



**Universidad Nacional del Comahue**

**Facultad de Ciencias del Ambiente y la Salud**

**EFFECTO DE LOS PLAGUICIDAS  
ORGANOFOSFORADOS CLORPIRIFOS Y  
METILAZINFOS EN LA INDUCCIÓN DE ESTRÉS  
OXIDATIVO EN TROFOBLASTO**

Diego Sebastian Gomez

TESIS DE GRADO PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN SANEAMIENTO Y  
PROTECCIÓN AMBIENTAL

Neuquén, 2015

Tesis de grado

**EFFECTO DE LOS PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS  
CLORPIRIFOS Y METILAZINFOS EN LA INDUCCIÓN DE  
ESTRÉS OXIDATIVO EN TROFOBLASTOS**

Alumno: Diego Sebastian Gomez

Legajo: 115.625

Director: Dra. Natalia Guiñazú

Co-Director: M. SC. Jimena Soleño

Plan de Tesis aprobado el 18 de Diciembre de 2014

Tesis finalizada el 24 de Febrero de 2015

## Agradecimientos

A mi Directora Natalia Guiñazú y Co-Directora Jimena Soleño, quienes con su dedicación, paciencia y esfuerzo, me ayudaron y transmitieron sus conocimientos durante la elaboración de esta tesis.

A mis compañeros y compañeras Marlon, Noelia, Victoria, Laura, Valeria y Maru por su ayuda, incentivo y guía en momentos de incertidumbre.

A mi familia, en especial a mis padres a quienes les agradezco su apoyo, compañía y enseñanzas a lo largo de todos estos años.

A Laura, Julián, Mariela, Silvina y Marión por su amistad incondicional, apoyo y preocupación en todo este proceso.

A Guillermo Sabino quien me ayudo en el manejo y análisis de datos estadísticos.

Por último, agradezco a la Facultad de Ciencias del Ambiente y la Salud y a la Universidad Nacional del Comahue, por haber sido mi casa de estudio y haberme brindado las herramientas para desempeñarme en el campo profesional.

## INDICE DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN .....</b>	<b>5</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>6</b>
1.1 PLAGUICIDAS .....	6
1.1.1. <i>Definición y Clasificación</i> .....	6
1.1.2. <i>Dinámica de los plaguicidas en el ambiente</i> .....	8
1.1.3. <i>Exposición a plaguicidas</i> .....	10
1.1.3.1. <i>Rutas y dases de exposición</i> .....	10
1.1.3.2. <i>Vías de exposición</i> .....	12
1.1.4. <i>Plaguicidas organofosforados</i> .....	13
1.1.4.1. <i>Estructura y propiedades</i> .....	14
1.1.4.2. <i>Metabolismo de Organofosforados</i> .....	15
1.1.4.3. <i>Principales blancos de acción</i> .....	17
1.1.4.4. <i>Efectos tóxicos de OFs en la salud humana</i> .....	19
1.2. PLACENTA HUMANA .....	20
1.3. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (EROS) .....	23
1.3.1. <i>Definición y generación de EROs</i> .....	23
1.3.2. <i>EROs en funciones celulares y señalización</i> .....	25
1.3.3. <i>Defensa antioxidante</i> .....	26
1.3.3. <i>Toxicidad asociada a EROs – Estrés oxidativo</i> .....	26
<b>2. HIPÓTESIS .....</b>	<b>29</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
3.1. OBJETIVO GENERAL .....	29
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>4. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES .....</b>	<b>30</b>
4.1. PLAGUICIDAS EN LA REGIÓN DEL ALTO VALLE DE RÍO NEGRO Y NEUQUÉN .....	30
4.2. INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS Y SU RELACIÓN CON LA SALUD PÚBLICA Y AMBIENTAL .....	30
4.3. EXPOSICIÓN RESIDENCIAL A INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS .....	31
4.4. LA PLACENTA COMO HERRAMIENTA DE BIOMONITOREO .....	31
4.4.1. PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS Y ESTRÉS OXIDATIVO .....	32
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
5.1. REACTIVOS .....	34
5.2. CULTIVO CELULAR .....	34
5.3. DETECCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO .....	34
5.3.1. <i>Ensayo de Reducción de NBT</i> .....	34
5.3.2. <i>Ensayo de oxidación de DCFH-DA</i> .....	36
5.3.3. <i>Ensayo de oxidación del luminol</i> .....	37
5.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	38
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
6.1. ESTUDIO DE INTERACCIÓN DE FACTORES .....	39
6.2. INDUCCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE EROS .....	40
6.2.1. <i>Reducción colorimétrica de NBT</i> .....	40
6.2.2. <i>Ensayo fluorométrico de oxidación de DCFH-DA</i> .....	41
6.2.3. <i>Ensayo quimioluminiscente de oxidación de Luminol</i> .....	43

<b>7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN .....</b>	<b>44</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>51</b>
<b>9. ANEXO .....</b>	<b>60</b>
9.1. PREPARACIÓN BUFFER FOSFATO SALINO (PBS) .....	60

## INDICE DE TABLAS

TABLA 1: CLASIFICACIÓN DE PLAGUICIDAS SEGÚN FAMILIA QUÍMICA.....	7
TABLA 2: CLASIFICACIÓN DE PLAGUICIDAS SEGÚN SU TOXICIDAD, EXPRESADA EN DL50. ....	7
TABLA 3: CLASIFICACIÓN DE PLAGUICIDAS SEGÚN SU VIDA MEDIA EN EL AMBIENTE.....	8
TABLA 4: ANOVA FACTORIAL PARA LAS INTERACCIONES DE LOS FACTORES TIEMPO DE EXPOSICIÓN, CONCENTRACIÓN Y OF .....	39

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: ESQUEMA DE LOS MECANISMOS QUE INFLUYEN EN LA EVOLUCIÓN DE LOS PLAGUICIDAS EN EL SUELO. ....	9
FIGURA 2: CLASES DE EXPOSICIÓN.....	12
FIGURA 3: ESTRUCTURA GENERAL DE LOS COMPUESTOS OFS.....	14
FIGURA 4: ESTRUCTURA DE MA Y CP .. ...	16
FIGURA 5: PRINCIPALES REACCIONES EN EL METABOLISMO DE OFS. .. ...	17
FIGURA 6: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA INTERACCIÓN BIOQUÍMICA ENTRE OFS Y ACHE. ....	18
FIGURA 7: DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE LA PLACENTA HUMANA DEL PRIMER TRIMESTRE... ..	22
FIGURA 8 VÍAS DE GENERACIÓN DE EROS. ....	24
FIGURA 9: ESQUEMA DE FORMACIÓN DE EROS... ..	25
FIGURA 10: ESQUEMATIZACIÓN DE LA RELACIÓN ENTRE EL DAÑO TISULAR Y ESTRÉS OXIDATIVO EN LA CONTRIBUCIÓN AL DESARROLLO DE UNA ENFERMEDAD.. ..	27
FIGURA 11: REACCIÓN DE REDUCCIÓN DEL NBT A FORMAZÁN .. ...	35
FIGURA 12: MECANISMO DE DE-ESTERIFICACIÓN DE DCFHDA A DCFH, Y LA CONSIGUIENTE OXIDACIÓN A DCF. ....	36
FIGURA 13: REDUCCIÓN DEL NBT (%) -CLORPIRIFOS. ....	40
FIGURA 14: REDUCCIÓN DEL NBT (%) - METILAZINFOS.....	41
FIGURA 15: INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA (%) - CLORPIRIFOS.....	42
FIGURA 16: INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA (%) - METILAZINFOS.....	43

## Resumen

En la región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén la fruticultura es una actividad económica de gran relevancia, por lo que la utilización de plaguicidas es una práctica útil destinada a obtener un mayor beneficio productivo. No obstante han de considerarse los impactos que este tipo de sustancias tienen en la salud de la población rural y en el ambiente en general. Ha sido comprobado que los plaguicidas organofosforados (OFs) son capaces de alcanzar a la placenta y al feto. Además, se conoce que el buen funcionamiento de la placenta es un pre-requisito para la salud fetal. Siendo los trofoblastos el tipo celular especializado de este órgano, sustancias tóxicas que afecten su funcionamiento también podrían repercutir en la fisiología placentaria y en el desarrollo fetal.

Considerando que el estrés oxidativo ha sido propuesto como un mecanismo de toxicidad inducido por OFs, se estudió si la exposición *in vitro* de trofoblastos JEG-3 a OFs favorece la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs). Se evaluó la producción de EROs en células expuestas a metilazinfos (MA) o clorpirifos (CP) a distintas concentraciones (0,01; 0,1; 1; 10; 100  $\mu\text{M}$ ) y tiempos de incubación (1, 4 y 24 h), mediante las técnicas de reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT), oxidación de 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) y oxidación de luminol.

Los resultados indicaron que la exposición a los OFs MA y CP favoreció la producción EROs a 0,01; 0,1; 1 10 y 100  $\mu\text{M}$  a 1 h de exposición ( $P < 0,05$ ). Luego de 4 y 24 h de exposición, se observó la misma tendencia con ambos plaguicidas, salvo que a 24 h con MA (100  $\mu\text{M}$ ) no se observaron cambios significativos respecto a la condición basal. Estos hallazgos indicarían que la exposición a concentraciones (0,01 y 0,1  $\mu\text{M}$ ) representativas de los niveles en sangre de embarazada y de cordón umbilical, incrementan la respuesta oxidativa en trofoblastos.

**Palabras claves:** especies reactivas de oxígeno, trofoblasto, organofosforados, NBT, DCFH-DA, luminol.

## 1. Introducción

### 1.1 Plaguicidas

#### 1.1.1. Definición y Clasificación

A lo largo de la historia, el hombre ha ido modificando la naturaleza para satisfacer sus necesidades. Un ejemplo de este fenómeno es el uso intensivo de los plaguicidas para reducir las pérdidas producidas por las plagas sobre los cultivos (Peña *et al.*, 2001). Se entiende por plaguicida a “toda sustancia o mezcla de ellas, destinada a prevenir, destruir o controlar plagas, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o animales; las especies no deseadas de plantas o animales que ocasionan un daño duradero u otras que interfieren con la producción, procesamiento, almacenamiento, transporte y comercialización de alimentos; los artículos agrícolas de consumo, la madera y sus productos, el forraje para animales o los productos que pueden administrárseles para el control de insectos, arácnidos u otras plagas corporales” (Ramírez y Lacasaña, 2001).

Los plaguicidas sintéticos surgieron como resultado de investigaciones enfocadas al desarrollo de armas químicas en las décadas de 1930 y 1940. El diclorodifeniltricloroetano (DDT), uno de los primeros compuestos producidos, fue sintetizado por Zeidler en 1874 y sus propiedades insecticidas fueron descritas por Paul Müller hacia 1939. El DDT se utilizó por primera vez durante la Segunda Guerra Mundial como protección contra enfermedades transmitidas por vectores. Sin embargo, la pujante industrialización ligada a los intereses económicos como también la necesidad de controlar químicamente las plagas, favoreció el consumo agrícola a escala mundial (Ramírez y Lacasaña, 2001). A partir de la publicación del libro “Primavera silenciosa” de Rachel Carson (1962), se divulgaron los perjuicios de su uso y se pusieron en tela de juicio sus beneficios resultando en la prohibición de su uso en 1972.

Los plaguicidas constituyen una amplia variedad de compuestos, es por ello que suelen clasificarse de acuerdo a distintas particularidades como: toxicidad aguda, vida media, uso o estructura química. De acuerdo a ésta última, se pueden clasificar en distintas familias: organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, entre otros (Tabla 1).

**Tabla 1: Clasificación de plaguicidas según familia química.**

Familia química	Ejemplos
Organoclorados	DDT, aldrín, endosulfán, endrín
Organofosforados	Bromofos, diclorvos, malatión, clorpirifos, metilazinfos
Carbamatos	Carbaril, metomil, propoxur
Tiocarbamatos	Ditiocarbamato, mancozeb, maneb
Piretroides	Cipermetrina, fenvalerato, permetrina
Derivados biperidilos	Cloromequat, diquat, paraquat
Derivados del ácido fenoxiacético	Dicloroprop, piclram, silvex
Derivados cloronitrofenólicos	DNOC, dinoterb, dinocap
Derivados de triazinas	Atrazina, ametrin, desmetrina, simazine
Compuestos orgánicos del estaño	Cihexatina, dowco, plictrán
Compuestos inorgánicos	Arsénico pentóxido, obpa, fosfito de magnesio, cloruro de mercurio, arsenato de plomo, bromuro de metilo, antimonio, mercurio, selenio, talio y fósforo blanco
Compuestos de origen botánico	Rotenona, nicotina, aceite de canola

Fuente: Ramírez y Lacasaña, 2001

Otra forma de clasificarlos es según la plaga que controlan: los insecticidas (insectos), herbicidas (malezas), fungicidas (hongos), acaricidas (ácaros), rodenticida (roedores), nematocidas (nematodos), molusquicidas (caracoles, babosas), pediculicidas (piojos), etc. (Anguiano *et al.*, 2011). Otras clasificaciones son de acuerdo a su toxicidad aguda (Tabla 2), importante respecto a sus posibles efectos en la salud, y de acuerdo a su vida media en el ambiente (Tabla 3).

**Tabla 2: Clasificación de plaguicidas según su toxicidad, expresada en DL50.**

Clase	Toxicidad	DL <sub>50</sub> <sup>a</sup>	Ejemplos
Clase IA	Extremadamente peligrosos	<5 oral, <50 dermal	Paratión, dieldrín
Clase IB	Altamente peligrosos	5-50 oral 200-2000 dermal	Eldrín, diclorvos, metilazinfos
Clase II	Moderadamente peligrosos	5-50 oral 200-2000 dermal	DDT, clordano, clorpirifos
Clase III	Ligeramente peligrosos	>2000 oral, >2000 dermal	Malatión

Fuente: Ramírez y Lacasaña, 2001

<sup>a</sup> DL<sub>50</sub> (Dosis Letal 50): es la estimación de la cantidad de una sustancia tóxica por peso corporal, necesaria para observar un efecto mortal en el 50% de los animales de experimentación (ej. ratas de laboratorio) en los que se ensaya el efecto letal de la sustancia, administrándola por vía oral o dérmica, durante un periodo de tiempo determinado y seguimiento en un periodo de postexposición.

**Tabla 3: Clasificación de plaguicidas según su vida media en el ambiente.**

<b>Persistencia<sup>a</sup></b>	<b>Vida media<sup>b</sup></b>	<b>Ejemplos</b>
<b>No persistente</b>	De días hasta 12 semanas	Malatión, diazinón, carbarilo, diametrín, metilazinfos, clorpirifos
<b>Moderadamente Persistente</b>	De 1 a 18 meses	Paratión, lannate,
<b>Persistente</b>	De varios meses a 20 años	DDT, aldrín, dieldrín
<b>Permanentes</b>	Indefinidamente	Productos hechos a partir de mercurio, plomo, arsenic

Fuente: Ramírez y Lacasaña, 2001.

<sup>a</sup> Capacidad de una sustancia o un compuesto, de permanecer en un sustrato del ambiente en particular, después de que ha cumplido el objetivo por el cual se aplicó.

<sup>b</sup> Período de tiempo necesario para que se degrade la mitad del compuesto o mezcla aplicada.

### 1.1.2. Dinámica de los plaguicidas en el ambiente

Idealmente los plaguicidas deberían alcanzar el organismo blanco, cumplir con el efecto deseado y, posteriormente, descomponerse rápidamente en sustancias inofensivas. Sin embargo la dinámica del plaguicida en el ambiente difiere ampliamente de esta situación ideal, de tal forma que estas sustancias afectan no solo a los organismos blanco sino que pueden afectar a aplicadores, consumidores, organismos no blanco y contaminar suelos y fuentes de agua. (Querejeta *et al.*, 2012).

La movilidad, degradación y por lo tanto persistencia del plaguicida en el ambiente está determinada por las características propias del compuesto, como así también condiciones ambientales tales como vientos, lluvias, radiación solar, etc. (Morell y Candela, 1998), por lo que el destino de estas sustancias es muy variable y depende de diversos mecanismos (Fig. 1).

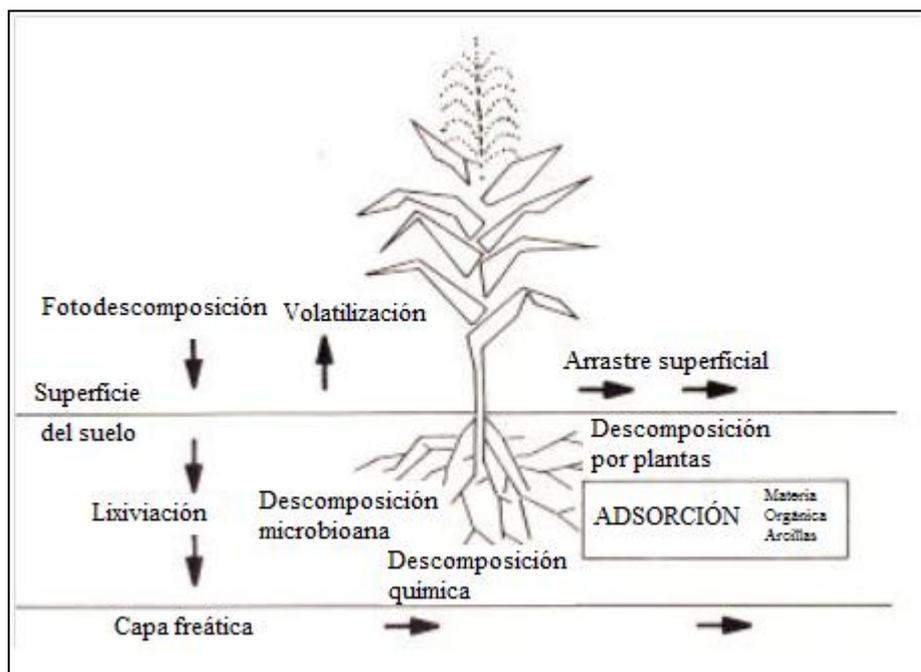


Figura 1: Esquema de los mecanismos que influyen en la evolución de los plaguicidas en el suelo: una vez aplicados, los plaguicidas pueden volatilizarse, ser arrastrados superficialmente o en profundidad por el agua (lixiviación) o bien sufrir fotodescomposición. En el suelo pueden ser adsorbidos, sufrir descomposición bioquímica o llegar a capas freáticas y ser transportados. Fuente: Sánchez y Sánchez Camazano, 1985.

