

**EVALUACIÓN DEL ESTADO REDOX EN PLACENTA
HUMANA:**

**MECANISMOS DE RESPUESTA AL ESTRÉS OXIDATIVO
GENERADO POR EXPOSICIÓN A ORGANOFOSFORADOS**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS**

BIOQUÍMICA GRACIELA CHIAPELLA

Director de tesis por la Universidad Nacional de Córdoba

Dra. Susana Genti-Raimondi

Director de tesis por la Universidad Nacional del Comahue

Dra. Gladis Magnarelli



**Departamento de Bioquímica Clínica
CIBICI - CONICET
Facultad de Ciencias Químicas
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

**Facultad de Ciencias Médicas
IDEPA- CONICET
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE**

Córdoba, 2014

Director de tesis por la Universidad Nacional de Córdoba:

Dra. Susana Genti-Raimondi

Director de tesis por la Universidad Nacional del Comahue:

Dra. Gladis Magnarelli

Comisión de Tesis:

Dra. Graciela Panzetta-Dutari

Dra. Miriam Virgolini

Dr. Andrés Venturino

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos los que contribuyeron a la realización de esta tesis.

A mi directora de tesis por la Universidad Nacional del Comahue, Gladis Magnarelli, quien me incorporó a sus proyectos de investigación y me dió la oportunidad de realizar esta tesis.

A la Facultad de Ingeniería de esa universidad, por el lugar de trabajo.

A la Universidad Nacional de Córdoba y a mi directora de tesis por esa universidad, Susana Genti- Raimondi, que me abrió las puertas del laboratorio, confió en mí y me incentivó para llevar adelante este trabajo.

A Graciela Panzetta-Duttari, por sus aportes y permanente buena disposición.

A Miriam Vergolini, por sus aportes en cada reunión de tesis.

A los integrantes del laboratorio CIBICI en especial a Magalí Ridano, Luciana Reyna Viviana Rena y Ana Racca por ayudarme toda vez que lo solicité.

Quiero agradecer muy especialmente a Jesica Flores por su predisposición, paciencia y ayuda permanente que facilitaron mi trabajo experimental en ese laboratorio.

Al personal del laboratorio Libiquima, en especial a Enrique Rosenbaum por ayudarme a solucionar inconvenientes técnicos surgidos en el laboratorio.

A mis compañeras de medicina Berta Vera, por poder contar con ella a través de estos años y a Susana Sanchez por alentarme permanentemente a seguir.

A Guillermo Sabino, por su contribución al análisis estadístico de los datos.

Al personal del servicio de Obstetricia del Hospital Castro Rendón de la ciudad de Neuquén y al director del Hospital de General Roca, por permitir la obtención de muestras y datos para la realización de este trabajo. Especialmente quiero agradecer a Carina Romero, obstétrica del Hospital de Roca que en forma desinteresada y con especial cuidado seleccionó las muestras.

A los integrantes de la comisión de tesis por la corrección detallada del manuscrito.

A mi amiga Marta, por hacer mis estadías en Córdoba más placenteras.

A Raúl, por su apoyo incondicional, su paciencia y por respetar mis tiempos.

Y finalmente a mis padres, por sus principios.

ÍNDICE

	Pág.
ABREVIATURAS	8
RESUMEN	11
1 - INTRODUCCIÓN	18
1.1 Plaguicidas	19
1.1.1 Definición	19
1.1.2 Clasificación	19
1.1.3 Plaguicidas organofosforados	20
1.1.3.1 Estructura y propiedades físico-químicas de los organofosforados	21
1.1.3.1.1 Propiedades físico-químicas de clorpirifos	22
1.1.3.2 Dinámica en el medio ambiente	22
1.1.3.3 Situación derivada del uso de plaguicidas en la zona del Alto Valle del Río Negro.	24
1.1.3.4 Exposición a organofosforados	26
1.1.4 Ingreso y distribución de plaguicidas en el organismo	27
1.1.4.1 Ingreso y distribución de plaguicidas durante la vida intrauterina	27
1.1.5 Tejidos involucrados en la detoxificación	28
1.1.6 Metabolización de plaguicidas	29
1.1.6.1 Reacciones de biotransformación de Fase I	29
1.1.7 Blancos de acción de los organofosforados	32
1.1.7.1 Blanco primario: acetilcolinesterasa	32
1.1.7.1.1 Inhibición de la actividad enzimática de acetilcolinesterasa por organofosforados	33
1.1.7.2 Blancos secundarios	34
1.1.7.2.1 Esterasa neuropática	34
1.1.7.2.2 Carboxilesterasas	35
1.1.7.2.3 Otros blancos de acción	37
1.1.8 Utilidad de enzimas blanco como biomarcadores	38

