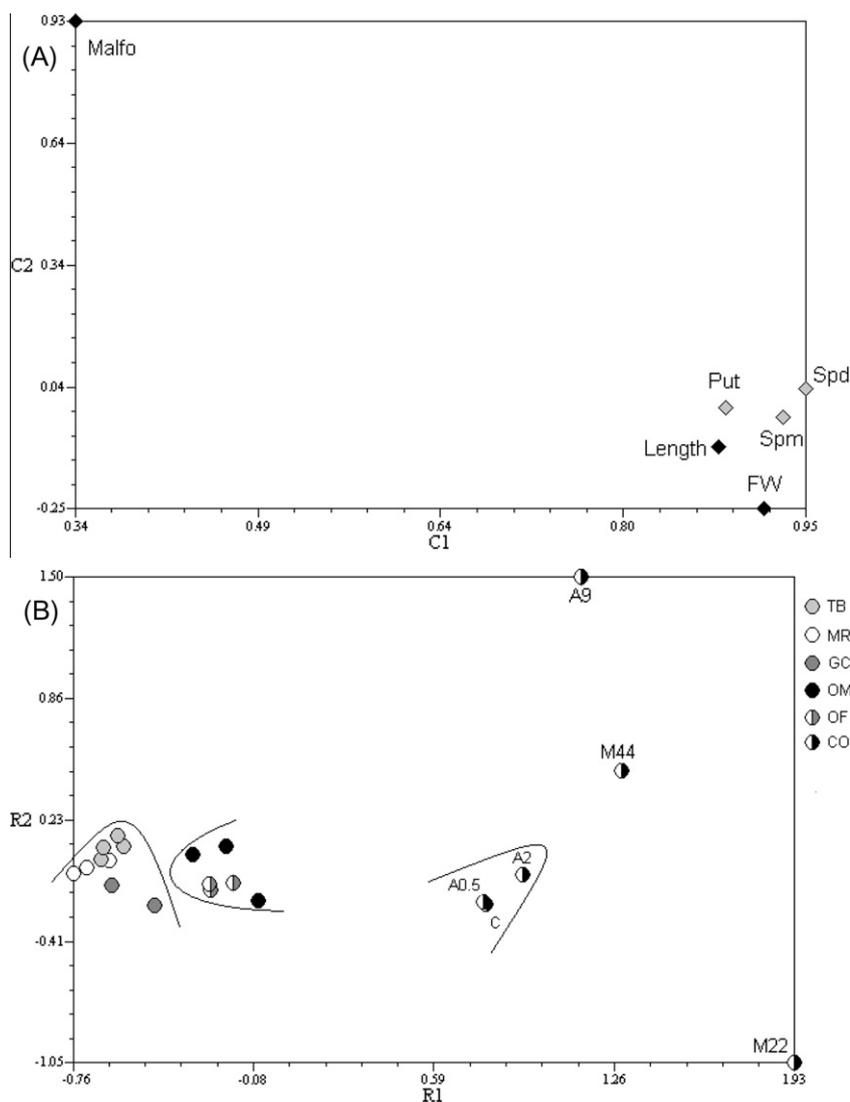


Fig. 3. Principal Component Analysis (PCA) of the measured variables of response. (A) PCA performed on Mtn exposure effects is shown in the main plane of two components. C1 = 71.0%; C2 = 15.8% of the total variability. Malfo: malformation rates; Put: putrescine; Spd: spermidine; Spm: spermine; FW: fresh weight. (B) Individual projection of stage-treatment combinations on the principal component plane. The particular treatments and stage (time) effects are projected in the two principal components of variability: R1 axis represents levels of polyamines and corporal parameters; R2 axis contains malformation rates as the main response variable. Stages represented are TB: tail bud (3 d); MR: muscular response (4 d); GC: gill circulation (6 d); OM: open mouth (7 d); OF: opercular fold (8 d); CO: complete operculum (10 d). Three groups are visualized that separate on the R1 component. Treatments with the OP are indicated only for CO stage where a significant separation in both components is observed. C: control; A: azinphos methyl; M: malathion; concentrations are expressed in mg/L.