La disponibilidad y movilidad del plaguicida depende del modo en que ha sido aplicado (fumigado, pulverizado, etc), de su solubilidad, de su persistencia en el sistema agua-suelo y de su asimilación por las plantas y otros organismos. Si el agua (irrigación o de origen pluvial) se mueve en la superficie, produce arrastre superficial; y si se mueve verticalmente transporta los plaguicidas hacia zonas más o menos profundas del suelo (lixiviación). Si el compuesto es suficientemente persistente, es probable que llegue a fuentes de aguas superficiales o subterráneas (Anguiano *et al.*, 2011).

Además, los plaguicidas pueden sufrir procesos de descomposición: por acción de la luz ultravioleta (fotodescomposición), hidrólisis, oxidación, reducción, hidroxilación, dealquilación, rotura de anillos y transformación microbiana (degradación bioquímica). La persistencia de estas sustancias está asociada a la tendencia de los mismos a conservar su integridad molecular, sus características químicas, físicas y funcionales, en el medio a través del cual son transportadas y distribuidas (Navarro García y Barra Navarro, 1995; Anguiano *et al.*, 2011).

Asimismo, la volatilización de plaguicidas del suelo y subsiguiente dispersión en la atmósfera es una vía frecuente de movilidad y dispersión. Este proceso dependerá de la presión de vapor de la sustancia, del estado de agregación en que se encuentre y de la temperatura ambiente (Sánchez y Sánchez Camazano, 1985; Navarro García y Barra Navarro, 1995). Otro de los procesos es el de adsorción, el cual se debe a la atracción existente entre una superficie sólida y un vapor o disolución, y resulta de la interacción de fuerzas que emanan de la superficie del adsorbente y de las moléculas o iones de la sustancia adsorbida. La desorción, consiste en el fenómeno contrario. En este proceso es muy importante la superficie específica y las propiedades físico-químicas de las partículas del suelo. Respecto a esto, la fracción coloidal (arcilla y humus) ejerce un papel muy importante, pudiendo afectar la actividad, persistencia y/o degradación de los plaguicidas. Estos, al ser adsorbidos y quedar retenidos por los coloides, incrementan su persistencia, con el consiguiente riesgo de contaminación del suelo. (Sánchez y Sánchez Camazano, 1985; Navarro García y Barra Navarro, 1995).

### **1.1.3. Exposición a plaguicidas**

#### **1.1.3.1 Rutas y clases de exposición**

De acuerdo a Peña *et al.* (2001) la ruta de exposición es el camino que sigue un agente químico, en este caso los plaguicidas, en el ambiente desde el lugar donde se emite hasta que llega a establecer contacto con la población o individuo expuesto. El análisis de las mismas describe la relación que existe entre las fuentes (localizaciones y tipo de derrames ambientales) y los receptores (localización de las poblaciones, patrones de actividad, etc.).

Las rutas de exposición consisten generalmente de cuatro elementos:

- fuentes y mecanismos de emisión de tóxicos
- medio de retención y transporte (o medios en el caso de que haya transferencias de un medio a otro)
- punto de contacto potencial entre el medio contaminado y los individuos
- vía de ingreso al organismo

La exposición directa tiene lugar cuando el individuo está en contacto directo y reconoce la fuente de contaminación o bien la misma es identificable por terceros. Afecta al personal que interviene en los procesos de fabricación, mezcla, carga y aplicación de plaguicidas, en las cosechas y manipulación de cultivos (exposición laboral); a los individuos que ingieren plaguicidas en forma accidental o bien a los que hacen uso intencional de los mismos con fines homicidas o suicidas. Por otra parte, en la exposición indirecta el individuo desconoce la presencia del contaminante. Se produce a través de residuos de alimentos, agua, suelos y aire afectando, en general, afecta a un segmento mayor de la población (Anguiano *et al.*, 2011). Este tipo de exposición adquiere relevancia por sus efectos en la salud de las poblaciones rurales residentes en zonas de intensa aplicación de plaguicidas. La exposición de dichas poblaciones tiene lugar por la presencia de residuos de plaguicidas en el aire, suelo y agua, mientras que la exposición de la población en general se debe fundamentalmente a la presencia de residuos en alimentos (Magnarelli *et al.*, 2014) (Fig. 2).

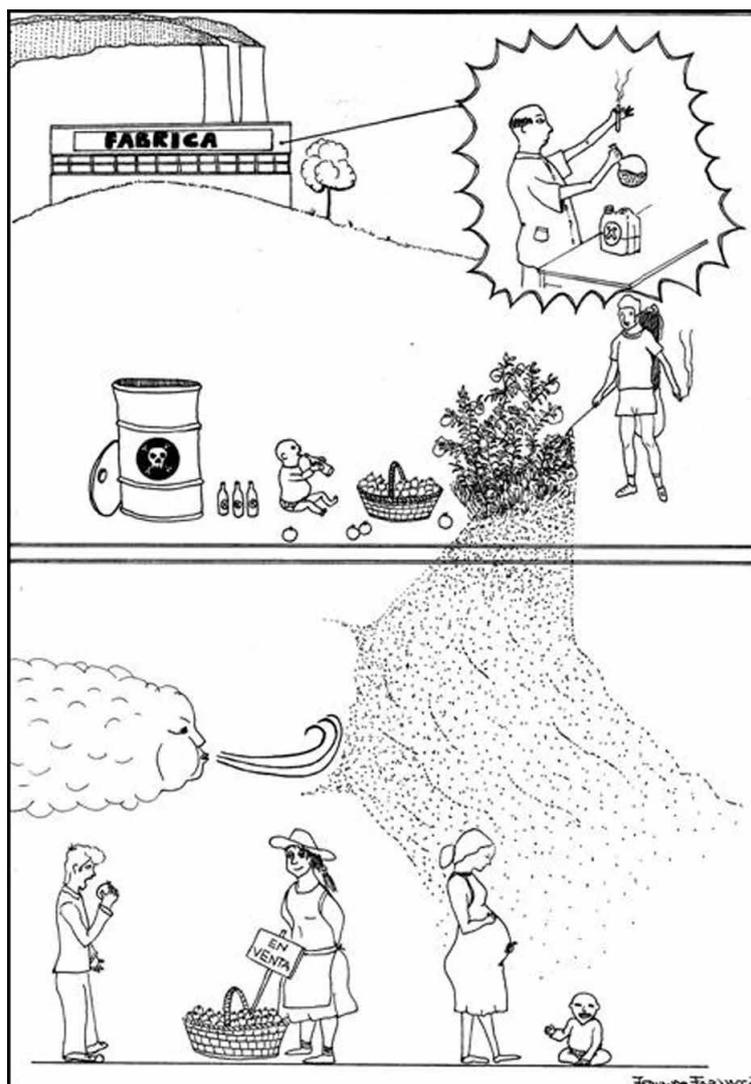


Figura 2: Clases de exposición: directa (arriba) e indirecta (abajo). Extraído de Anguiano *et al.*, (2011).

Además, dependiendo de la duración de la exposición, se clasifican en exposiciones crónicas (más del 10% del período de vida), subcrónicas (menores al 10% del período de vida) y agudas (exposiciones de un día y que pueden suceder en uno o más eventos) (Peña *et al.*, 2001).

### 1.1.3.2. Vías de exposición

La vía de exposición consiste en el mecanismo por el cual el plaguicida ingresa al organismo (Peña *et al.*, 2001), siendo las principales:

- Oral: Es el ingreso del químico por el tracto gastrointestinal. El mismo puede ocurrir debido a la falta de medidas preventivas o de seguridad en el almacenamiento y transporte, por la reutilización de sus envases y por el consumo de alimentos contaminados. Un caso particular es la ingesta

de leche materna con residuos de plaguicidas, siendo los organoclorados los que se hallan más frecuentemente en este fluido debido a sus propiedades físico-químicas.

- Respiratoria: Es el ingreso del plaguicida por el sistema respiratorio. La intoxicación por esta vía es frecuente en el personal que manipula directamente plaguicidas o que reside en inmediaciones de donde se pulveriza el plaguicida. Para que el mismo se absorba debe encontrarse en forma de vapor, gas o como partícula fina.
- Dérmica: se produce en toda la superficie corporal a través de la piel y se ve favorecida por la característica lipofílica de los plaguicidas. El flujo sanguíneo elevado, las escoriaciones y la contaminación de la ropa de trabajo facilitan el ingreso del tóxico y, aunque la penetración es lenta, esta vía adquiere particular importancia en la exposición laboral dada la magnitud del área expuesta.
- Ocular: por esta vía ingresan plaguicidas que se encuentran en forma de aerosoles, polvos en suspensión o salpicaduras. Adquiere relevancia cuando no se utilizan antiparras o gafas durante la manipulación y aplicación de plaguicidas.
- Intrauterina: constituye el primer contacto con estos contaminantes tanto en el período embrionario como en el fetal. La mayoría de los plaguicidas poseen propiedades que favorecen su llegada al ambiente intrauterino ya que atraviesan la placenta. De hecho, se han determinado residuos de plaguicidas (organoclorados y organofosforados) en placenta, sangre de cordón y meconio (Magnarelli *et al.*, 2014).

Una vez que el plaguicida ingresó al organismo, la manifestación de los síntomas dependen principalmente del plaguicida al que se haya estado expuesto, la vía de exposición, la concentración y la dosis (Anguiano *et al.*, 2011).

#### **1.1.4. Plaguicidas organofosforados.**

Los plaguicidas organofosforados (OF) han sido el grupo de insecticidas más ampliamente utilizados por muchas décadas (Cecchi *et al.*, 2012) para el

control de plagas tanto en la agricultura como en los hogares (Costa, 2006; Li, 2007). Su desarrollo se atribuye al químico alemán Gerhard Schrader quien desarrolló y sintetizó los primeros OFs comercializados (Costa, 2006).

Estos compuestos comprenden un grupo muy diverso de estructuras químicas: ésteres, amidas o tioles derivados del ácido fosfórico (Ramírez y Lacasaña, 2001). La mayoría son utilizados como plaguicidas, mientras que otros son utilizados como retardadores del fuego, agentes terapéuticos, plastificantes, lubricantes, aditivos de combustibles y hasta como agentes químicos de guerra (Anguiano *et al.*, 2011).

#### 1.1.4.1. Estructura y propiedades

La estructura química de un organofosforado (Fig. 3) comprende un átomo de fósforo central y el característico enlace fosfórico (P=O) o tiosfosfórico (P=S).

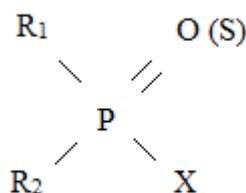


Figura 3: Estructura general de los compuestos OFs.

El símbolo X representa el grupo saliente que es desplazado (por sustitución nucleofílica) cuando el OFs fosforila la enzima acetilcolinesterasa (AChE) –principal blanco de acción de estos compuestos (Costa, 2006; Elersek y Filipic, 2011, Anguiano *et al.*, 2011). En gases de guerra muy tóxicos, el grupo saliente consiste un fluoruro (F<sup>-</sup>), el cual se hidroliza fácilmente produciendo la inhibición de AChE. Mientras que en OFs menos tóxicos, el grupo saliente consiste generalmente en grupos alquilo o arilo (Elersek y Filipic, 2011). Por otro lado, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son comúnmente grupos alcoxi (H<sub>3</sub>CO o H<sub>5</sub>C<sub>2</sub>O), aunque otros sustitutos químicos también son posibles. Basados en las diferencias químicas que presentan los OFs pueden ser divididos en seis subclases, fácilmente identificables por sus nombres químicos, e incluyen a los fosfatos, fosforotioatos, fosforoditioatos, fosforamidatos, fosfonatos y fosfortiolatos (Anguiano *et al.*, 2011).

En general, los OFs son sustancias poco solubles en agua y muy solubles en disolventes orgánicos, por lo tanto son liposolubles. Son razonablemente estables a pH neutro, pero casi todos son hidrolizados por álcalis y muchos son inestables a  $\text{pH} < 2$ . Estos se descomponen con gran facilidad y se degradan por oxidación e hidrólisis, dando origen a productos solubles en agua, relativamente menos persistentes que otros plaguicidas (como los organoclorados) (Ramírez y Lacasaña, 2001; Laveiro-Carrillo *et al.*, 2004). Asimismo suelen ser poco acumulables en el organismo humano. Pertenecen a este grupo el paratión, el malatión, el diazinón, el clorpirifos, el diclorvos y el metilazinfos, entre otros (Ramírez y Lacasaña, 2001).

#### **1.1.4.2. Metabolismo de Organofosforados**

El metabolismo de OFs tiene lugar principalmente en el hígado y en menor medida en intestino, riñones, etc. Este proceso comprende dos fases: las enzimas metabólicas de Fase I, que principalmente desenmascaran grupos funcionales, y las enzimas de Fase II que añaden distintos tipos de grupos hidrofílicos (como ácido glucurónico, sulfato, glicina, ácido glutámico, entre otros); aumentando la hidrosolubilidad del compuesto y favoreciendo la excreción de los metabolitos del organismo.

Durante el metabolismo de OFs ocurre una reacción de bioactivación, donde se obtiene al compuesto oxón, esta estructura posee un átomo central de fósforo unido por un doble enlace a un átomo de oxígeno ( $\text{P}=\text{O}$ ). Este compuesto se une al sitio activo de la enzima AChE, y la inhibe. Como la mayoría de los OFs poseen un átomo de azufre unido por un doble enlace a su átomo de fósforo central ( $\text{P}=\text{S}$ ), los mismos deben ser bioactivados por medio de desulfuración oxidativa. La cual es mediada por enzimas citocromo P450 (CYP) (Mutch y Williams, 2006; Elersek y Filipic, 2011), tal es el caso de los OFs metilazinfos (MA) y clorpirifos (CP), entre otros (Buratti *et al.*, 2003) (Fig. 4).

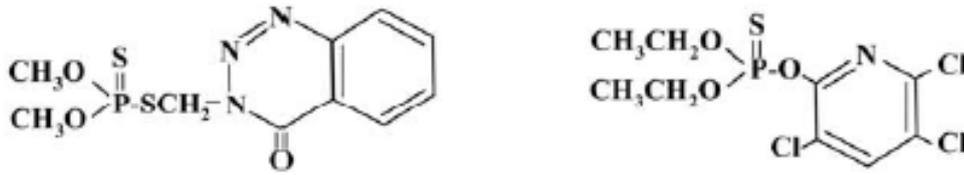


Figura 4: estructura de MA (izquierda) – S-(3,4-dihidro-4-oxobenzo[d]-[1,2,3]-triazin-3-metil) O,O-dimetil fosforoditioato - y CP (derecha) – O,O-dietil 0-3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotioato-. Extraído de Buratti *et al.* (2003).

En la Fig. 5 se esquematizan las principales reacciones en el metabolismo de OFs. Estas involucran principalmente reacciones de oxidación, hidrólisis mediada por esterasas, dealquilaciones de las cadenas laterales o escisión del grupo saliente.

El OFs parental es degradado por el sistema CYP, que mediante una reacción de monooxidación produce un intermediario inestable que reacciona rápidamente, catalizado nuevamente por la CYP, para dar un producto hidroxilado, y un alcohol del grupo saliente X. Por otra parte también ocurre sobre este metabolito inestable una reacción catalizada por CYP que se denomina desulfuración oxidativa, que es una reacción de bioactivación donde se obtiene el metabolito oxón y se escinde la átomo de azufre del OFs. El oxón puede entonces ser metabolizado por las enzimas paraoxonasa (PON) o carboxilesterasa (CaE) (Mutch y Williams, 2006; Costa, 2006; Elersek y Filipic, 2011).

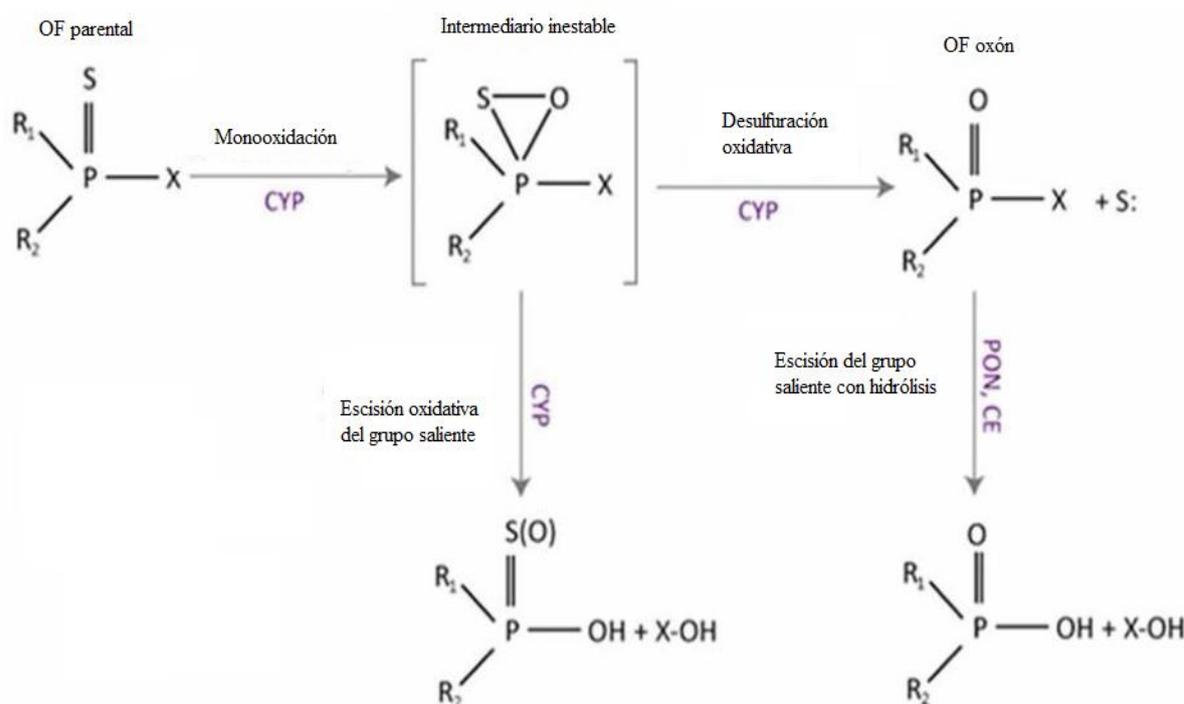


Figura 5: Principales reacciones en el metabolismo de OFs. El OFs parental es monooxidado por el sistema CYP, produciendo un intermediario inestable que reacciona rápidamente dando un producto hidroxilado, y un alcohol del grupo saliente X. Sobre el metabolito inestable ocurre una reacción de desulfuración oxidativa, que da lugar al metabolito oxón y escinde al átomo de azufre. El oxón puede entonces ser metabolizado por las enzimas paraoxonasa (PON) o carboxilesterasa (CaE). Adaptado de Elersek y Filipic (2011).