1.1.8.1	Acetilcolinesterasa	39
1.1.8.2	Carboxilesterasa	40
1.2	Estrés Oxidativo	41
1.2.1	Especies derivadas del oxígeno y del nitrógeno	41
1.2.2	Fuentes de especies reactivas	42
1.2.3	Acciones biológicas de las especies reactivas	42
1.2.4	Sistema antioxidante	43
1.2.4.1	Catalasa	44
1.2.4.2	Glutación peroxidasa	44
1.2.4.3	Moléculas no enzimáticas con actividad antioxidante	46
1.2.4.4	Mecanismos adaptativos de la defensa antioxidante	46
1.2.4.4.1	Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)	47
1.2.5	Estrés oxidativo: consecuencias	49
1.2.5.1	Apertura de canales iónicos	50
1.2.5.2	Oxidación de lípidos	50
1.2.5.3	Oxidación de proteínas	52
1.2.5.4	Oxidación de ADN	52
1.3	Placenta	53
1.3.1	Desarrollo	53
1.3.2	Diferenciación del trofoblasto	54
1.3.3	Función de la placenta	56
1.3.4	Enzimas del metabolismo de xenobióticos en placenta	58
1.3.5	Transportadores y bombas de eflujo	58
1.3.6	Sistema colinérgico placentario	59
1.3.7	Mecanismos generadores de especies reactivas	59
1.3.8	Moléculas antioxidantes	60
1.3.9	El rol del oxígeno en la regulación de la invasión del trofoblasto	61
1.3.10	Efectos de los organofosforados en la placenta	63
1.3.11	Patologías del embarazo: sistemas experimentales de estudio	64

2 - HIPÓTESIS	68
3 - OBJETIVOS	70
3.1 Objetivo general	71
3.2 Objetivos específicos	71
4 - MATERIALES Y MÉTODOS	73
4.1 Estudio poblacional	74
4.1.1 Diseño experimental	74
4.1.2 Material biológico: Placenta	75
4.1.3 Determinaciones analíticas en muestras de placenta	75
4.1.3.1 Biomarcador de exposición a organofosforados	76
4.1.3.1.1 Carboxilesterasa	76
4.1.3.2 Biomarcadores del estado redox	77
4.1.3.2.1 Enzimas del sistema antioxidante	77
4.1.3.2.1.1 Catalasa	77
4.1.3.2.1.2 Glutatión peroxidasa dependiente de selenio	77
4.1.3.2.2 Sistema antioxidante no enzimático	79
4.1.3.2.2.1 Glutatión	79
4.1.3.2.3 Biomarcadores de estrés oxidativo	80
4.1.3.2.3.1 Oxidación de lípidos: Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).	80
4.1.3.2.3.2 Oxidación de proteínas: Determinación de grupos carbonilos.	80
4.1.4 Determinación de proteína Nrf2: ensayo de western blot	81
4.1.4.1 Preparación de extractos proteicos	81
4.1.4.2 Preparación de geles	82
4.1.4.3 Transferencia de proteínas a soporte sólido	82
4.1.4.4 Tinción de geles	83
4.1.4.5 Tinción de membranas	83