were observed between polyamine/ODC ratios at TB with respect to OM stage and no significant effects were caused by Azm at these stages (Fig. 4A). At CO stage, the control polyamine/ODC ratio increased noticeably, being 28 times higher than the Put/ODC ratio, 87 times higher than the Spd/ODC ratio and 66 times higher than the Spm/ODC ratio with respect to TB stage (Fig. 4B). These increased ratios resulted from a rise in the three polyamines and a subsequent downregulation of ODC activity at CO stage in non-exposed embryos (Fig. 2). Azm exposure prevented, in a concentration-dependent manner, the increase in polyamine/ODC ratios at CO stage, with a maximal effect leading to an approximately 4-fold increase for the three polyamines at the 9 mg/L treatment.

4. Discussion

Polyamine levels continuously increased during the embryonic development of the toad *R. arenarum* (Figs. 1 and 2). Polyamines are involved in different biological processes and their participation

in embryonic development has been documented in organisms such as sea urchin [33], fish [34], frogs [35,2] and mice [10,36]. It has been shown that a coordinated regulation of polyamine metabolism is indispensable for the operation of the cell cycle. In human dermal fibroblasts, an increase in polyamine content is necessary for DNA replication, and the subsequent relative polyamine depletion due to polyamine acetylation by Spermidine/spermine *N*¹-acetyltransferase (SSAT) is necessary for mitosis to reach completion [37]. Disruption of the cell cycle, as well as DNA damage, has also been reported in kidney epithelial cells which overexpress SSAT [38]. The first rate limiting step in the polyamine biosynthetic pathway is catalyzed by the enzyme ODC. In our study, an increase in ODC activity was accompanied by an increase in Put and the higher polyamines during the early and intermediate stages in non-exposed *R. arenarum* embryos, but a noticeable divergence was observed at the end of embryonic development when ODC activity dropped down ten-fold. Work by Russell [35] determined that ODC activity increased throughout embryonic development for the frog *Xenopus laevis*. However, in accordance with our results,

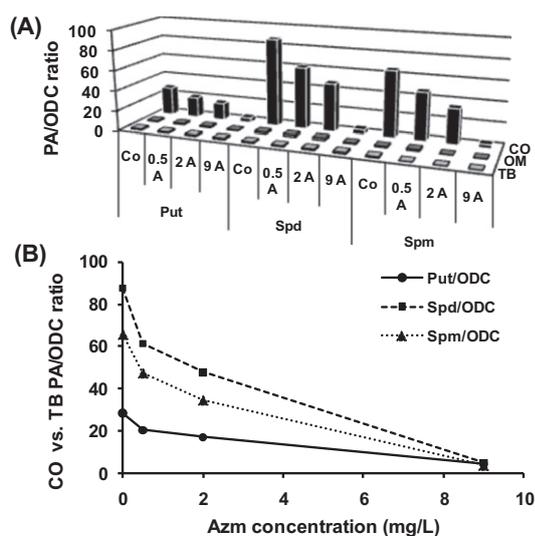


Fig. 4. Effect of Azm on PA/ODC ratios. (A) PA/ODC ratios were calculated dividing polyamine concentrations by ODC activities at the different embryonic stages. (B) PA/ODC ratios were normalized with respect to TB control ratios. A: azinphos methyl; CO: complete operculum; TB: tail bud.