### 1.1.4.3. Principales blancos de acción

El blanco principal de los OFs es la enzima AChE, perteneciente a la familia de las B-esterasas, cuyo rol fisiológico es el de hidrolizar acetilcolina (ACh), un importante neurotransmisor del sistema nervioso central y periférico, uniones neuromusculares y sistema hematopoyético de vertebrados. Las B-esterasas se caracterizan por poseer en su sitio activo el grupo hidroxilo (-OH) de una serina. Los OFs en su forma oxón fosforilan este grupo hidroxilo, inhibiendo así la actividad de la enzima (Costa, 2006; Li, 2007; Anguiano *et al.*, 2011; Elersek y Filipic, 2011) (Fig. 6), ya que el enlace entre el átomo de fósforo y el sitio activo de la enzima es mucho más estable que el enlace con el grupo carbonilo del acetato de la ACh. Mientras que la reactivación de la enzima AChE, mediada por la ruptura de la unión enzima-carbonilo, se lleva a cabo en microsegundos, la ruptura de la unión del fósforo-enzima puede tomar desde unas pocas horas hasta varios días (Costa, 2006). Así, a pesar de que la enzima es rápidamente hidrolizada cuando reacciona con su sustrato ACh, la

enzima fosforilada es muy estable y el proceso de hidrólisis para regenerarla es muy lento. Esta disminución en la capacidad de reactivación se denomina “envejecimiento” y resulta de la pérdida de un segundo grupo, generalmente alquilo desde el átomo de fósforo, que estabiliza el complejo AChE-OF (Anguiano *et al.*, 2011). Por consiguiente, la inhibición de AChE causa acumulación de ACh en las sinapsis colinérgicas y uniones neuromusculares, con una sobreestimulación de los receptores muscarínicos y nicotínicos (Costa, 2006; Anguiano *et al.*, 2011).

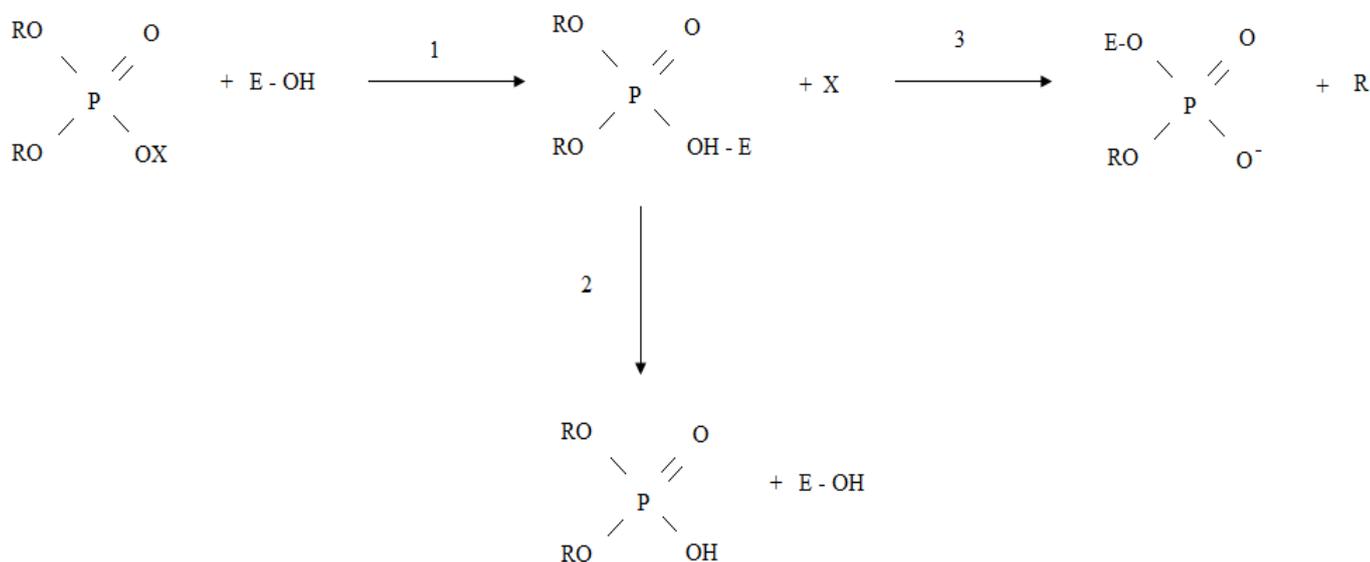


Figura 6: Representación esquemática de la interacción bioquímica entre OF y AChE. La reacción 1 es la fosforilación de AChE. La reacción 2 es la reactivación espontánea de AChE. La reacción 3 es el envejecimiento de la enzima y se obtiene una AChE fosforilada cargada negativamente, la cual es estable. E-OH representa el sitio activo de la enzima. Fuente: Costa (2006)

La enzima esterasa neurotóxica (ENT) es otro blanco primario de acción de OFs (Costa, 2006). Dependiendo de su estructura química, varios OFs pueden inhibir esta enzima. La fosforilación de ENT es similar a la observada para AChE, pero produce otro tipo de manifestación toxicológica conocida como polineuropatía retardada, cuyos efectos no se observan sino hasta después de varios días ocurrida la intoxicación aguda con OFs.

Otras enzimas pertenecientes a la familia de las B-esterasas son susceptibles de ser inhibidas por OFs. Una es la butirilcolinesterasa (BuChE), su inhibición parece no producir síntomas adversos de intoxicación, no obstante es inhibida a concentraciones mucho más bajas que AChE. La familia de las carboxilesterasas (CaE), enzimas de fase I, catalizan la hidrólisis de

esteres carboxílicos actuando como enzimas detoxificantes. Estas también son inhibidas por OFs. Al detoxificar OFs, las CaE forman una unión covalente análoga a la de AChE-OF, la cual no es hidrolizada por agua. No obstante, esta inhibición tampoco ha sido relacionada con algún efecto fisiológico agudo particular.

#### **1.1.4.4. Efectos tóxicos de OFs en la salud humana**

El principal efecto clínico de la intoxicación aguda con OFs consiste en la inhibición irreversible de AChE, evitando que se hidrolice al neurotransmisor ACh. Esto provoca la acumulación de ACh y la consecuente activación de receptores muscarínicos y nicotínicos, produciendo una hiperestimulación nerviosa, que en intoxicaciones agudas puede producir la muerte (Ranjbar *et al.*, 2005). Se han reportado diversos síntomas que aparecen rápidamente luego de la exposición agudas, entre los cuales se puede mencionar: visión borrosa, náuseas, vómitos, secreciones bronquiales, bronco constricción, etc. (Nouira *et al.*, 1995; Palacios Nava *et al.*, 1999).

Como consecuencia de la exposición crónica a OFs, se han registrado casos de distintos tipos de leucemia, necrosis de hígado, ciertas malformaciones congénitas y neuropatías periféricas (Bhalli *et al.*, 2009; Wesseling *et al.*, 2002). Otros efectos de los plaguicidas OFs sobre la salud son los respiratorios, endócrinos, genotóxicos y carcinógenos.

La mayoría de los plaguicidas poseen propiedades que favorecen su llegada al ambiente intrauterino. Se reportó una asociación positiva entre el retardo en el crecimiento intrauterino y la exposición de embarazadas a OFs (Levario-Carrillo *et al.*, 2004). También se demostró que los neonatos de madres residentes rurales, cuyo fenotipo y niveles de actividad de la enzima paraoxonasa las hacen más susceptibles a los OFs, presentaron menor crecimiento fetal y menor edad gestacional (Harley *et al.*, 2011). Por esta razón, en los últimos años, una gran parte de los estudios se han enfocado en los efectos de la exposición intrauterina a plaguicidas, por ser esta una vía de contacto con agentes en un periodo de alta susceptibilidad, lo que puede alterar el delicado equilibrio del sistema madre-placenta-feto.

## 1.2. Placenta humana

La placenta es un órgano multifuncional que protege al feto en desarrollo durante el embarazo y realiza la transferencia de nutrientes y residuos entre el feto y la madre. Es el mayor proveedor de nutrientes, citoquinas y hormonas (Regnault *et al.*, 2002; Saulsbury *et al.*, 2008). Se desarrolla a partir del tercer mes de embarazo y está ligada anatómica, génica y metabólicamente al desarrollo del feto en el útero. El desarrollo de la placenta comienza cuando las membranas fetales establecen contacto estable con la mucosa uterina de la madre, es decir comienza a desarrollarse tan pronto el blastocito se implanta en la pared uterina, lo cual ocurre entre el día 6-7 post coito (Benirschke *et al.*, 2006).

Los trofoblastos son las células especializadas de la placenta, y cumplen un rol crucial en la implantación del embrión y el mantenimiento del embarazo normal. La placenta está formada por un componente fetal, que deriva del trofoblasto y del mesodermo extraembrionario (placa coriónica) los cuales en conjunto conforman una estructura llamada corion, y por un componente materno, que procede del endometrio uterino (Langman, 2009). Las vellosidades de la placenta se extienden desde la placa coriónica hasta la cubierta del citotrofoblasto. Los citotrofoblastos proliferan continuamente y se diferencian en dos subtipos celulares: los trofoblastos extravelosos que migran dentro del endometrio materno y remodelan las arterias espirales para optimizar el suministro de oxígeno y nutrientes a la placenta y al feto; y los sincitiotrofoblastos que constituyen un epitelio multinucleado que actúa, por un lado, protegiendo al feto de la respuesta inmune materna y por otro como membrana intercambiadora de nutrientes y gases (Fig. 7). A medida que aumenta el crecimiento y la demanda de nutrientes del feto el área superficial del sincitiotrofoblasto también lo hace, de manera que se asegure la suficiente transferencia de nutrientes hacia el feto.

Los sincitiotrofoblastos vellosos poseen un corto periodo de vida con un continuo flujo de elementos apoptóticos hacia la circulación materna, por lo que se requiere un proceso de renovación de los mismos a lo largo de todo el embarazo. Los sincitiotrofoblastos no poseen capacidad proliferativa, por lo que durante el embarazo, éstos son mantenidos por la continua proliferación,

diferenciación y fusión de citotrofoblastos (Forbes y Westwood, 2010). Los espacios que quedan entre las vellosidades se denominan espacios intervillosos y son los que reciben la sangre materna que entra en la placenta por medio de las arterias espirales (Langman, 2009).

El proceso de proliferación y diferenciación de citotrofoblastos es esencial no sólo para la implantación de la placenta a la pared uterina sino también para remodelar las arterias maternas, las cuales proveen un adecuado flujo de sangre al feto. Por lo tanto, los factores que afecten el funcionamiento del trofoblasto pueden resultar en distintas complicaciones del embarazo tales como abortos espontáneos, preeclampsia, restricción del crecimiento intrauterino, entre otras (Tang *et al.*, 2014).

El crecimiento continuo del feto y la expansión del útero hacen que la placenta también se extienda. El aumento del área superficial de la misma es aproximadamente semejante a la del útero en expansión. El engrosamiento de la placenta no se debe a una mayor penetración en los tejidos maternos, sino a la arborización de las vellosidades existentes (Langman, 2009).

El intercambio materno-fetal, en ambos sentidos, es una de las funciones más importantes de este órgano. Se lleva a cabo por distintos mecanismos como ser difusión simple, difusión facilitada y transporte activo. Las sustancias que pasan desde la sangre materna hacia la circulación fetal son el oxígeno, agua, electrolitos, vitaminas, hormonas, anticuerpos, fármacos y algunas sustancias tóxicas (Aragón Anzures *et al.*, 2010).

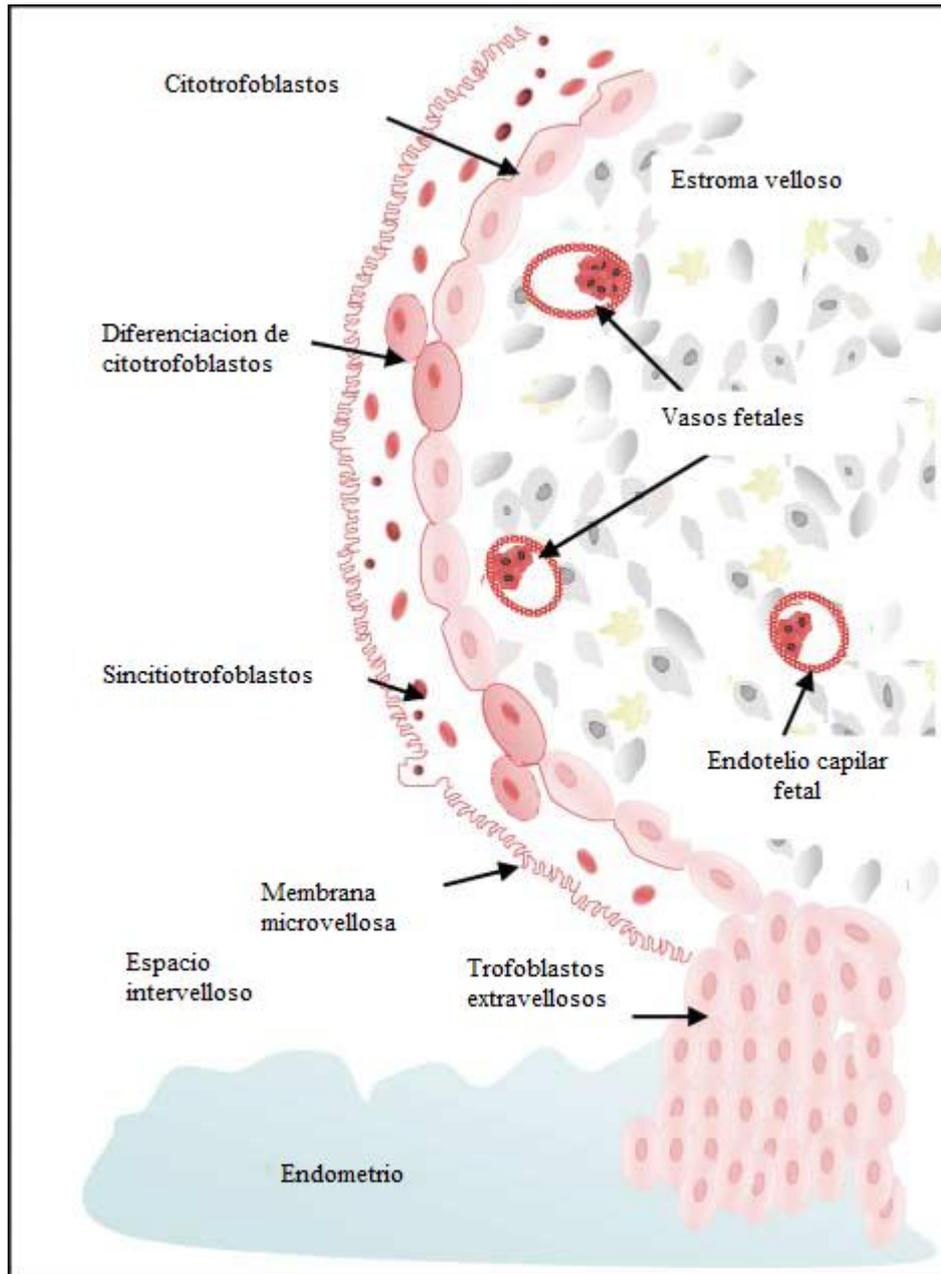


Figura 7: Diagrama esquemático de la placenta humana del primer trimestre. Los citotrofoblastos proliferan y se diferencian en trofoblastos extravelosos invasivos o en sincitiotrofoblastos. La función de estos últimos es funcionar como barrera protectora del feto y es en la superficie epitelial donde ocurre el intercambio de gases y nutrientes entre la circulación materna y fetal (adaptado de Forbes y Westwood, 2010).

La placenta constituye así una barrera para el feto frente a patógenos, al sistema inmune materno y para algunos tóxicos. Para los tóxicos que por sus propiedades físico-químicas son capaces de atravesar la placenta, se conoce que este órgano posee capacidad limitada de metabolizar xenobióticos (Guiñazú y Magnarelli, 2012), por medio de la acción de enzimas metabólicas

de Fase I y II (Saulsbury *et al.*, 2008). Además, debido a la complejidad y diversidad de las funciones desarrolladas por la misma y, considerando que la exposición a xenobióticos puede afectar el desarrollo intrauterino, Myllynen *et al.* (2005) han propuesto a este órgano como herramienta para biomonitorrear, investigar y predecir aspectos de la toxicidad en el desarrollo.