4.2 Estudio <i>in vitro</i>	84
4.2.1 Línea Célular JEG-3. Cultivo	84
4.2.2 Tratamiento de células JEG-3 con clorpirifos	84
4.2.3 Determinaciones analíticas en células JEG3	85
4.2.3.1 Biomarcador de exposición a organofosforados	85
4.2.3.1.1 Acetilcolinesterasa	85
4.2.3.2 Biomarcadores del estado redox	86
4.2.3.2.1 Sistema antioxidante enzimático	86
4.2.3.2.1.1 Catalasa	86
4.2.3.2.2 Sistema antioxidante no enzimático	86
4.2.3.2.2.1 Glutación	86
4.2.4 Detección de especies reactivas del oxígeno	87
4.2.5 Ensayo de western blot	87
4.2.5.1 Preparación de extractos proteicos	87
4.2.5.2 Detección inmunológica de proteínas transferidas a soporte sólido	88
4.2.6 Purificación de ARN total	88
4.2.7 Reacción de Transcriptasa Reversa (RT)	89
4.2.8 PCR (reacción en cadena de la polimerasa)	89
4.2.8.1 Semi-cuantificación del ADNc	89
4.2.8.2 PCR en tiempo real	90
5 . RESULTADOS	91
5.1 Estudio poblacional	92
5.1.1 Características de la población estudiada	92
5.1.2 Biomarcador de exposición: Actividad de Carboxilesterasa	94
5.1.3 Biomarcadores del estado redox	94
5.1.3.1 Concentración de Glutación reducido	94
5.1.3.2 Actividad de Catalasa y Glutación peroxidasa	95
5.1.3.3 Niveles de TBARS y carbonilación de proteínas	96
5.1.4 Asociación entre biomarcadores de estrés oxidativo y el tiempo de exposición a plaguicidas o la actividad de carboxilesterasa	98

5.1.5 Asociación entre parámetros morfométricos del neonato y la placenta con los diferentes biomarcadores analizados	98
5.1.6 Niveles placentales del factor de transcripción Nrf2	99
5.2 Estudio <i>in vitro</i>	100
5.2.1 Biomarcador de exposición	101
5.2.1.1 Actividad de Acetilcolinesterasa	101
5.2.2 Generación de especies reactivas del oxígeno	102
5.2.3 Sistema de defensa antioxidante	102
5.2.4 Expresión de Nrf2	103
5.2.5 Traslocación nuclear de Nrf2	104
5.2.6 Transcripción de genes de enzimas antioxidantes	106
6 – DISCUSIÓN	109
6.1 Estudio poblacional	109
6.1.1 Limitaciones del estudio	112
6.2 Estudio <i>in vitro</i>	115
7 – CONCLUSIONES	120
8 – ANEXOS	123
9 – BIBLIOGRAFÍA	129

ABREVIATURAS

Ach	acetilcolina
AChE	acetilcolinesterasa
ADN	ácido desoxirribonucleico
ANOVA	análisis de varianza
ARE	elemento de respuesta antioxidante (del inglés, antioxidant response element)
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
BHT	butil-hidroxi-tolueno
BSA	albúmina sérica bovina
CaE	carboxilesterasa
CAT	catalasa
CPF	clorpirifos
CTB	citotrofoblasto
CTBev	citotrofoblasto extravelloso
CTBv	citotrofoblasto veloso
Cu-ZnSOD	superóxido dismutasa dependiente de cobre-zinc
CYP	citocromo P ₄₅₀
DL ₅₀	dosis letal media
DNAc	ácido desoxirribonucleico complementario
DNP	dinitrofenilhidrazona
DNPH	dinitrofenilhidrazina
DTNB	ácido 5,5' ditiobis 2-nitrobenzoico
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
GC	grupo control
GPx	glutación peroxidasa selenio dependiente
GR	glutación reductasa
GSH	glutación reducido
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
hCG	hormona gonadotrofina coriónica
HCl	ácido clorhídrico
HClO ₄	ácido perclórico
HIF1 α	factor inducible por hipoxia alfa (del inglés, hypoxia inducible factor alpha)
HNE	4-hidroxi-2-nonenal
HO	hemooxigenasa
HO [•]	radical hidroxilo
INrf2	inhibitor de Nrf2 (del inglés, inhibitor nuclear factor-erythroid 2-related factor 2)
kDa	kilo dalton
mAChR	receptor muscarínico de acetilcolina
MAPK	proteína quinasa activada por mitógeno (del inglés mitogen-activated protein kinases)
MDA	malondialdehído
MnSOD	superóxido dismutasa dependiente de manganeso
NAC	N-acetil cisteína
nAChR	receptor nicotínico de acetilcolina
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NaHCO ₃	bicarbonato ácido de sodio