Osborne et al. [39] reported that ODC activity in *X. laevis* increased from the 2-cell stage up to the mid blastula transition and then decreased rapidly. The reason for the decrease in ODC activity observed in CO *R. arenarum* embryos is not clear; nevertheless, the sustained increase in Put, Spd and Spm could suggest a regulatory effect of polyamines on ODC activity. The enzyme ODC is regulated by polyamines at the levels of transcription and translation as well as transcript and ODC protein stability [40]. Both the transcription of the ODC gene and the translation of ODC mRNA are stimulated by low levels of polyamines. On the contrary, high levels of polyamines exert a feedback inhibition on ODC through stimulation of a frameshifting event on antizyme (AZ) mRNA. The AZ protein binds to the ODC monomer thus inactivating ODC and targeting it for degradation [41,40]. The pattern of polyamine levels determined in control *R. arenarum* embryos in the present study, where the main polyamine is Put, followed in order of abundance by Spd and Spm, coincides with that reported for organisms such as *X. laevis* and the freshwater gastropod *Biomphalaria glabrata* [19,2]. In some cases, however, the polyamines Spd and/or Spm become more abundant than Put, as occurs in the freshwater oligochaete *Lumbriculus variegatus* [19] as well as in cultured cells [42]. According to Igarashi and Kashiwagi [43], Put and Spd predominate in prokaryotic cells, which grow rapidly, whereas Spd and Spm predominate in eukaryotic cells, which proliferate relatively slowly. Osborne et al. [2] reported that the intracellular Spd concentration must be retained within certain limits with respect to Put to allow normal development in *X. laevis*. The maintenance of high Put levels with respect to Spd and Spm is a necessary factor for correct embryonic development in *X. laevis* and can be explained by the low levels of both S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) mRNA and SAMDC protein as reported by Shinga et al. [44]. Also, the fact that Put was the most abundant polyamine detected in *R. arenarum* embryos in this work could point to the high rate of cell division that embryos experience during their development. Another feature observed in *R. arenarum* development was the increase in Spd and Spm levels with respect to Put as embryos progressed to CO stage. Studies performed by Ogasawara et al. [45] determined that Spm was the most potent polyamine with regards to protein synthesis stimulation, followed by Spd and Put in order of potency. Thus, Igarashi and Kashiwagi [43] suggest that the existence of Spm in slowly

growing eukaryote cells may be biochemically and energetically economical.

In spite of the fact that polyamines are recognized as essential polycations for normal development and that their levels are as a consequence highly regulated, almost no studies have been undertaken to analyze the influence of pesticides on polyamine metabolism. Intracellular levels of polyamines must be maintained within narrow limits, since a decrease of polyamine levels interferes with cell growth, whereas an excess appears to be toxic [46,47]. In the present study, we demonstrate that two OP pesticides, Azm and Mtn, are able to affect in a concentration- and time-dependent manner the levels of polyamines during the embryonic development of the amphibian *R. arenarum*. The reduction in polyamines, mainly Spd and Spm, is highly correlated to a decrease in embryo development as a consequence of OP exposure, measured using body parameters such as fresh weight and length (Fig. 3A). The depletion of polyamines impairs several processes such as cell cycle progression and cellular proliferation and growth [48,38], which may explain the reduction in the developmental rate observed in embryos exposed to OP pesticides in the present study. Some of the malformations elicited by OP exposure in toad embryos may be related to tissue-specific alterations in polyamine metabolism. Nevertheless, polyamine levels and the number of alterations in development were not correlated in the present work (Fig. 3A).