### **1.3. Especies reactivas de oxígeno (EROs)**

#### **1.3.1. Definición y generación de EROs**

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) son moléculas derivadas del oxígeno, que incluyen moléculas radicales (superóxido  $O_2^{\cdot-}$ , hidroxilo  $\cdot OH$ , peróxilo  $RO_2^{\cdot}$ , y alcoxilo  $RO^{\cdot}$ ) y no radicales tales como ácido hipocloroso (HClO), ozono ( $O_3$ ), oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Bedard y Kraus, 2007).

Las EROs son generadas de manera fisiológica por numerosos procesos celulares: como intermediarios del metabolismo celular, principalmente en la mitocondria, y como producto de la actividad de complejos enzimáticos tales como NADPH oxidasas, xantina oxidasa y citocromo P450, entre otros. Como se puede observar en la Fig. 8, la proteína transmembrana NADPH, la xantina oxidasa y la cadena de transporte de electrones mitocondrial son las principales fuentes de anión superóxido que puede ser por si mismo o enzimáticamente dismutado a peróxido de hidrógeno. Estas EROs pueden ser removidas del sistema por las enzimas catalasa o glutatión peroxidasa, o funcionar como mensajeros en vías de señalización celular (Bevilacqua *et al.*, 2012).

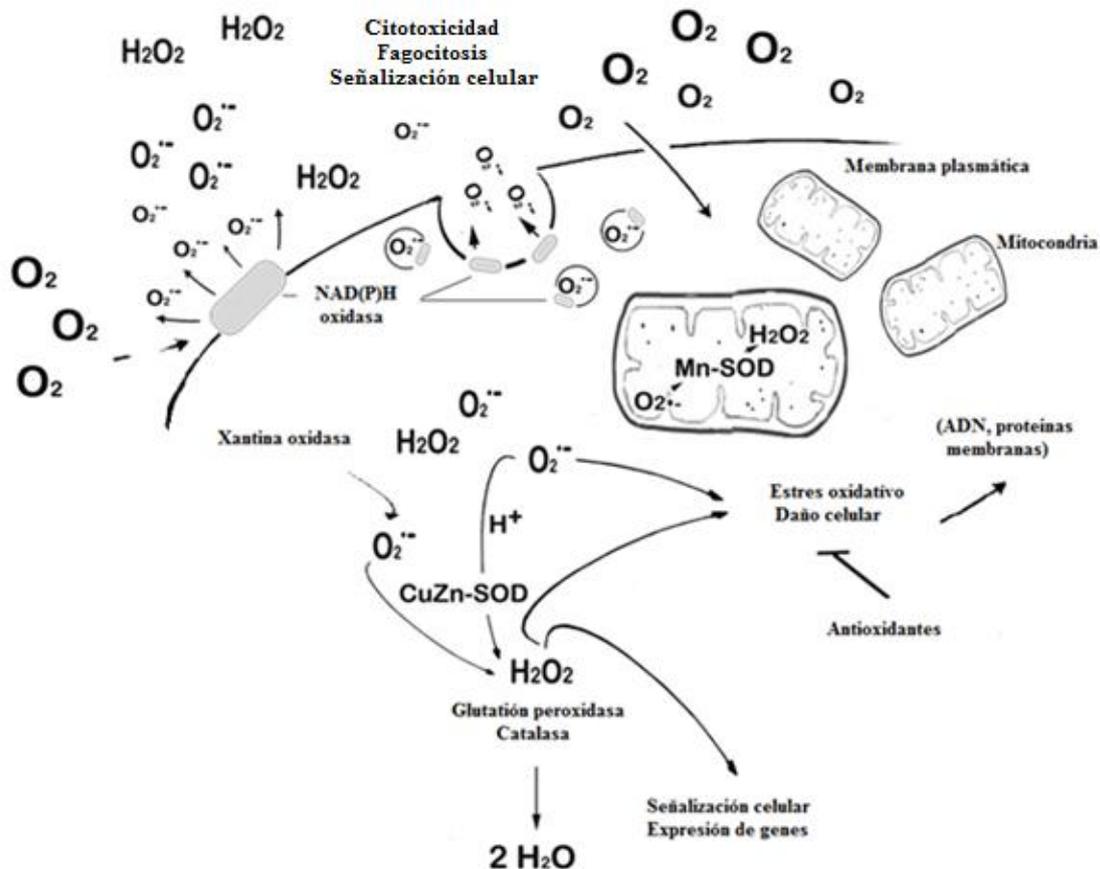


Figura 8 Vías de generación de EROs. La proteína transmembrana NADPH, la xantina oxidasa y la cadena de transporte de electrones mitocondrial son las principales fuentes de EROs las cuales pueden ser removidas por las enzimas catalasa o glutación peroxidasa, o funcionar como mensajeros en vías de señalización celular (adaptado de Bevilacqua *et al.*, 2012).

La generación de EROs generalmente comienza con la producción de superóxido (Fig. 9). El superóxido rápidamente dismuta a peróxido de hidrógeno en forma espontánea o catalizado por la enzima superóxido dismutasa (SOD). Otros elementos importantes en la generación de EROs incluyen: la reacción de superóxido con óxido nítrico para dar lugar a peroxinitrito, la formación de peróxido de hidrógeno catalizada por la enzima peroxidasa, y las reacciones de Haber-Weiss y de Fenton, catalizada por hierro, las cuales llevan a la generación de radical hidroxilo (Bedard y Kraus, 2007; Garrido, 2007).

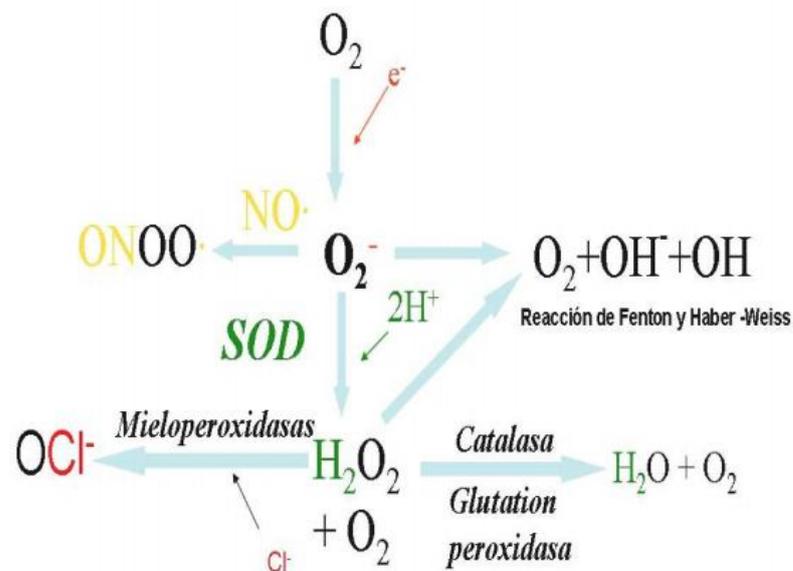


Figura 9: Esquema de formación de EROs. Estas se generan durante la reducción completa del oxígeno molecular a agua, en el cual se incorporan electrones al oxígeno en diversas etapas. También en este proceso, y como consecuencia de la interacción de anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) con óxido nítrico ( $NO$ ) se genera peroxinitrito. Por medio de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss, el anión superóxido y/o el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) pueden dar lugar al radical hidroxilo. Asimismo  $H_2O_2$ , catalizada por mieloperoxidasas, puede dar lugar al anión hipoclorito. Fuente: Garrido (2007).

### 1.3.2. EROs en funciones celulares y señalización

Bajo condiciones fisiológicas,  $O_2^{\cdot -}$  es generado a través de la activación de NADPH oxidasa y hacia el espacio extracelular dismuta en una molécula más estable, como  $H_2O_2$ . Debido a esta estabilidad, su capacidad de difusión a través de membranas y su afinidad para oxidar cisteínas,  $H_2O_2$  puede actuar como una molécula señalizadora en procesos de transducción de señales y como mensajero secundario en cascadas intracelulares. En este contexto, regula la actividad de fosfatasa y kinasas, y a nivel de expresión genética modula factores de transcripción relacionados a la proliferación, diferenciación y apoptosis (Bevilacqua *et al.*, 2012).

Por otro lado, las EROs funcionan como mediadores inflamatorios y están implicadas en mecanismos de la defensa antimicrobiana (Choi *et al.*, 2006; Bevilacqua *et al.*, 2012).

### 1.3.3. Defensa antioxidante.

Los organismos aeróbicos sobreviven a la presencia de oxígeno solo debido a que poseen defensas antioxidantes evolucionadas (Halliwell y Gutteridge, 2007), dado que la síntesis continua de EROs por el metabolismo necesita un sistema capaz de mantener bajas las concentraciones de los mismos (Garrido, 2007). Este sistema antioxidante, que limita la acción nociva de las EROs, está compuesto de enzimas y moléculas esenciales cuya función es: evitar la formación excesiva de EROs, capturar aquellos que se hayan formado y remover o reparar las biomoléculas dañadas (Chihualiaff *et al.*, 2002; Bedard y Kraus, 2007).

El sistema antioxidante está compuesto por enzimas tales como superóxido dismutasa (sus tres isoformas: Cu,Zn-SOD –citósólica-, Mn-SOD –mitocondrial- y Cu,Zn-SOD –extracelular-), catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa. Además, otro de los sistemas de defensa son las moléculas antioxidantes no enzimáticas, como glutatión reducido, vitamina C, E y beta caroteno, entre otros. Ambos sistemas, el enzimático y el no-enzimático, trabajan sinérgicamente para aumentar la capacidad antioxidante total del organismo (Garrido, 2007; Lukaszewic-Hussain *et al.*, 2010).

### 1.3.3. Toxicidad asociada a EROs – Estrés oxidativo.

Diversos autores indican que las especies reactivas de oxígeno están involucradas en la patología de muchas enfermedades humanas: artritis reumatoidea, shock hemorrágico, cardiopatías, fibrosis quística, Parkinson y Alzheimer, entre otras. Esto se debe a que las EROs generan daño sobre distintos tipos de biomoléculas como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos (Halliwell y Gutteridge, 2007; Whiteman *et al.*, 2008). Es por ello la remarcada importancia del sistema antioxidante, tanto enzimático como no enzimático, del organismo.

El estrés oxidativo (EO) resulta del desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la capacidad antioxidante y detoxificante del organismo (Muñiz *et al.*, 2008). De esta manera el EO ocurre cuando la producción de EROs excede la defensa antioxidante del propio organismo. El EO está asociado al daño tisular, por lo tanto es un factor importante a

considerar en el desarrollo de diferentes patologías (Fig. 10) (Halliwell y Gutteridge, 2007).

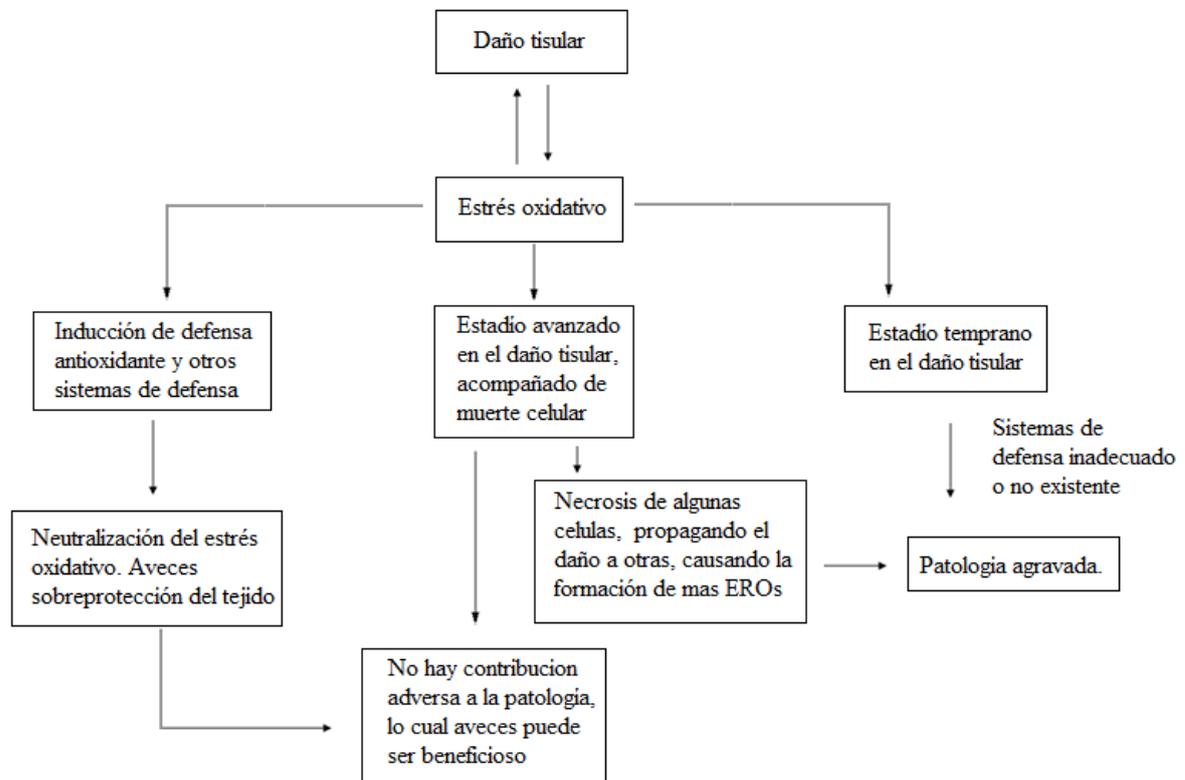


Figura 10: Esquemática de la relación entre el daño tisular y estrés oxidativo en la contribución al desarrollo de una enfermedad. Adaptado de Halliwell y Gutteridge (2007).

Las EROs, mediante la inducción de EO, han sido involucradas en la toxicidad de muchos xenobióticos. Halliwell y Gutteridge (2007) indican que la toxicidad de los xenobióticos puede estar asociada con diversos mecanismos, que no son excluyentes uno de los otros:

- El xenobiótico en sí puede ser una especie reactiva, tal es el caso del oxígeno, dióxido de nitrógeno, etc.
- El xenobiótico puede ser metabolizado a una especie reactiva (ej. metabolismo del tetracloruro de carbono).
- A través de ciclos de óxido-reducción, el xenobiótico puede ser reducido por el sistema celular, y el producto de reducción puede ser reoxidado por  $O_2$ , produciendo  $O_2^{\cdot -}$  (ej. metabolismo del plaguicida paraquat).

- Algunos xenobióticos pueden estimular la generación endógena de especies reactivas (ej. aquellos que afectan la cadena de transporte de electrones en la mitocondria o que activen fagocitos).
- Algunos xenobióticos pueden interferir con la defensa antioxidante (ej, al ser conjugados al glutatión, una elevada dosis podría disminuir sus niveles llevando a un daño oxidativo por falla de una adecuada remoción de EROs endógenas).
- Algunos xenobióticos y sus metabolitos pueden ligarse a biomoléculas y crear nuevos aductos, provocando un incremento en la producción de especies reactivas.

## 2. Hipótesis

La exposición de trofoblastos a plaguicidas organofosforados induce EO debido a la formación de EROs. Asimismo, la producción de EROs se ve influenciada por el tiempo de exposición, el tipo de organofosforado al que se esté expuesto y la concentración a la que se produzca dicha exposición.

## 3. Objetivos

### 3.1. Objetivo General

- Estudiar si la exposición a plaguicidas organofosforados induce estrés oxidativo en la línea celular trofoblástica JEG-3.

### 3.2. Objetivos específicos

- Estudiar si la exposición a los plaguicidas organofosforados clorpirifos y metilazinfos induce la formación de especies reactivas de oxígeno en cultivos celulares mediante modelos *in vitro*.
- Estudiar y analizar comparativamente el comportamiento de diferentes métodos de evaluación de estrés oxidativo en cultivos celulares debido a la incubación con clorpirifos y metilazinfos.

## **4. Marco teórico y antecedentes**

### **4.1. Plaguicidas en la Región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén.**

La Región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén es una extensa zona geográfica irrigada dedicada a la producción fruti-hortícola intensiva, actividad sumamente importante para la economía de estas provincias y para las exportaciones del sector agropecuario argentino. En esta zona desde el año 2006 se implementó el manejo integrado de plagas (MIP), el cual implica la combinación de diversas estrategias para prevenir pérdidas en la producción (principalmente combatir la incidencia de la carpocapsa -*Cydia pomonella*- gusano de la pera y manzana, entre otras plagas). En el MIP se incluye la aplicación de diferentes familias de agroquímicos entre los meses de octubre a marzo, dentro de los que se encuentran los plaguicidas organofosforados metilazinfos (MA) y clorpirifos (CP) como algunos de los más utilizados (Cichón *et al.*, 2013).

El principal mecanismo de toxicidad de OFs es la inhibición de la enzima AChE, tanto en el insecto como en los organismos “no blanco” (Magnarelli *et al.*, 2011). Si bien el control de plagas redundaría en un beneficio económico-productivo directo, es importante considerar también que el plaguicida alcanza otros receptores en el ambiente, pudiendo representar un riesgo para la salud humana.

### **4.2. Insecticidas organofosforados y su relación con la salud pública y ambiental**

Los OFs constituyen la familia de insecticidas más comúnmente utilizados a nivel mundial (Ramírez y Lacasaña, 2001). Por esta razón, la comunidad científica ha demostrado un creciente interés en el estudio de sus niveles en productos alimenticios, suministros de agua (Lukaszewicz-Hussain *et al.*, 2010), ambientes residenciales y adyacentes a sitios de cultivo.

Si bien el principal blanco de acción de los OFs es el sistema nervioso, los efectos derivados de la inhibición colinérgica no son suficientes para explicar todas las manifestaciones toxicológicas que surgen de la exposición a estos plaguicidas. Distintos autores postulan que en intoxicaciones tanto agudas como crónicas con estos compuestos se pueden disturbar los procesos

redox, cambiando la actividad de enzimas antioxidantes y causando aumento de peroxidación lipídica en muchos órganos. Asimismo, estos autores marcan una relación entre cambios en el balance oxidativo y ciertas enfermedades humanas (tales como Alzheimer, Parkinson, envejecimiento celular, artritis, entre otras), de aparición posterior a la exposición a plaguicidas (Badii y Landeros, 2007; Lukaszewic-Hussain *et al.*, 2010; Ranjbar *et al.*, 2005; Anguiano *et al.*, 2011). Es por ello que la inducción de EO ha sido postulada como un posible mecanismo de toxicidad asociada a estos plaguicidas.

### **4.3. Exposición residencial a insecticidas organofosforados**

Un estudio llevado a cabo por Loewy *et al.* (2011) en una subcuenca agrícola del valle del Río Neuquén reveló la presencia de residuos de OFs tales como MA y CP tanto en agua (superficial y subterránea) como en suelo. Este estudio demostró que la migración de los plaguicidas OFs fuera del sitio de aplicación es un proceso que ocurre en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén, asociado a las prácticas agrícolas. La movilidad de los plaguicidas hacia el aire, agua y suelo, indicaría que la población rural podría encontrarse expuesta a estos xenobióticos y por lo tanto en una situación de riesgo para la salud. En especial, dentro de la población se reconoce a las mujeres embarazadas y a los niños como grupos vulnerables. De hecho, en estudios realizados en la ciudad de Cinco Saltos (provincia de Río Negro), se constató la exposición a plaguicidas OFs de mujeres embarazadas residentes en la zona rural (Souza, 2005). Considerando que los OFs son capaces de atravesar la placenta (Magnarelli y Guiñazú, 2012), la exposición intrauterina representa la primer vía de contacto con estos xenobióticos en la vida de un individuo (Beltramino *et al.*, 2008).

### **4.4. La placenta como herramienta de biomonitoreo**

En estudios realizados con mujeres embarazadas residentes en zonas de aplicación intensiva de OFs, se analizaron las placentas a término y se encontraron modificaciones en la expresión de distintas enzimas, tales como arginasa (ARG) y ornitina decarboxilasa (ODC), involucradas en la biosíntesis de poliaminas. Esto posiblemente esté asociado a una respuesta reparadora

para mantener la homeostasis tisular (Lombardo, 2011). Adicionalmente, en la zona del Alto Valle de Río Negro y Neuquén, se halló que placentas a término de mujeres residentes en comunidades de la zona rural, presentaron inhibición de la actividad de catalasa y AChE (Souza *et al.*, 2005). Estos hallazgos remarcan la importancia de estudiar no sólo mecanismos alternativos de daño sino también órganos no clásicamente considerados como de impacto toxicológico en la exposición a plaguicidas OFs, siendo la placenta uno de ellos.

Resultados obtenidos en modelos *in vitro* con la línea celular trofoblástica JEG-3 sugieren que los plaguicidas MA y CP son capaces de inducir cambios en los niveles de expresión de los transcritos de receptores tipo toll (TLR), un conjunto de proteínas que forman parte del sistema inmune innato. Se observó un aumento de los transcritos de TLR-2 y TLR-4 a cortos periodos de incubación (4 horas) y altas concentraciones de CP (100µM). Mientras que MA incrementó los niveles del transcripto de TLR-2 a cortos periodos de exposición, pero a bajas concentraciones (1 y 10 µM) (Zappa, 2014). Asimismo, ha sido demostrado que esta línea celular presenta actividad de AChE y carboxilesterasas (CaE), evidenciando un sistema colinérgico no neuronal. Además, los resultados muestran que la actividad de AChE presente en estas células es más sensible a la inhibición por OFs que la CaE. Diferencia que se observó tanto en la exposición a CP y MA, donde se encontró que en trofoblastos expuestos a estos plaguicidas se inhibe la actividad de AChE (Espinoza, 2014).

#### **4.3.1. Plaguicidas organofosforados y estrés oxidativo**

El estrés oxidativo ha sido propuesto como uno de los mecanismos que relacionaría la exposición a OFs con los efectos adversos observados sobre la salud humana y ambiental.

En un estudio realizado en el LIBIQUIMA por Vera *et al.* (2010), se analizaron distintos componentes celulares en placentas de mujeres expuestas ambientalmente a plaguicidas: se observaron cambios en la composición de los lípidos nucleares los cuales exhibían un perfil proliferativo. Una de las posibles explicaciones para estas alteraciones podría ser la inducción de estrés

oxidativo por estos xenobióticos. El estrés oxidativo afectaría las vías de señalización que regulan el metabolismo de lípidos nucleares. Se podría entender entonces, que la detoxificación de estos compuestos estaría involucrada con el balance redox celular, aumentando así las especies reactivas de oxígeno, e impactando al ADN. Esto generaría un aumento de la transcripción y actividad de ARG y ODC, lo cual estaría asociado posiblemente a una proliferación celular, en respuesta al daño que originarían los OFs (Lombardo, 2011).

En la interfase materno-fetal de la placenta, la función de las EROs es particularmente relevante tanto en embarazos normales como patológicos. Asimismo, el balance oxidativo en la placenta es muy importante debido a los cambios en los niveles de oxígeno a los que los trofoblastos están expuestos, desde un ambiente bajo en oxígeno en la gestación temprana hasta concentraciones más altas a lo largo del embarazo (Bevilacqua *et al.*, 2012).

Si bien se han encontrado diversas alteraciones en la placenta de mujeres expuestas y en modelos *in vitro* con líneas celulares de trofoblastos, no ha sido explorada la capacidad de estas sustancias de inducir estrés oxidativo en células trofoblásticas.

## **5. Materiales y métodos.**

### **5.1. Reactivos**

Los plaguicidas empleados, clorpirifos (CP) y metilazinfos (MA), fueron obtenidos de ChemService. Los reactivos azul de nitrotetrazolio (NBT), forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), dimetilsulfóxido (DMSO), 3-hidrazida aminofalolil (luminol), 2',7'-diclorofluoreceína (DCFDA), fueron obtenidos de Sigma Aldrich.

### **5.2. Cultivo celular**

Se empleó la línea celular trofoblástica JEG-3, proveniente de coriocarcinoma humano, obtenida de American Type Culture Collection (ATCC). Esta línea celular fue establecida en cultivo en 1966, a partir de un coriocarcinoma posparto trasplantado en forma seriada en hámster, el cual presenta varias de las características del trofoblasto normal.

Para la realización de los experimentos, la línea celular fue cultivada en presencia de Dulbecco's Eagle Modified Medium -DMEM- (Invitrogen) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (GIBCO), 2 mM L-glutamina, 50 UI/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina y 25 ng/ml de gentamicina), y mantenida a 37 °C en atmósfera húmeda y CO<sub>2</sub> al 5 %. Las células fueron expuestas *in vitro* a distintas concentraciones de los plaguicidas CP o MA (0.01-100 µM) y a diferentes tiempos de incubación (1, 4 y 24 horas).

### **5.3. Detección de Especies Reactivas de Oxígeno**

La determinación de especies reactivas de oxígeno debido a la exposición de plaguicidas organofosforados metilazinfos y clorpirifos, se llevó a cabo por medio de distintas técnicas espectrofotométricas. Estas consisten en: técnicas colorimétricas, fluorescentes y quimioluminiscentes.

#### **5.3.1. Ensayo de Reducción de NBT**

La técnica colorimétrica empleada para determinar la producción de EROs fue el ensayo de reducción de azul de nitrotetrazolio (NBT) modificado por Choi *et al.* (2006).

El NBT es un compuesto de color amarillo que en presencia de anión superóxido es reducido dando como producto un compuesto insoluble en agua de intenso color azul (azul de formazan), que puede ser monitoreado espectrofotométricamente (De la Torre Binimelis, 1994; Esfandiari *et al.*, 2003; Tunc *et al.*, 2010) (Fig. 11).

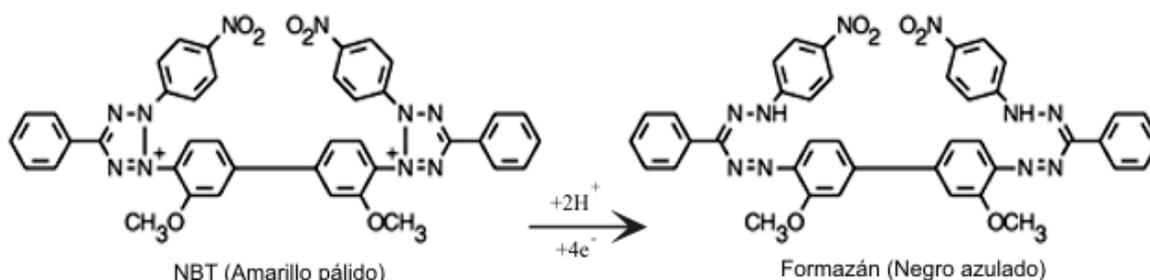


Figura 11: reacción de reducción del NBT a formazán (Choi *et al.*, 2006).

La absorbancia del NBT dependerá de los niveles de EROs intracelulares, principalmente el anión superóxido (Baehner *et al.*, 1976), ya que la misma permanece constante con respecto al número de células, tiempo de incubación y concentración de los estímulos en los ensayos comparados por Choi *et al.* (2006).

Para la realización de este ensayo se emplearon  $7,5 \times 10^3$  células por pocillo en un volumen final de 200  $\mu$ l de medio DMEM, se utilizaron placas de 96 pocillos. Las células fueron incubadas a 37°C durante 24 horas. Se estimularon las células con DMSO como solvente control (0,02%), CP (concentraciones 0,01, 0,1, 1, 10 y 100  $\mu$ M) y MA (concentraciones 0,01, 0,1, 1, 10 y 100  $\mu$ M), durante 1, 4 y 24 horas de exposición.

Una vez expuestas a los plaguicidas se retira el medio de cultivo y se adiciona la solución de NBT, compuesta por: 200  $\mu$ l NBT 0,01%, 2,5  $\mu$ l forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) 0,01 mM por pocillo, y se incuba 45 minutos a 37°C. El PMA, un activador de la proteína quinasa C, produce oxígeno activo por la NADPH oxidasa en las estructuras intracelulares, por lo que se empleó como gatillador en todas las condiciones ensayadas.

Luego de la incubación con NBT, se lava la placa dos veces con PBS y se incorpora la solución de lisis: 120  $\mu$ l de KOH (para solubilizar las membranas celulares) y 140  $\mu$ l DMSO (para disolver el azul de formazan) por pocillo. La

placa se agita por 10 minutos y se mide la absorbancia en espectrofotómetro (Lector de Microplacas Rayto RT 2100 C) a 630 nm.

### 5.3.2. Ensayo de oxidación de DCFH-DA

La técnica fluorescente empleada para determinar la producción de EROs fue el ensayo con 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA), descrita por Yang *et al.* (2009). Este compuesto es capaz de difundir a través de la membrana celular, y es hidrolizado por esteraras intracelulares al compuesto 2',7'- diclorodihidrofluoresceína (DCFH). Por otra parte, EROs como peróxido de hidrógeno, anión hidroxilo, e hidroperóxidos oxidan de DCFH a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (Fig. 12), un compuesto fluorescente (Gomes *et al.*, 2005; Wang y Joseph, 1999). Este proceso puede monitorearse espectrofotométricamente ( $\lambda$  excitación: 485 nm,  $\lambda$  emisión: 530 nm) (Yang *et al.*, 2009).

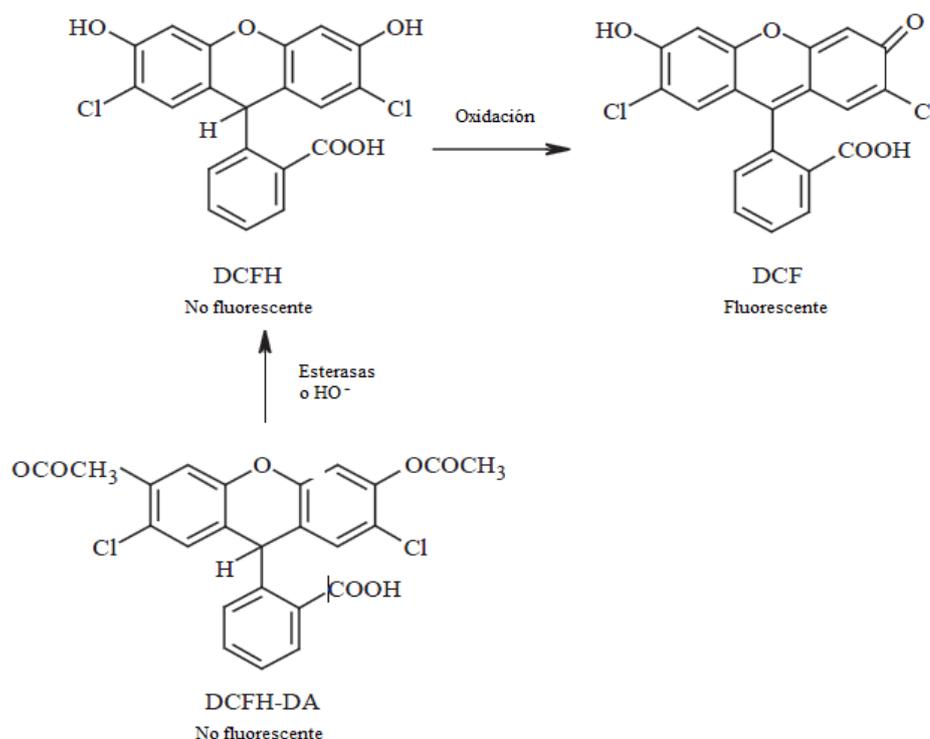


Figura 12: Mecanismo de de-esterificación de 2',7'- diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFHDA) a 2',7'- diclorodihidrofluoresceína (DCFH), y la consiguiente oxidación a 2,7-diclorofluoresceína (DCF) por medio de especies reactivas de oxígeno (Gomes *et al.*, 2005).

Para este ensayo se emplearon  $4,8 \times 10^5$  células por pocillo en un volumen de 2 ml DMEM, se utilizaron placas de 6 pocillos. Las células fueron tratadas con DMSO como control solvente (0,02%), CP (concentraciones 0,01, 0,1, 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ) y MA (concentraciones 0,01, 0,1, 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ), durante 1, 4 y 24 horas de exposición a 37 °C en atmósfera húmeda y  $\text{CO}_2$  al 5 %. Posteriormente se levantaron las células con tripsina y se resuspendieron en PBS y fueron repicadas en tubos eppendorf. Luego se centrifugaron durante 5 minutos a 3500 rpm, se retiró el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 1 ml de DCFH-DA 10  $\mu\text{M}$  para luego ser incubados durante 30 minutos a 37°C. Una vez cumplido este período se adicionaron 12,5  $\mu\text{l}$  de PMA (0,01 mM) y se volvió a incubar durante 30 minutos más. Posteriormente se centrifugaron nuevamente los eppendorf y se resuspendieron las células en PBS y se repicaron en placa de 96 pocillos opaca (40.000 células/pocillo) y se procedió a medir en espectrofluorómetro (Hitachi H7000) a  $\lambda_{\text{excitación}}$ : 435nm y  $\lambda_{\text{emisión}}$ : 535nm.

### 5.3.3. Ensayo de oxidación del luminol

La producción de EROs por medio de quimioluminiscencia fue determinada empleando el ensayo con luminol, según Hoang y Pfefferkorn (2002).

La técnica quimioluminiscente mediada por luminol tiene la capacidad de detectar  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$  y  $\cdot\text{OH}$ , a pesar de no poder distinguir uno de otro puede medir niveles globales de EROs bajo condiciones fisiológicas y además es fácil de utilizar (Kobayashi *et al.*, 2001).

Hoang y Pfefferkorn (2002) establecen que el fundamento de esta técnica involucra la producción de anión superóxido que es liberado al medio extracelular donde oxida al luminol. Esta oxidación resulta en la liberación de fotones (luz), la cual puede ser medida mediante luminómetro. Asimismo el reactivo luminol puede reaccionar con otras EROs tales como anión hidroxilo, peroxinitrito, ácido hipocloroso, entre otros (Halliwell y Gutteridge 2007), de tal manera que esta técnica es útil para medir la producción global de EROs.

Para este ensayo con luminol se emplearon  $0,4 \times 10^6$  células por pocillo en un volumen final de 2 ml de medio DMEM, se utilizaron placas de 6 pocillos.

Las células se trataron con DMSO como control solvente (0,02%), CP (concentraciones 0,01, 0,1, 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ) y MA (Concentraciones 0,01, 0,1, 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ), durante 1, 4 y 24 horas de exposición a 37 °C en atmósfera húmeda y  $\text{CO}_2$  al 5 %. Posteriormente se levantaron las células con tripsina y se resuspendieron en PBS y fueron repicadas en tubos eppendorf. Posteriormente se centrifugaron los eppendorf y se resuspendieron las células en PBS y se repicaron en placa de 96 pocillos opaca (20.000 células/pocillo en 100  $\mu\text{l}$  de PBS), luego se adicionó 100  $\mu\text{l}$  por pocillo de luminol (100  $\mu\text{M}$ ) + PMA (2,5  $\mu\text{l}$  0,01 mM) por cada condición y se midió la luminiscencia en el momento con espectrofluorómetro (Hitachi H7000).

#### **5.4. Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos fueron analizados por medio de Análisis de la Varianza (ANOVA) con estructura factorial seguido del test de Dunnett como prueba a posteriori, con un nivel de confianza del 5%, empleándose los programas Statistica 7 y Graphpad Prism 5.

## 6. Resultados

### 6.1. Estudio de interacción de factores

Los resultados obtenidos de la producción de EROs por la técnica de reducción del NBT fueron analizados a partir del ANOVA factorial, donde se evaluaron las interacciones entre los factores: tiempo de exposición y concentración de OFs (Tabla 4).