An increase in Put levels was detected at the end of embryonic development in *R. arenarum* embryos exposed to a sublethal concentration of Mtn and those exposed to a lethal concentration of Azm (Figs. 1 and 2). Increasing levels of Put have also been detected in *Xenopus laevis* tadpoles exposed to a convulsant agent, suggesting a neuroprotective role for polyamines due to Put conversion into γ -amino butyric acid (GABA) neurotransmitter [49]. We suggest that the increase of Put observed in CO embryos exposed to OP in the present study is an attempt to overcome the depletion of higher polyamines (Spd and Spm) and to recover normal growth. In fact, ODC activity was induced in CO embryos exposed to 9 mg/L Azm, which may in part justify the increase in Put levels. An increase in ODC activity along with a massive increase in Put levels, produced by electroshock-induced seizures in transgenic mice, have been previously described as neuroprotective effects rather than the cause of damage [50]. Also, increases in Put levels and ODC activity have been reported in a rat model of acute porphyria [30] and in rats exposed to hexachlorobenzene [51]. The rise in Put content observed in the present study could also occur if the oxidative degradation of Spd and Spm through the enzymes SSAT and acetyl-polyamine oxidase (APAO) was active [52]. Similarly, a decrease in SAMDC activity would explain these results. As the embryos progressed from intermediate developmental stages to the CO stage, increasing concentrations of Azm decreased the Put/ODC ratio. This result suggests that Put levels were controlled not only through synthesis but also via degradation by diamine oxidase (DAO) or due to an inhibition of SAMDC activity. Besides the increase in Put levels, *R. arenarum* embryos exposed to OP experienced a decrease in Spd and Spm levels. Once more, an increase in their oxidative degradation through SSAT-APAO enzymes as well as a decrease in SAMDC activity would account for these results. As Spd and Spm participate in the regulation of ODC activity [41], their decrease in embryos exposed to Azm would explain the effects of increasing concentrations of the insecticide on Spd/ODC and Spm/ODC ratios (Fig. 4). An increase in the oxidative metabolism of polyamines and a resulting oxidative stress situation was previously suggested in *R. arenarum* embryos exposed to Mtn and exogenously applied polyamines [24]. During oxidative catabolism of polyamines, the reactive aldehyde acrolein is generated along with other reactive species such as hydrogen peroxide. It has been reported in cultured cells that the

aldehyde acrolein triggers the expression of multiple phase 2 genes, including glutathione transferase, in response to the addition of exogenous polyamines [42], denoting an impact on the antioxidant defense system. This is particularly relevant when the exposure to contaminants alters not only polyamine metabolism but also redox status, leading to additive effects. Also it has been suggested that the injury produced by polyamines during early development may be attributable to the hydrogen peroxide formed during the interconversion of spermine to spermidine and putrescine [53].

In conclusion, as embryonic development of the toad *R. arenarum* progresses, polyamine metabolism shifts to higher polyamine levels with a more preponderant contribution of Spd and Spm with respect to Put and involves a dramatic change in ODC activity, one of the key regulatory enzymes of the pathway. OP insecticides are capable of altering polyamine metabolism, thereby slowing embryo development in parallel with a reduction in Spd and Spm levels. An increase in the oxidative degradation of polyamines may be involved in the toxic action of OP pesticides and might also be related to other effects such as teratogenesis.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Universidad Nacional del Comahue 04 I 004, from the Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) PICT-2007-00214 and PIP 2010-2012 N° 00655, CONICET.

References

- [1] C. Moinard, L. Cynober, J.-P. de Bandt, Polyamines: metabolism and implications in human diseases, *Clin. Nutr.* 24 (2005) 184–197.
- [2] H.B. Osborne, P. Cormier, O. Lorillon, D. Maniey, R. Bellé, An appraisal of the developmental importance of polyamine changes in early *Xenopus* embryos, *Int. J. Dev. Biol.* 37 (1993) 615–618.
- [3] B. Hetrick, P.K. Khade, K. Lee, J. Stephen, A. Thomas, S. Joseph, Polyamines accelerate codon recognition by transfer RNAs on the ribosome, *Biochemistry* 49 (2010) 7179–7189.
- [4] S.K. Kamboj, G.T. Swansonand, S.G. Cull-Candy, Intracellular spermine confers rectification on rat calcium-permeable AMPA and kainate receptors, *J. Physiol.* 486 (1995) 297–303.
- [5] A.N. Lopatin, E.N. Makhina, C.G. Nichols, Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification, *Nature* 372 (1994) 366–369.
- [6] J.L. Bueb, A. Da Silva, M. Mousli, Y. Landry, Natural polyamines stimulate G-proteins, *Biochem. J.* 282 (1992) 545–550.
- [7] A. Tabib, U. Bachrach, Role of polyamines in mediating malignant transformation and oncogene expression, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31 (1999) 1289–1295.
- [8] I.G. Sava, V. Battaglia, C.A. Rossi, M. Salvi, A. Toninello, Free radical scavenging action of the natural polyamine spermine in rat liver mitochondria, *Free Radic. Biol. Med.* 41 (2006) 1272–1281.
- [9] R.G. Schipper, L.C. Penning, A.A. Verhofstad, Involvement of polyamines in apoptosis. Facts and controversies: effectors or protectors?, *Semin Cancer Biol.* 10 (2000) 55–68.
- [10] C. López-García, A.J. López-Contreras, A. Cremades, M.T. Castells, F. Marín, F. Schreiber, R. Peñafiel, Molecular and morphological changes in placenta and embryo development associated with the inhibition of polyamine synthesis during midpregnancy in mice, *Endocrinology* 149 (10) (2008) 5012–5023.
- [11] H. Pendeville, N. Carpino, J.C. Marine, Y. Takahashi, M. Muller, J.A. Martial, J.L. Cleveland, The ornithine decarboxylase gene is essential for cell survival during early murine development, *Mol. Cell. Biol.* 21 (19) (2001) 6549–6558.
- [12] H.M. Olivier, B.R. Moon, The effects of atrazine on spotted salamander embryos and their symbiotic alga, *Ecotoxicology* 19 (4) (2010) 654–661.
- [13] T. Sisman, Dichlorvos-induced developmental toxicity in zebrafish, *Toxicol. Ind. Health* 26 (9) (2010) 567–573.
- [14] H. Wang, H.H. Huang, J. Ding, Y.H. Wang, Embryotoxicity and teratogenicity of pesticide indoxacarb to sea urchin (*Strongylocentrotus intermedius*), *Water Sci. Technol.* 61 (11) (2010) 2733–2739.
- [15] J.J. Hart, J.M. Di Tomaso, L.V. Kochian, Characterization of paraquat transport in protoplasts from maize (*Zea mays* L.) suspension cells, *Plant Physiol.* 103 (3) (1993) 963–969.
- [16] C. Mornet, C. Mondory, C. Gaillard, E. Martinoia, Transport of paraquat and polyamines across the vacuolar membrane of barley mesophyll cells, *Plant Physiol. Biochem.* 35 (1997) 181–191.
- [17] S. Watanabe, S. Sato, S. Nagase, M. Tomita, T. Saito, Change of polyamine level in various tissues of male rats intoxicated with paraquat, *Toxicol. Lett.* 69 (2) (1993) 163–170.
- [18] A.C. Cochón, A.B. Della Penna, G. Kristoff, M.N. Piol, L.C. San Martín de Viale, N.R. Verrengia Guerrero, Differential effects of paraquat on oxidative stress parameters and polyamine levels in two freshwater invertebrates, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 68 (2) (2007) 286–292.
- [19] O.L. Anguiano, A. Caballero de Castro, A.M. Pechen, A.M. Pechen de D'Angelo, The role of glutathione conjugation in the regulation of early toad embryos' tolerance to pesticides, *Comp. Biochem. Physiol. C* 128 (2001) 35–43.
- [20] R. Bacchetta, P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara, G. Vailati, Axial-skeletal defects caused by Carbaryl in *Xenopus laevis* embryos, *Sci. Total Environ.* 392 (2008) 110–118.
- [21] P. Bonfanti, A. Colombo, F. Orsi, I. Nizzetto, M. Andrioletti, R. Bacchetta, P. Mantecca, U. Fascio, G. Vailati, C. Vismara, Comparative teratogenicity of Chlorpyrifos and Malathion on *Xenopus laevis* development, *Aquat. Toxicol.* 70 (2004) 189–200.
- [22] A. Colombo, F. Orsi, P. Bonfanti, Exposure to the organophosphorus pesticide chlorpyrifos inhibits acetylcholinesterase activity and affects muscular integrity in *Xenopus laevis* larvae, *Chemosphere* 61 (2005) 1665–1671.