**Tabla 4: ANOVA factorial para las interacciones de los factores tiempo de exposición, concentración y OF**

Efecto	SS	GL	MS	F	P-Valor
Intercept	5.079584	1	5.079584	68842.38	0.000000
Tiempo	0.271326	1	0.271326	3677.21	0.000000
Organofosforado	0.000171	1	0.000171	2.32	0.130164
Tratamiento	0.091895	6	0.015316	207.57	0.000000
Tiempo*Organofosforado	0.001594	1	0.001594	21.60	0.000008
Organofosforado*Tratamiento	0.004655	6	0.000776	10.52	0.000000
Tiempo*Tratamiento	0.001678	6	0.000280	3.79	0.001576
Tiempo*Organofosforado*Tratamiento	0.009053	6	0.001509	20.45	0.000000
Error	0.010330	140	0.000074		

Teniendo en cuenta que se observó una interacción significativa entre los factores ( $P < 0,05$ ), se procedió a analizar los efectos combinados del tiempo de exposición y concentración dentro de cada organofosforado en particular.

## 6.2. Inducción de la producción de EROs

### 6.2.1. Reducción colorimétrica de NBT

En una primera aproximación se analizó mediante el ensayo reducción del NBT el efecto de la exposición a cortos periodos de tiempo (1 h) a distintas concentraciones de CP sobre la producción de EROs. En la Fig. 13-A se observa que todas las concentraciones ensayadas del insecticida inducen la producción de EROs ( $P < 0,05$ ).

Asimismo, en incubaciones prolongadas, la exposición a CP durante 4 y 24 horas indujo la producción de EROs en todas las concentraciones ensayadas ( $P < 0,05$ ) (Fig. 13-B y 13-C).

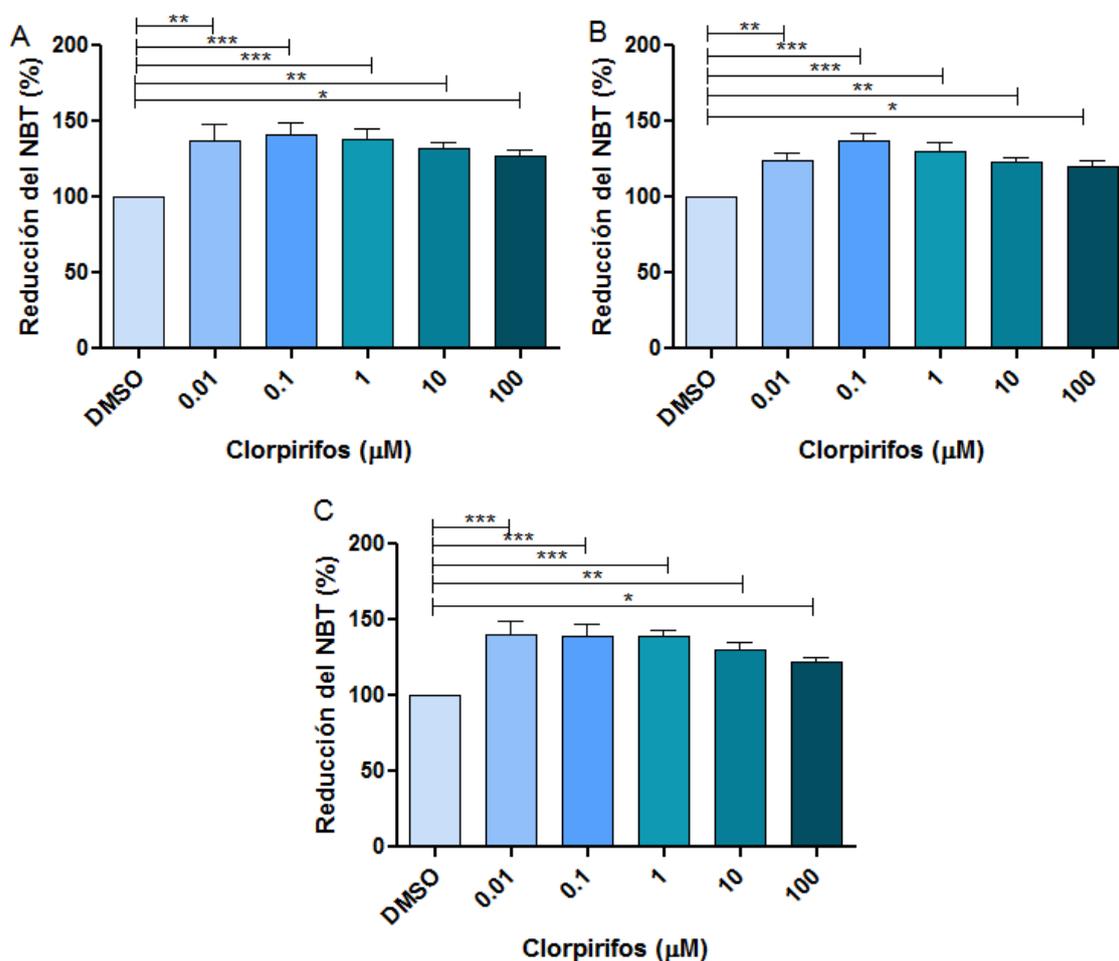


Figura 13: Reducción del NBT (%). (A) 1 hora de exposición a CP, (B) 4 horas de exposición a CP y (C) 24 horas de exposición a CP (\*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$  y \*\*\*  $P < 0,0001$ ). Se muestran medias de 4 experimentos independientes.

Otro de los OFs ensayados fue el MA, de manera similar a CP, MA indujo la producción de EROs a 1 h de exposición en todas las concentraciones ensayadas ( $P < 0,05$ ), como se puede observar en la Fig. 14-A.

En incubaciones prolongadas, la exposición a MA durante 4 h favoreció la producción de anión superóxido mostrando la misma tendencia que a 1 h de incubación con el insecticida ( $P < 0,05$ ) (Fig. 14-B). Mientras que la exposición durante 24 h se observaron cambios significativos en las concentraciones 0,01; 0,1; 1 y 10  $\mu\text{M}$  de MA, no observándose diferencias significativas a 100  $\mu\text{M}$  del insecticida (Fig. 14-C).

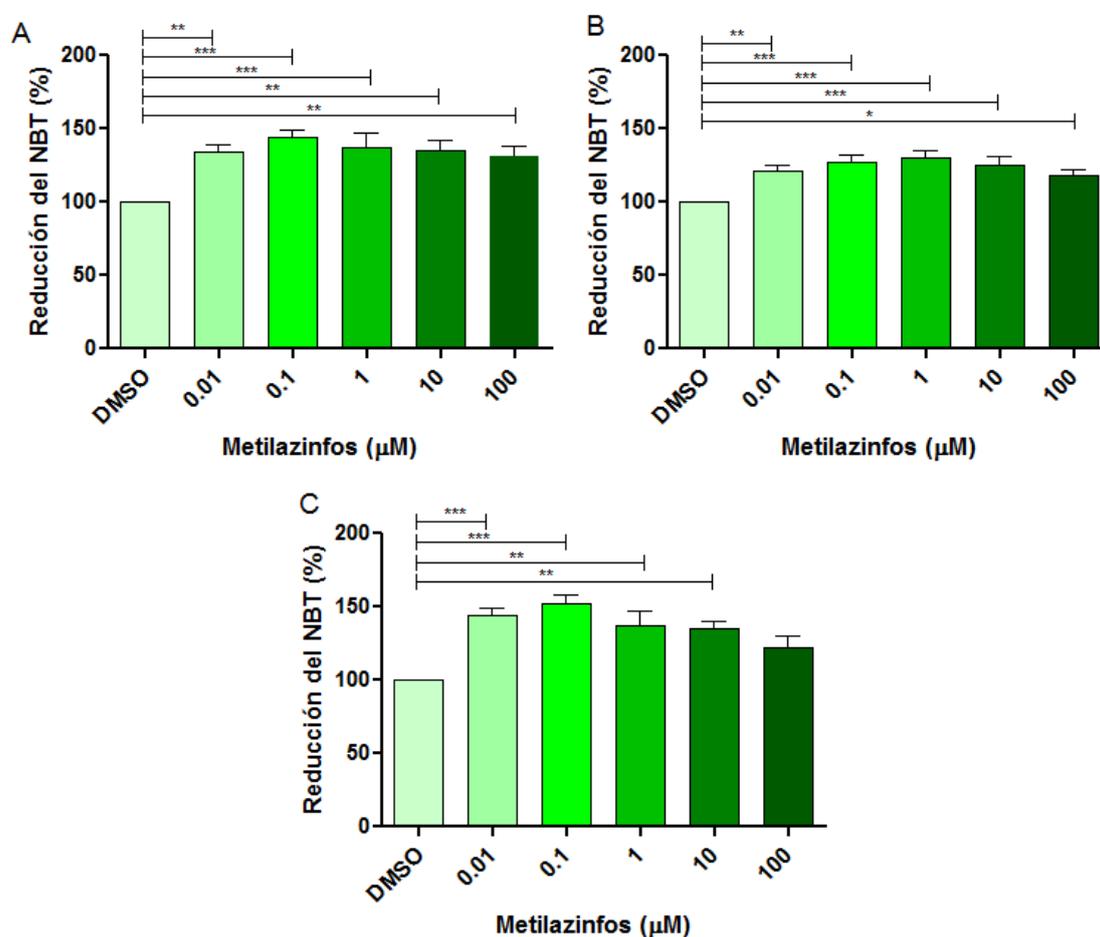


Figura 14: Reducción del NBT (%). (A) 1 hora de exposición a MA, (B) 4 horas de exposición a MAY (C) 24 horas de exposición a MA ( $*P < 0,05$ ,  $**P < 0,01$  y  $***P < 0,0001$ ). Se muestran medias de 4 experimentos independientes.

### 6.2.2. Ensayo fluorométrico de oxidación de DCFH-DA

El análisis de los resultados del ensayo con DCFH-DA se realizó de forma similar al ensayo de reducción del NBT. De esta manera, se procedió a

analizar los efectos combinados del tiempo de exposición y concentración de cada organofosforado independientemente respecto de la producción de EROs.

Como se observa en la Fig. 15-A la exposición durante 1 h al organofosforado CP favoreció la producción de EROs a concentraciones 0,01; 0,1; 1 y 10  $\mu\text{M}$  del insecticida ( $P < 0,05$ ), mientras que a 100  $\mu\text{M}$  no se observó diferencias significativas respecto del control.

Por otro lado, en exposiciones prolongadas, CP indujo la producción de EROs solo a las concentraciones 0,01; 0,1; 1 y 10  $\mu\text{M}$  a 4 h de incubación con el insecticida, no observándose diferencias significativas a 100  $\mu\text{M}$  respecto del control con DMSO ( $P < 0,05$ ) (Fig. 15-B). Mientras que la exposición a 24 h no indujo diferencias significativas en la producción de EROs respecto al control en todas las concentraciones ensayadas ( $P > 0,05$ ) (Fig. 15-C).

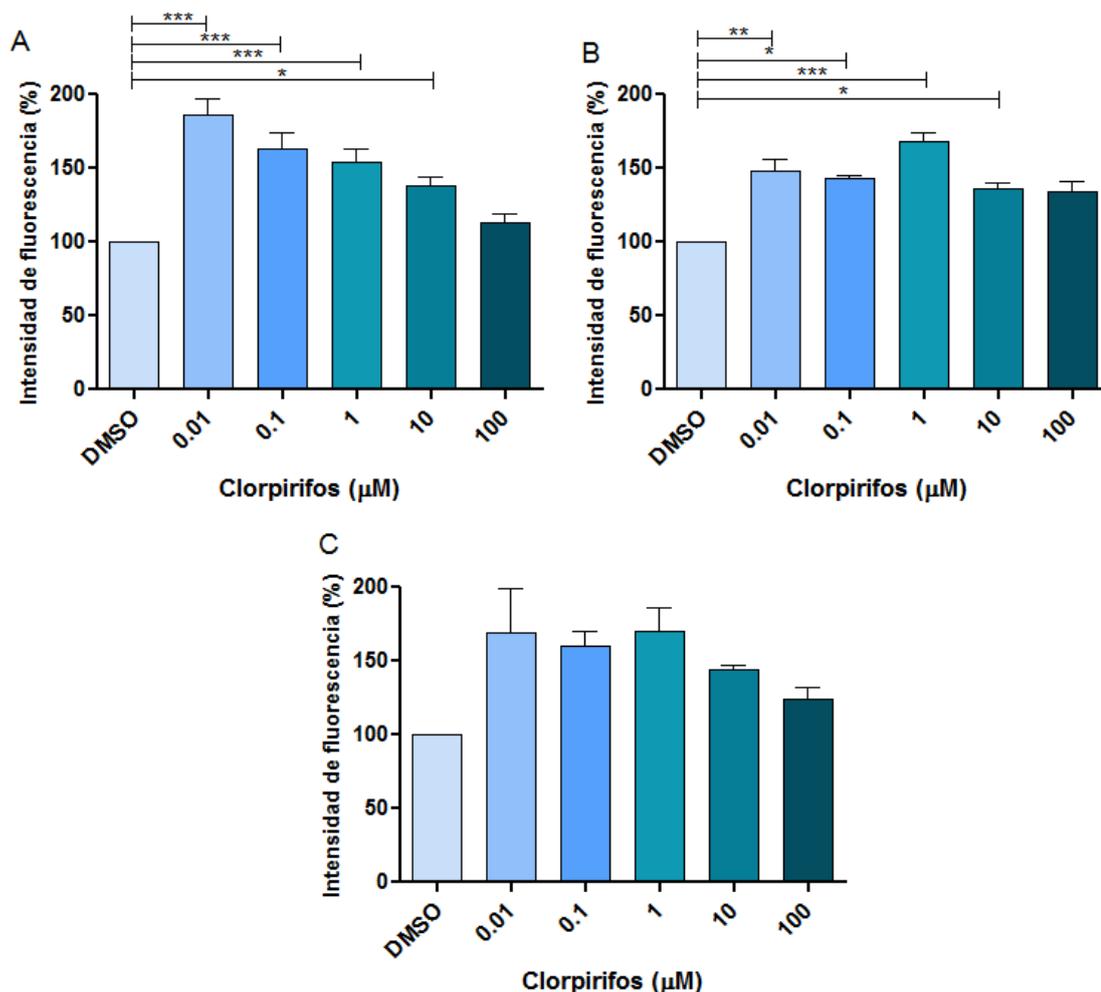


Figura 15: Intensidad de fluorescencia (%). (A) 1 hora de exposición a CP, (B) 4 horas de exposición a CP y (C) 24 horas de exposición a CP (\* $P \leq 0,05$ , \*\* $P \leq 0,01$  y \*\*\* $P < 0,0001$ ). Se muestran medias de 2 experimentos independientes

La exposición al insecticida MA (Fig. 16-A) favoreció la producción de EROs solo a las concentraciones 0,01; 0,1 10 y 100  $\mu\text{M}$  del mismo, en periodos de incubación de 1 h ( $P < 0,05$ ). Mientras que la exposición durante 4 y 24 h al insecticida (Fig. 16-B y 16-C) indujo aumentos significativos en la producción de EROs en todas las concentraciones ensayadas ( $P < 0,05$ ).

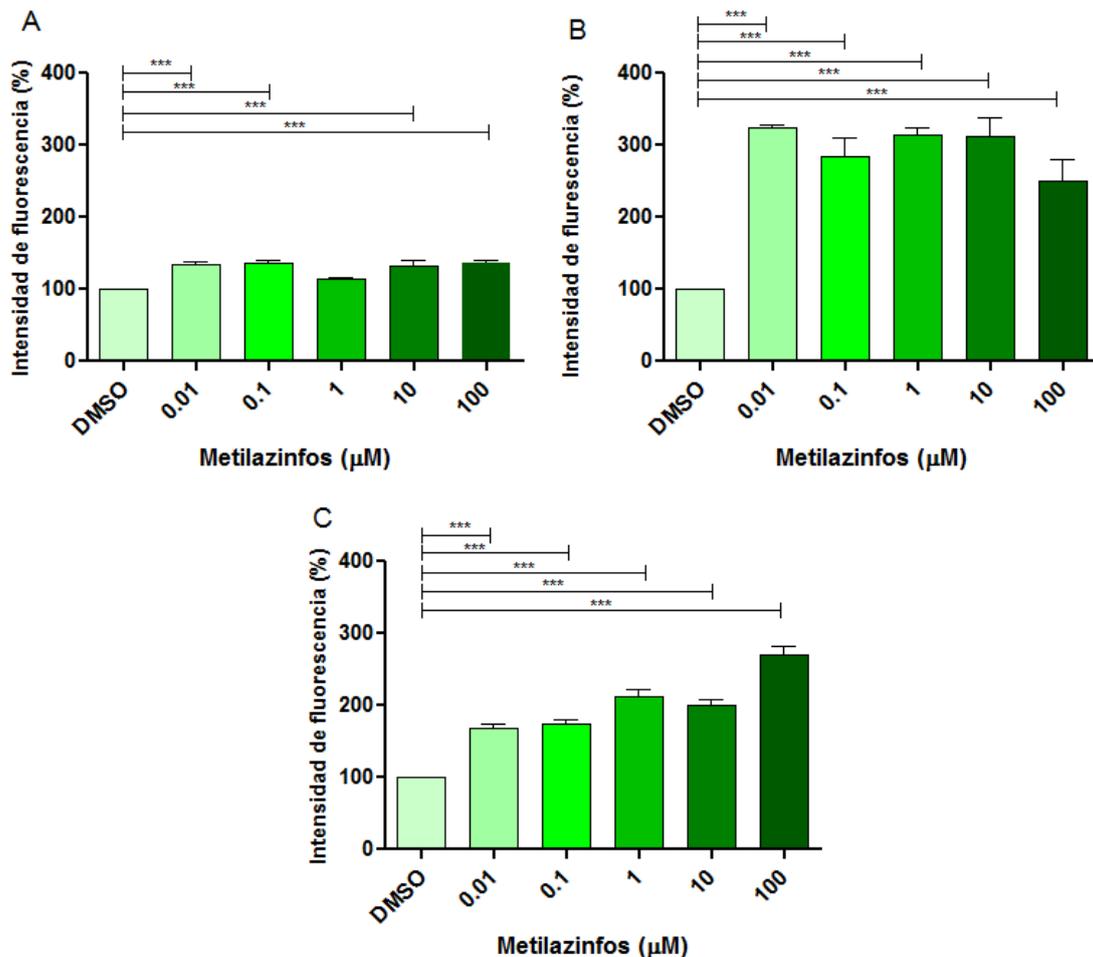


Figura 16: Intensidad de fluorescencia (%). (A) 1 hora de exposición a MA, (B) 4 horas de exposición a MA y (C) 24 horas de exposición a MA (\*\* $P < 0,0001$ ). Se muestran medias de 2 experimentos independientes.