- [23] A. Venturino, L. Gauna, R.M. Bergoc, A.M. Pechen de D'Angelo, Effect of exogenously applied polyamines on malathion toxicity in the toad *Bufo arenarum* Hensel, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22 (1992) 135–139.
- [24] A. Venturino, O.L. Anguiano, L. Gauna, C. Cocca, R.M. Bergoc, A.M. Pechen de D'Angelo, Thiols and polyamines in the potentiation of malathion toxicity in larval stages of the toad *Bufo arenarum*, *Comp. Biochem. Physiol. C* 130 (2001) 191–198.
- [25] T. Fonovich de Schroeder, A.M. Pechen de D'Angelo, Dieldrin effects on phospholipid and phosphoinositide metabolism in *Bufo arenarum* oocytes, *Comp. Biochem. Physiol. C* 98 (1991) 287–292.
- [26] E. Del Conte, J.L. Sirlin, Pattern series of the first embryonic stages in *Bufo arenarum*, *Anat. Rec.* 112 (1952) 125–130.
- [27] A. Ferrari, C.I. Lascano, O.L. Anguiano, A.M. Pechen de D'Angelo, A. Venturino, Antioxidant responses to azinphos methyl and carbaryl during the embryonic development of the toad *Rhinella (Bufo) arenarum* Hensel, *Aquat. Toxicol.* 93 (2009) 37–44.
- [28] C.P. Sánchez, N.S. González, I.D. Algranati, Stable ornithine decarboxylase in promastigotes of *Leishmania mexicana Mexicana*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161 (1989) 754–761.
- [29] M. Marcé, D.S. Brown, T. Capell, X. Figueras, A.F. Tiburcio, Rapid high-performance liquid chromatographic method for the quantitation of polyamines as their dansyl derivatives: application to plant and animal tissues, *J. Chromatogr. B* 666 (1995) 329–335.
- [30] A.C. Cochón, N. González, L.C. San Martín de Viale, Effects of the porphyrinogenic compounds hexachlorobenzene and 3,5-dithoxycarbonyl-1,4-dihydrocolli dine on polyamine metabolism, *Toxicology* 176 (2002) 209–219.
- [31] J.A. Bantle, J.N. Dumont, R.A. Finch, G. Linder, Atlas of Abnormalities: A Guide for the Performance of FETAX, Oklahoma State Publications, Stillwater, OK, 1991.
- [32] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [33] S. Kusunoki, Y. Yasumasu, Inhibitory effect of alpha-hydrazinoornithine on egg cleavage in sea urchin eggs, *Dev. Biol.* 67 (1978) 336–345.
- [34] R.K. Srivastava, Changes in polyamines during embryonic development of atlantic salmon *Salmo salar*, *Comp. Biochem. Physiol. B* 102 (1992) 97–101.
- [35] D.H. Russell, Putrescine and spermidine biosynthesis in the development of normal and anucleolate mutants of *Xenopus laevis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68 (3) (1971) 523–547.
- [36] Y.C. Zhao, Y.J. Chi, Y.S. Yu, J.L. Liu, R.W. Su, X.H. Ma, C.H. Shan, Z.M. Yang, Polyamines are essential in embryo implantation: expression and function of polyamine-related genes in mouse uterus during peri-implantation period, *Endocrinology* 149 (5) (2008) 2325–2332.
- [37] S. Bettuzzi, P. Davalli, S. Astancolle, C. Pinna, R. Roncaglia, F. Boraldi, R. Tiozzo, M. Sharrard, A. Corti, Coordinate changes of polyamine metabolism regulatory proteins during the cell cycle of normal human dermal fibroblasts, *FEBS Lett.* 446 (1) (1999) 18–22.
- [38] K. Zahedi, J.J. Bissler, Z. Wang, A. Josyula, L. Lu, P. Diegelman, N. Kisiel, C.W. Porter, M. Soleimani, Spermidine/spermine N¹-acetyltransferase overexpression in kidney epithelial cells disrupts polyamine homeostasis, leads to DNA damage and causes G2 arrest, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292 (3) (2007) 1204–1215.
- [39] B. Osborne, C. Duval, L. Ghoda, F. Omilli, T. Bassez, P. Coffino, Expression and post-transcriptional regulation of ornithine decarboxylase during early *Xenopus* development, *Eur. J. Biochem.* 202 (1991) 575–581.
- [40] A.E. Pegg, Mammalian polyamine metabolism and function, *IUBMB Life* 61 (9) (2009) 880–894.
- [41] A.E. Pegg, Regulation of ornithine decarboxylase, *J. Biol. Chem.* 281 (21) (2006) 14529–14532.
- [42] M.-K. Kwak, T.W. Kensler, R.A. Casero Jr., Induction of phase 2 enzymes by serum oxidized polyamines through activation of Nrf2: effect of the polyamine metabolite acrolein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305 (2003) 662–670.
- [43] K. Igarashi, K. Kashiwagi, Modulation of cellular function by polyamines, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42 (2010) 39–51.
- [44] J. Shinga, K. Kashiwagi, K. Tashiro, K. Igarashi, K. Shiokawa, Maternal and zygotic expression of mRNA for S-adenosylmethionine decarboxylase and its relevance to the unique polyamine composition in *Xenopus* oocytes and embryo, *Biochim. Biophys. Acta* 1308 (1) (1996) 31–40.

- [45] T. Ogasawara, K. Ito, K. Igarashi, Effect of polyamines on globin synthesis in a rabbit reticulocyte polyamine-free protein synthetic system, *J. Biochem.* 105 (2) (1989) 164–167.
- [46] P. Coffino, Polyamines in spermiogenesis: not now, darling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (9) (2000) 4421–4423.
- [47] T. Thomas, T.J. Thomas, Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications, *Cell. Mol. Life Sci.* 58 (2) (2001) 244–258.
- [48] F. Scorcioni, A. Corti, P. Davalli, S. Astancolle, S. Bettuzzi, Manipulation of the expression of regulatory genes of polyamine metabolism results in specific alterations of the cell-cycle progression, *Biochem. J.* 354 (Pt. 1) (2001) 217–223.
- [49] M.R. Bell, J.A. Belarde, H.F. Johnson, C.D. Aizenman, A neuroprotective role for polyamines in a *Xenopus* tadpole model of epilepsy, *Nat. Neurosci.* 14 (4) (2011) 505–512.
- [50] T. Halonen, J. Sivenius, R. Miettinen, M. Halmekyto, R. Kauppinen, R. Sinervirta, L. Alakuijala, L. Alhonen, E. MacDonald, J. Janne, P.J. Reikkinen Sr., Elevated seizure threshold and impaired spatial learning in transgenic mice with putrescine overproduction in the brain, *Eur. J. Neurosci.* 5 (1993) 1233–1239.
- [51] A.S. Randi, S. Hernández, L. Álvarez, M. Sánchez, M. Schwarcz, D.L. Kleiman de Pisarev, Hexachlorobenzene-induced early changes in ornithine decarboxylase and protein tyrosine kinase activities, polyamines and *c-Myc*, *c-Fos* and *c-Jun* proto-oncogenes in rat liver, *Toxicol. Sci.* 76 (2) (2003) 291–298.
- [52] C. Rodríguez-Caso, R. Montañez, M. Cascante, F. Sánchez-Jiménez, M.A. Medina, Mathematical modeling of polyamine metabolism in mammals, *J. Biol. Chem.* 281 (31) (2006) 21799–21812.
- [53] P. Coffino, A. Poznanski, Killer polyamines?, *J. Cell. Biochem.* 45 (1) (1991) 54–58.