### 6.2.3. Ensayo quimioluminiscente de oxidación de Luminol

De forma similar a los ensayos anteriores, en una primera instancia se intentó establecer las condiciones de ensayo para el reactivo luminol. Se realizaron 2 ensayos, *in vitro* con CP y MA, en los cuales no se logró alcanzar buena precisión ni confiabilidad de los resultados debido a la gran varianza interensayo. Por lo cual los no se muestran los resultados obtenidos con esta técnica.

## 7. Discusión y conclusión

Los plaguicidas son sustancias tóxicas intencionalmente liberadas al ambiente con la finalidad de mitigar una plaga. En la exposición aguda a OFs, su toxicidad resulta de la inhibición irreversible de la actividad de AChE, la cual favorece la acumulación de ACh y su consecuente efecto sobre los receptores nicotínicos y muscarínicos. En la exposición subcrónica y crónica, la inducción de estrés oxidativo por OFs ha sido reportado como el principal mecanismo de toxicidad (Ranjbar *et al.*, 2005).

La inducción de estrés oxidativo en animales y humanos, asociada a un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno y peroxidación lipídica, también ha sido observada en la exposición aguda a OFs (Abdollahi *et al.*, 2004; Mehta *et al.*, 2009; Soltaninejad y Abdollahi, 2009), como así también depleción de las defensas antioxidantes y deficiencia de la función enzimática antioxidante (Banerjee *et al.*, 1999; Chiapella *et al.*, 2013). En este sentido, ha sido reportado que los OFs pueden tanto incrementar la producción de EROs como atenuar la defensa antioxidante.

Las EROs podrían ser generadas como resultado del metabolismo de los OFs por la familia de enzimas metabolizantes citocromo P450 (CYP). Las CYP son monooxigenasas que mediante un sistema de transporte de electrones, catalizan la adición de un átomo de oxígeno al OFs oxidándolo (Chambers *et al.*, 2001). En el transcurso de esta reacción se generan EROs, las cuales pueden modificar la homeostasis redox del organismo, alterando la actividad de las enzimas de la defensa antioxidante (Banerjee *et al.*, 1999; Vidyasagar *et al.*, 2004). Otro de los mecanismos propuestos inducido por OFs, que favorece la generación de EROs, es el mayor consumo energético celular acoplado a una inhibición de la fosforilación oxidativa (Milatovic *et al.*, 2006), con la consecuente liberación de glucosa a la sangre mediante la glucogenolisis hepática para sostener el consumo de ATP por el requerimiento energético del organismo (Rahimi *et al.*, 2007).

En este trabajo de tesis demostramos que la exposición de trofoblastos a los OFs metilazinfos (MA) y clorpirifos (CP), induce la formación de EROs. Nuestros resultados indican que cuando la línea celular trofoblástica JEG-3 se expone a bajas concentraciones de los insecticidas MA y CP, tanto a tiempos

cortos (1 h) como prolongados (4 y 24 h), se ve estimulada la producción de EROs significativamente. Asimismo, al ensayarse la mayor concentración con DCF-DA, no se observaron cambios en los niveles de EROs. Estos resultados, en principio contradictorios, podrían deberse a una modulación diferencial dependiente de la concentración del plaguicida, ya sea en el metabolismo productor de EROs o en la defensa antioxidante, lo que podría variar la clase de EROs determinada. En un estudio realizado por Chiapella *et al.* (2013) se demostró que cuando la línea celular JEG-3 se expone a CP (50 y 100  $\mu\text{M}$ ) por 24 h se altera la defensa antioxidante. Los autores hallaron un aumento significativo en la actividad de catalasa (CAT), una enzima importante en la defensa antioxidante que regula los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El aumento en la actividad indicaría que CAT se induce para contrarrestar las EROs generadas. Por otra parte estos autores también observaron reducciones en los niveles de glutatión reducido (GSH), evidenciando que el sistema antioxidante celular no enzimático está reaccionando con las EROs, posiblemente para mitigar los altos niveles EROs. Estos hallazgos, que indican la inducción de una fuerte respuesta antioxidante a 24 hs (Chiapella *et al.* 2013), podrían explicar la razón por la cual a 24 hs, y a 100  $\mu\text{M}$  CP, no se observaron diferencias significativas en los niveles de EROs respecto de las células control. De manera similar, en la exposición con MA se modularía el balance redox celular dependiendo de la concentración y tiempo de exposición.

Considerando que las EROs son partículas inestables y altamente reactivas, ya que poseen uno o más electrones no apareados, buscan su estabilidad energética atacando moléculas cercanas para obtener otro electrón, y de esta forma dañan su estructura y función molecular. Todas las biomoléculas grandes, tales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos pueden ser blanco de los radicales libres, pero entre ellos los lípidos son probablemente los más susceptibles a este ataque. El ADN es una de las biomoléculas ricas en electrones que son blanco frecuente de EROs. En nuestro grupo de trabajo recientemente se demostró que dos de los OFs utilizados en la zona (fosmet y CP) inducen apoptosis en la línea celular JEG-3 (Guiñazú *et al.*, 2012), sugiriendo que las perturbaciones en el balance oxidativo observado en esta tesis podría relacionarse con la inducción de

muerte celular de trofoblastos. En un estudio realizado con homogenatos de placentas de mujeres residentes en sitios de aplicación intensiva de plaguicidas se vio disminuida significativamente la actividad de catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX) como resultado de la exposición crónica a OFs (Chiapella *et al.*, 2010), lo que indicaría que a medida que el desbalance oxidativo por la exposición crónica a OFs es sostenido se altera la defensa antioxidante. En este sentido en intoxicaciones agudas, subcrónicas y crónicas con OFs en humanos, se han reportado efectos de EROs sobre diferentes biomoléculas (Ranjbar *et al.*, 2005). No obstante, las concentraciones y actividad de antioxidantes decaen en intoxicaciones agudas (como las ensayadas en el presente trabajo) y luego aumentan si la duración de la exposición alcanza valores de exposición subcrónicas, pero en exposiciones crónicas la capacidad antioxidante decae nuevamente (Lukaszewicz-Hussain, 2010). Por otra parte, Mehta *et al.* (2009) demostraron en cerebro e hígado de ratas expuestas a CP un incremento dosis-dependiente en las concentraciones de EROs, generando estrés oxidativo, lo cual puede contribuir a la toxicidad de este compuesto.

Considerando que la placenta expresa distintas isoformas de las enzimas metabolizantes CYP (Myllynen *et al.*, 2007) y que el metabolismo de OFs mediado por estas, puede actuar como fuente de generación de EROs (Saulsbury *et al.*, 2008), una expresión diferenciada de esta familia de enzimas en el trofoblasto podría ser la causante de las diferencias observadas en los niveles de EROs determinados a distintos tiempos de incubación. De acuerdo a Espinoza (2014), en la línea celular JEG-3, CP sería bioactivado y detoxificado lentamente mostrando así sus efectos colinérgicos en exposiciones prolongadas. Mientras que MA sería rápidamente bioactivado, pero también detoxificado en cortos periodos de tiempo, manifestando sus efectos colinérgicos más rápidamente que CP. Sánchez *et al.* (2014) observaron que, en condiciones basales, las células JEG-3 expresan niveles detectables de ARNm de CYP2B6, CYP2C19, CYP1A2, CYP3A4. Asimismo, luego de la exposición de esta línea celular a CP, observaron una inducción de la expresión relativa de las CYP2C19, 2B6 y 3A4 a concentraciones de 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$  a las 8 h de incubación, respecto de los controles (DMSO). En el caso de CYP1A2, la inducción se produjo a las mismas concentraciones pero a un

tiempo de exposición más prolongado (24 h). Según Mutch y Williams (2006), las isoformas CYP2B6 y 3A4 serían algunas de las más eficientes en la bioactivación hacia el metabolito CP-oxón. Mientras que en el caso de MA, de acuerdo a Buratti *et al.* (2003), la importancia en la formación del oxón dependería de la concentración del insecticida parental, observando que a concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  participaban principalmente las isoformas CYP1A2 y 2B6. Mientras que a concentraciones más elevadas (250  $\mu\text{M}$ ) la isoforma 3A4 revestía mayor importancia. La actividad de distintas isoformas de CYP, podría tener un importante rol en la generación de EROs. Como se mencionó anteriormente, la bioactivación y detoxificación de estos xenobióticos consiste en una fuente de generación de dichas especies reactivas. Kappers *et al.* (2001) establecen que las distintas isoformas de esta enzima poseen distintas capacidades de bioactivación e inactivación de OFs, dependiendo principalmente de la orientación del grupo P=O. En conjunto, la expresión de distintas isoformas CYP así como su preferencia por distintas conformaciones moleculares del OFs y la dependencia de su actividad con la concentración del OFs podrían explicar el por qué se observa una inducción diferencial de EROs en las condiciones estudiadas.

Fisiológicamente en la placenta saludable ocurre un incremento en los niveles de EROs debido a una alta actividad metabólica por el requerimiento energético durante el progreso del gestación (Myatt y Cui, 2004). Asimismo este incremento es acompañado por un incremento en la protección antioxidante (actividad de SOD, CAT y GPX) lo que mantiene el balance oxidativo dentro de parámetros saludables (Coughlan *et al.* 2004). En un escenario donde el estrés oxidativo se encuentra anormalmente incrementado puede ocurrir daño tanto a la madre como al feto. En el transcurso de los últimos 20 años se ha reconocido que el desbalance oxidativo en la placenta se relaciona estrechamente con diversas patologías del embarazo como diabetes gestacional, aborto espontáneo, pérdidas de embarazo recurrente idiopática, defectos en la embriogénesis, teratogenicidad inducida por drogas, preeclampsia, restricción en el crecimiento intrauterino. Como así también futuras enfermedades en el adulto como obesidad, diabetes e hipertensión (Burton *et al.*, 2009, Burton *et al.*, 2010; Shibata *et al.*, 2010; Theuerkauf *et al.*,

2010; Poston *et al.*, 2011; Tuuli *et al.*, 2011). Debido a que las EROs difunden libremente a través de la membrana celular podrían alcanzar otros tipos celulares presentes en la placenta (fibroblastos, células endoteliales). En particular, referido a las células endoteliales de la placenta, se conoce que la vasculatura umbilico-placentar tiene la capacidad de responder a variaciones en el ambiente materno fetal. En algunas ocasiones la respuesta de la vasculatura al estrés oxidativo puede generar disfunción endotelial y restricción en el desarrollo y crecimiento fetal (Herrera *et al.*, 2014).

Por otro lado, otro de los objetivos de este trabajo fue estudiar y analizar el comportamiento de distintos métodos de detección de especies reactivas de oxígeno. En este sentido se emplearon tres técnicas distintas, basadas en diferentes fundamentos: técnica colorimétrica de reducción del NBT, técnica de fluorescencia con DCFH-DA y quimioluminiscencia con luminol. Dada la amplia variedad de especies químicas que forman parte de las EROs, es que resulta importante conocer las ventajas y desventajas de las técnicas disponibles para ensayar la producción de EROs en sistemas biológicos.

La producción de especies reactivas de oxígeno suele comenzar con la formación de anión superóxido, el cual puede actuar como agente reductor frente a determinadas sustancias, por ejemplo tiene la capacidad de reducir al compuesto NBT (Halliwell y Gutteridge, 2007). Choi *et al.* (2006) indican que la técnica de reducción del NBT es simple, sensible y cuantitativa, lo cual se pudo comprobar en este trabajo de tesis. Estos autores atribuyen la reducción del NBT principalmente a  $O_2^{\cdot-}$ , no obstante no descartan que otras EROs puedan estar involucradas en este proceso por lo que suelen considerarlo como una medición global de la producción de EROs.

Otro ensayo comúnmente empleado para determinar EROs es la oxidación DCFH-DA. Este compuesto tiene la capacidad de entrar en la célula y acumularse principalmente en el citosol, donde es deacetilado por esterasas a DCFH y así ser convertido por varios EROs en DCF, el cual posee propiedades fluorescentes (Halliwell y Gutteridge, 2007). Esta técnica ha sido ampliamente utilizada como marcador de estrés oxidativo, reflejando el estado redox de distintos tipos celulares (Myhre *et al.*, 2003; Wang y Joseph, 1999). No obstante, Halliwell y Gutteridge, (2007) indican que esta técnica no podría

medir anión superóxido ni peróxido de hidrógeno directamente ya que no oxidan rápidamente al DCFH. En conclusión no está totalmente establecido cuáles especies reactivas son responsables de la oxidación de DCFH a DCF. No obstante esta técnica tendría la capacidad de determinar  $RO\cdot$ ,  $RO_2\cdot$ ,  $CO_3^{\cdot-}$  y  $OH\cdot$ , pudiendo consistir en una técnica de menor especificidad en comparación con el ensayo de reducción del NBT, lo cual se puso de manifiesto en los resultados observados en este trabajo. Por lo tanto es un ensayo de detección de EROs global (Halliwell y Gutteridge, 2007; Myhre *et al.*, 2003), consistiendo en un método sencillo y eficiente pudiendo ser adaptado a diversos tipos celulares (Wang y Joseph, 1999).

Por último, el ensayo de quimioluminiscencia con luminol es otra técnica que, según la bibliografía, es frecuentemente utilizada para ensayar la producción de especies reactivas de oxígeno (Bylund *et al.*, 2010). El uso de la misma para determinar anión superóxido es relativamente problemático, ya que el luminol no reaccionaría directamente con éste, dado que debería ser previamente oxidado, lo que podría ocurrir en presencia de  $OH\cdot$ ,  $ONOO\cdot$ ,  $HOCl$  o  $H_2O_2$  (Myhre *et al.*, 2003). Debido a que la química relacionada a esta técnica es algo compleja, es que su validez es algo criticada (Halliwell y Gutteridge, 2007). Según Myhre *et al.* (2003) la técnica en cuestión dependería del sistema mieloperoxidasa- $H_2O_2$ - $Cl^-$ , ya que observaron que en neutrófilos la luminiscencia disminuyó cuando en el cultivo celular fue incubado con inhibidores de mieloperoxidasa y superóxido dismutasa. En este modelo no se pudieron obtener resultados reproducibles por lo que consideramos que no es la técnica adecuada para analizar producción de especies reactivas en células JEG-3.

En conclusión, este trabajo de tesis permitió demostrar que los insecticidas OF metilazinfos y clorpirifos inducen la producción de EROs en el trofoblasto y que el estrés oxidativo consistiría en uno de los mecanismos asociados a la toxicidad de estos xenobioticos. Además, debido a la diversidad de especies que conforman las EROs y las especificidades de cada técnica empleada para determinarlas, la detección de las mismas en sistemas biológicos debería consistir en la combinación de diversos métodos. No obstante el ensayo de reducción del NBT resultó ser la técnica más sencilla y

reproducibile para analizar la producción de EROs en este modelo, mientras que la técnica de oxidación de luminol no resultó adecuada para tal fin.

## 8. Bibliografía

- ABDOLLAHI M., RANJBAR A., SHAHIN S., NIKFAR S. y REZAIE A., 2004. Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit* 10(6): 141-147.
- ANGUIANO O.L., MONTAGNA M.C., FERRARI A., SOLEÑO J., LASCANOC.I., LLOEWY R.M., PECHÉN DE D'ANGELO A.M. Y MAGNARELLI G.G., 2011. Clasificación y toxicología de plaguicidas. Ed. Educo.
- ARAGON ANZURES A., MARTÍNEZ AMEZCUA E.M.P. y MÉNDEZ C.H., 2010. Placenta. Departamento de embiología proyecto docente.
- BADI M. H. y LANDEROS J, 2007. Plaguicidas que afectan a la salud humana y la sustentabilidad. *CULCyT//Toxicología de Plaguicidas* 19: 21-34.
- BEDARD K. y KRAUS K., 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87: 245-313.
- BELTAMIRANO D., BOSSIO J.C., CALLAGHAN S., CORRA L., GONZALEZ C., LENARDÓN A., LONGERICH L. y MONTI V., 2008. La salud ambiental de la niñez en la Argentina: evaluación de la exposición a plaguicidas organofosforados en niños de colonos tabacaleros. *Sociedad Argentina de Pediatría*. Pp.: 11-20.
- BANERJEE B.D., SETH V., BHATTACHARYA A., PASHA S.T. y CHAKRABORTY A.K., 1999. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and freeradical scavengers. *Toxicol Lett* 107: 33-47.
- BENIRSCHKE K.,KAUFMANN P. y BEARGEN R., 2006. Pathology of the human placenta.5° edición. Ed.Springer.
- BEVILACQUA E., ZAGO GOMES S., RODRIGUES LORENZON A., SANDRA HOSHIDA M. y AMARANTE-PAFFARO A.M., 2012. NADPH oxidase as an important source of reactive oxygen species at the mouse maternal-fetal interface: putative biological roles. *Reproductive BioMedicine Online* 25: 31- 43.
- BHALLI J., ALI T., ASI M., CEPPI M., KHALID Z. y KHAN Q., 2002. DNA damage in pakistani agricultural workers exposed to mixture of pesticides. *Environmental Molecular Mutagen* 50: 37-45.

- BURATTI F.M., VOLPE M.T., MENEGUZ A., VITTOZZI L. y TESTAI E., 2003. CYP-specific bioactivation of four organophosphotioate pesticides by human liver microsomes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 186: 143-154.
- BURTON G.J., JAUNIAUX E. y CHARNOCK-JONES D.S., 2010. The influence of the intrauterine environment on human placental development. *Int J Dev Biol.* 54: 303-12.
- BURTON G.J., YUNG H.W., CINDROVA-DAVIES T. y CHARNOCK-JONES D.S., 2009. Placental endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in the pathophysiology of unexplained intrauterine growth restriction and early onset preeclampsia. *Placenta* 30 Suppl A: 43-48.
- BYLUND J., BROWN K.L., MOVITZ C., DAHLGREN C. y KARLSSON A., 2010. Intracellular generation of superoxide by the phagocyte NADPH oxidase: How, where and what for? *Free Radical Biology* 49: 1834-1845.
- CECCHI A., ROVEDATTI M.G, SABINO G.A. y MAGNARELLI G.G., 2012. Environmental exposure to organophosphate pesticides: assessment of endocrine disruption and hepatotoxicity in pregnant women. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80: 280-287.
- CHAMBERS J.E., CARR R.L., BOONE S. y CHAMBERS H.W., 2001. The metabolism of organophosphorus insecticides. *Handbook of Pesticide Toxicology*, Ed. II, Academic Press, USA 2 pp: 919–927.
- CHIAPELLA G., FLORES-MARTÍN J., RIDANO M.E., REYNA L., MAGNARELLI DE POTAS G., PANZETTA-DUTARI G.M. y GENTIRAIMONDI S., 2013. The organophosphate chlorpyrifos disturb redox balance and triggers antioxidant defense mechanism in JEG-3 cells. *Placenta* 34: 792-798.
- CHIAPELLA G., VERA B. y GENTI RAIMONDI S. y MAGNARELLI G., 2010. Impacto de la exposición ambiental a organofosforados en la defensa antioxidante de placenta humana. Libro de resúmenes del III Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental.
- CHIHUAILAFF R.H., CONTRERAS P.A. y WITTWER F.G., 2002. Patogénesis del estrés oxidativo: consecuencias y evaluación en la salud animal. *Vet. Mex.* 33 (3): 265-283.

- CHOI H.S.; KIM J.W.; CHA Y. y KIM K. (2006): A Quantitative Nitroblue Tetrazolium Assay for Determining Intracellular Superoxide Anion Production in Phagocytic Cells. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 27(1): 31-44
- CICHÓN L., ROSSINI M. y GARRIDO S., 2013. Guía para el diseño de programas fitosanitarios en manzanos – Temporada 2012-2013. INTA, EEA Alto Valle.
- COSTA L.G., 2006. Current issues in organophosphate toxicity. *Clinica Chimica Acta* 366: 1-13.
- COUGHLAN M.T., VERVAART P.P., PERMEZEL M., GEORGIU H.M. y RICE G.E., 1994. Altered placental oxidative stress status in gestational diabetes mellitus. *Placenta* 25: 78-84.
- DE LA TORRE BINIMELIS R., 1994. Determinación de la Actividad de Superóxido Dismutasa en Poblaciones Humanas Normales y Patológicas. Tesis doctoral. Madrid, España.
- ELERSEK T. Y FILIPIC M., 2011. Organophosphorous pesticides – Mechanisms of their toxicity, *Pesticides – The impact of pesticides exposure*, Prof Margarita Stoytcheva (Ed.). InTech, disponible online: <http://www.intechopen.com/books/pesticides-the-impacts-of-pesticides-exposure/ohrgabophosphorous-pesticides-mechanisms-of-their-toxicity> (08/01/2015)
- ESFERANDI N., SHARMA K. S., SALEH R. A., THOMAS A. J. y AGARWAL A., 2003. Utility of the Nitroblue Tetrazolium Reduction Test for Assessment of Reactive Oxygen Species Production by Seminal Leukocytes and Spermatozoa. *Journal of Andrology*, 24, No. 6
- ESPINOZA M., 2014. Caracterización de enzimas biomarcadoras de exposición a plaguicidas organofosforados en la línea celular humana JEG-3. Tesis de grado. Universidad Nacional del Comahue.
- FORBES K. y WESTWOOD M., 2010. Maternal growth factor regulation of human placental development and fetal growth. *Journal of Endocrinology* 207: 1-16.

- GARRIDO A.M., 2007. El peróxido de hidrógeno como mediador en el proceso de contracción-relajación. Estudios in vitro e in vivo. Tesis doctoral. Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá.
- GOMES A., FERNANDES E. y LIMA J.F.C.J., 2005. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. J. Biochem. Biophys. Methods 65: 45-80.
- GUIÑAZÚ N., RENA V., GENTI-RAIMONDI S., RIVERO V. y MAGNARELLI G., 2012. Effects of the organophosphate insecticides phosmet and chlorpyrifos on trophoblast JEG-3 cell death, proliferation and inflammatory molecule production. Toxicology in Vitro 26: 406-413.
- GUIÑAZÚ N. y MAGNARELLI G.G., 2012. Placental toxicology of pesticides. Capítulo 5.
- HALLIWELL B. y GUTTERIDGE J.M.C., 2007. Free radicals in biology and medicine. 4° Ed. Ed. Oxford
- HARLEY K.G., HUEN K., SCHALL R.A., HOLLAND N.T., BRADMAN A., BARR D.B. y ESKENAZI B., 2011. Association of organophosphate pesticide exposure and paraoxonase with birth outcome in Mexican\_american women. PLoS One 6 (8): 1-10.
- HERRERA E.A., KRAUSE B., EBENSPERGER G., REYES R.V., CASANELLO P., PARRA-CORDERO M. y LLANOS A.J., 2014. The placental pursuit for an adequate oxidant balance between the mother and the fetus. Frontiers in pharmacology 149 (5): 1-10.
- HOANG D.Q. y. PFEFFERKORN L.C., 2002. Luminol-enhanced assay for superoxide anion ( $O_2^-$ ). Disponible on-line: <http://www.biocompare.com/Application-Notes/41985-Luminol-enhanced-Assay-For-Superoxide-Anion-O2/> (31/10/2014).
- KAPPER W.A., EDWARDS R.J. MURRAY S. y BOOBIS A.R., 2001. Diazinon is activated by CYP2C19 I human liver. Toxicol. Appl. Pharmacol 177: 68-76.
- KOBAYASHI H., GIL-GUZMAN E., MAHRAN A.M., SHARMA R.K., NELSON D.R., THOMAS JR A.J. y AGARWAL A., 2001. Quality control of reactive oxygen species measurement by luminal-dependant chemiluminescence assay. Journal of Andrology 22 (4): 568-574.

- LANGMAN, 2009. Embiología médica. 11° Edición.
- LEVARIO-CARRILLO M., OLAVE M.E., CHÁVEZ CORRAL D., GUTIÉRREZ ALDERETE J., GAGIOTI S.M. y BEVILACQUA E., 2004. Placental morphology of rats prenatally exposed to methyl parathion. *Exp Toxic Pathol* 44: 489-496.
- LEVARIO-CARRILLO M., OSTROSKY WEGMAN M., AMATO D., OSTROSKY WEGMAN P., GONZÁLES HORTA C., CORONA Y. y SANIN L.H., 2004. Relation between pesticide exposure and intrauterine growth retardation. *Chemosphere* 55 (10): 1421-1427.
- LI Q., 2007. New mechanism of organophosphorus pesticide-induced immunotoxicity. *J Nippon Med Sch* 74 (2): 92-105.
- LOEWY R. M., MONZA L. B., KIRS V. E. y SAVINI M., 2011. Pesticide distribution in an agricultural environment in Argentina, *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* 46 (8): 662-670.
- LOMBARDO P., 2011. Exposición ambiental a plaguicidas organofosforados: impacto sobre la actividad de arginasa y ornitina decarboxilasa. Tesis de grado. Universidad Nacional del Comahue.
- LUKASZEWIC-HUSSAIN A. 2010. Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity – Short review. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 98: 145-150.
- MAGNARELLI G.G. y GUIÑAZÚ N., 2012. The human placenta. Placental toxicology of pesticides. Ed. In Tech. p.: 95-118.
- MAGNARELLI G.G., GUIÑAZÚ N. y ROVEDATTI M.G., 2014. Plaguicidas en la vida intrauterina: mecanismos toxicológicos involucrados en los efectos a corto y largo plazo. *Ciencia e investigación* 64 (5): 23-38.
- MEHTA A., VERMA R.S. y SRIVASTAVA N., 2009. Chlorpyrifos induced alterations in the levels of hydrogen peroxide, nitrate and nitrite in rat brain and liver. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 94: 55-59.
- MILATOVIĆ D., GUPTA R.C. y ASCHNER M., 2006. Anticholinesterase toxicity, oxidative stress. *Sci. World J.* 6: 295–310.
- MORELL I., CANDELA L., 1998. Comportamiento de los plaguicidas en suelos y aguas. *Plaguicidas: aspectos ambientales, analíticos y toxicológicos.* Pp: 9-23.

- MUNIZ J.F., MCCAULEY L., SCHERER J., LASAREV M., KOSHY M., KOW Y.W., NAZAR STEWART V. y KISBY G.E., 2008. Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: a pilot study. *Toxicol Appl Pharmacol* 227(1): 97-107.
- MUTCH E. y WILLIAMS F.M., 2006. Diazinon, chlorpyrifos and parathion are metabolized by multiple cytochromes P450 in human liver. *Toxicology* 224: 22-32.
- MYATT L. y CUI X., 2004. Oxidative stress in placenta. *Histochem Cell Biol.* 122(4): 369-382.
- MYLLYNEN P., PASANEN M. y PELKOKEN O., 2005. Human placenta: a human organ for developmental toxicity research and biomonitoring. *Placenta* 26 (5): 361-371.
- MYLLYNEN P., PASANEN M., y VÄHÄKANGAS K., 2007. The fate and effects of xenobiotics in human placenta. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 3(3): 331-346.
- NAVARRO GARCIA S. y BARRA NAVARRO A., 1995. Comportamiento de los plaguicidas en el medio ambiente. Departamento de Química Agrícola, Geológica y Edafología. Facultad de Química, Universidad de Murcia. *Hojas divulgadoras*, Núm. 9.
- NOUIRA S., FEKRI A., SOUHEIL E., RAFIK B. y SLAH B., 1994. Prognostic value of serum cholinesterase in organophosphate poisoning. *Chest* 106 (6): 1811-1814.
- PALACIOS NAVA M.E., PAZ ROMÁN P., HERNÁNDEZ-ROBLES S. y MENDOZA ALVARADO L., 1999. Sintomatología persistente en trabajadores industrialmente expuestos a plaguicidas organofosforados. *Salud Pública Mex* 41 (1): 55-61.
- PEÑA, C.E.; CARTER D.E. y AYALA-FIERRO F., 2001. Toxicología Ambiental: evaluación de riesgos y restauración ambiental. Universidad de Arizona.
- PÉREZ VAZQUÉZ A. y LANDEROS SÁNCHEZ C., 2009. Agricultura y deterioro Ambiental. *Elementos* 73:19-25.

- POSTON L., IGOSHEVA N., MISTRY H.D., SEED P.T., SHENNAN A.H., RANA S., *et al.*, 2011. Role of oxidative stress and antioxidant supplementation in pregnancy disorders. *AmJ Clin Nutr.* 94: 1980-1985.
- QUEREJETA G.A.; RAMOS L.M.; FLORES A.P.; HIGHES E.A.; ZALTS A. y MONTSERRAT J.M., 2012. Environmental pesticide distribution in horticultural and floricultural periurban production units. *Chemosphere* 87: 566-572.
- RAHIMI R. Y ABDOLLAHI M., 2007. A review on the mechanisms involved in hyperglycemia induced by organophosphorus pesticides. *Pesticide Biochem. Physiol.* 88: 115–121.
- RAMÍREZ, J.A. y LACASAÑA M., 2001. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. Instituto Nacional de Salud Pública. *Arch Prev Riesgos Labor;* 4 (2): 67-75.
- RANJBAR A., SOLHIB H., MASHAYEKHIB F. J., SUSANABDIB A., REZAIEC A. y ABDOLLAHID M., 2005. Oxidative stress in acute human poisoning with organophosphorus insecticides; a case control study. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 20: 88–91.
- REGNAULT T.R., ANTHONY R.V., GALAN H.L. y PARKER T.A., 2002. Placental development in normal and compromised pregnancies. *Review* 23: 29-119.
- ROHLMAN D.S., ANGER W. K. y LEIN P. J., 2011. Correlating neurobehavioral performance with biomarkers of organophosphorus pesticide exposure. *NeuroToxicology* 34: 268-276
- SÁNCHEZ M.M. y SÁNCHEZ CAMAZANO J.M., 1985. Los plaguicidas. Adsorción y evolución en el suelo. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología. Temas de Divulgación. Primera edición.
- SANCHÉZ V.G., GOMEZ D.S., GUIÑAZÚ N. y SABINO G., 2014. Inducción de la transcripción de enzimas metabolizantes citocromo p450 en trofoblastos por la exposición a clorpirifos. Libro de resúmenes de resúmenes del V Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental.

- SAULSBURY M.D., HEYLIGER S.O., WANG K. y ROUD D., 2008. Characterization of chlorpyrifos apoptosis in placental cells. *Toxicology* 224: 98-110.
- SHIBATA M., HAKUNO F., YAMANAKA D., OKAJIMA H., FUKUSHIMA T., HASEGAWA T., *et al.*, 2010. Paraquat-induced oxidative stress represses phosphatidylinositol 3-kinase activities leading to impaired glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.*285: 20915-25.
- SOLTANINEJAD K y ABDOLLAHI, 2009. Current opinioin on the science of organophosphate pesticides and toxic stress: a systematic review. *Med Sci Monit* 15(3): 75-90.
- SOUZA M.S., 2005. Identificación de biomarcadores de exposición a plaguicidas en placenta humana. Tesis de grado. Universidad Nacional del Comahue.
- SOUZA M.S., CRUZ S.S., MAGNARELLO G.G., PECHEN DE D'ANGELO A.M. y DOVEDATTY M.G., 2005. Prenatal exposure to pesticide: analysis of human placental acetylcholinesterase, glutathine sS-transferase and catalase as biomarkers of effect. *Biomarkers* 10 (5): 89-376.
- TANG C., LIANG J., QIAN J., JIN L., DU M., LI M. y LI D., 2014. Opposing role of JNK-p38 kinase and ERK1/2 in hydrogen peroxide-induced oxidative damage of human trophoblast-like JEG-3 cells. *Int J Clin Exp Pathol* 7(3):959-968
- THEUERKAUF R.S., AHAMMER H., SIWETZ M., HELIGE C., DOHR G., WALCHER W., *et al.*, 2010. Measurement of cell death by oxidative stress in three-dimensional spheroids from trophoblast and in fragments of decidua tissue. *J Reprod Immunol.* 85: 63-70.
- TUNC O., THOMPSON J. Y TREMELLEN K., 2010. Development of the NBT assay as a marker of sperm oxidative stress. *International Journal of Andrology* 33, 13–21.
- TUULI M.G., LONGTINE M.S. y NELSON D.M., 2011. Review: oxygen and trophoblast biology—a source of controversy. *Placenta.* 32(2): 109-118.

- VERA B., 2010. Esterasas y composición lipídica de la placenta humana en la exposición ambiental a plaguicidas organofosforados. Tesis de maestría. Universidad Nacional del Comahue.
- VERA B, SANTA CRUZ S. y MAGNARELLI G.G., 2012. Plasma cholinesterase and carboxylesterase activities and nuclear and mitochondrial lipid composition of human placenta associated with maternal exposure to pesticides. *Reprod Toxicol* 34(3): 402-407.
- VIDYASAGAR J., KARUNAKAR N., REDDY M.S., RAJNARAYANA K., SURENDER T. y KRISHNA D.R., 2004. Oxidative stress and antioxidant status in acute organophosphorous insecticide poisoning. *Indian J. Pharmacol.* 36: 76–79.
- WANG H. y JOSEPH J.A., 1999. Quantifying celular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biology & Medicine* 27: 612-616.
- WESSELING C., AHLBOM A., HOGSTEDT C., JAI-DONG M., KEIFER M.D., McCONEELL R. y ROSENSTOCK L., 2002. Long-term neurobehavioral effects of mild poisoning with organophosphate and n-methyl carbamate pesticide among banana workers. *Int J Occup Environ Health* 8: 27-34.
- WHITEMAN M.; DOGRA Y.; WINYARD P.G. y ARMSTRONG J. S., 2008. Chapter 3: Detection and Measurement of Reactive Oxygen Intermediates in Mitochondria and Cells. *Methods in Molecular Biology, Redox-Mediated Signal Transduction*, vol. 476.
- YANG Y, PARSON K.K., MALAKAUSKAS S.M. y LE T.H., 2009. Glutathione S-Transferase regulates vascular smooth muscle cell proliferation, migration and oxidative stress. *Hypertension* 54 (6): 1360-1368.
- ZAPPA N., 2014. Exposición a plaguicidas organofosforados: modulación de la expresión de receptores Tipo Toll. Tesis de grado. Universidad Nacional del Comahue.

## 9. Anexo

### 9.1. Preparación buffer fosfato salino (PBS)

#### Materiales

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  anhidro 2,3 g
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  anhidro 11,5 g
- NaCl 90 g
- Agua destilada

#### Procedimiento

Para las cantidades de sal necesarias, disolver y llevar a volumen necesario, manteniéndolo en agitador. El pH final debe ser igual a 7,4. El en caso de que el pH sea inferior a este valor, se regula empleando solución de NaOH 2N.