NOS	óxido nítrico sintasa
NQO1	quinona óxido reductasa 1 dependiente de NAD(P)H
Nrf2	factor nuclear 2 relacionado al factor eritroideo 2 (del inglés, nuclear factor-erythroid 2-related factor 2)
NTB	2-nitro-5-tiobenzoato
O ₂ ⁻	anión superóxido
OFs	organofosforados
OMS	organización mundial de la salud
OFM	oxidasas de función mixta
PKC	protein kinase C
PP	período de pulverizaciones
PR	período de receso
RE	retículo endoplásmico
ROOH	hidroperóxidos orgánicos
ROS	especies reactivas del oxígeno (del inglés, reactive oxygen species)
SDS	dodecil sulfato de sodio (del inglés, sodium dodecyl sulfate)
-SH	grupo sulfidrilo
SOD	superóxido dismutasa
STB	sinciciotrofoblasto
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (del inglés, reactive thiobarbituric acid substances)
TCA	ácido tricloroacético
TCP	3,5,6-tricloro-2-piridinol
TS	trofoblasto
γGCS	gama glutamil cisteína sintetasa

RESUMEN

RESUMEN

Los plaguicidas organofosforados (OFs) utilizados ampliamente en la producción agrícola, constituyen una clase importante de químicos contaminantes del medio ambiente. La mayoría de las personas están o han sido expuestas a plaguicidas OFs por su uso domiciliario como insecticidas, por la contaminación de alimentos, de cursos acuíferos, por exposición laboral y/o por residir en áreas rurales cercanas a la aplicación de los mismos. Es creciente la preocupación por las consecuencias de la exposición a contaminantes medioambientales en grupos vulnerables como son los representados por mujeres gestantes y niños en desarrollo. La exposición intrauterina puede tener consecuencias adversas para la salud del feto tanto a corto como a largo plazo, de hecho, la toxicología del desarrollo se ocupa de su estudio. Considerando que la estructura y función normal de la placenta es un pre-requisito para el crecimiento y desarrollo del feto y que la placenta es una matriz de utilidad para biomonitorizar el efecto de la exposición a xenobióticos, en este trabajo de tesis se realizaron estudios a los fines de establecer algunos aspectos relevantes relacionados al balance redox en dos modelos de trofoblasto humano: homogenato de placentas provenientes de mujeres ambientalmente expuestas a plaguicidas y la línea celular derivada de coriocarcinoma JEG-3.

Se estudiaron placentas de mujeres gestantes de una población residente en áreas agrícolas recolectadas en períodos de pulverizaciones de plaguicidas (PP) principalmente OFs, durante el período de receso (PR), y de gestantes residentes urbanas consideradas grupo control (GC). La actividad enzimática de carboxilesterasa (CaE), biomarcador sensible a la exposición ambiental a OFs, en placentas recogidas durante el PP disminuyó significativamente un 16,5% comparado con el GC y un 19% respecto a los valores obtenidos en placentas recogidas en el PR. Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas en los marcadores de estrés oxidativo (lipoperóxidos y carbonilación de proteínas) así como en los de defensa antioxidante enzimática (actividad de catalasa -CAT- y de glutatión peroxidasa -GPx-) y no enzimática (nivel de glutatión reducido -GSH-), ni en los niveles del factor nuclear 2 relacionado al factor eritroideo 2 (Nrf2), quien ejerce efectos protectivos contra el daño oxidativo.

La asociación negativa entre la actividad de CAT, observada en las muestras de placentas de gestantes provenientes del grupo PP, y el índice placentario (peso de la placenta/ peso del neonato) sugieren que CAT podría representar un biomarcador de susceptibilidad a tóxicos a ser explorado en futuros estudios, ya que una menor capacidad para detoxificar las especies reactivas del oxígeno (ROS) podría constituir una amenaza potencial para la función placentaria.

En conjunto, los resultados del estudio poblacional indican que los tejidos placentarios expuestos ambientalmente a plaguicidas no mostraron cambios en la respuesta antioxidante ni en los marcadores de estrés oxidativo, sugiriendo que se mantuvo el balance redox aún en las condiciones prooxidantes que se podrían haber generado por la exposición.

En relación a los estudios realizados en la línea celular JEG-3, en condiciones en que la viabilidad por exposición a clorpirifos (CPF) no se vio afectada, se demostró que estas células expresan acetilcolinesterasa (Anzenbacher and Anzenbacherova, 2001), blanco primario de los OFs y que metabolizan los OFs a la forma oxón, ya que su actividad fue inhibida por 5 y 50 μM de CPF. Dicha inhibición fue revertida parcialmente por la presencia del antioxidante N-acetilcisteína sugiriendo que la disminución en la actividad de la enzima AChE se debe en parte a condiciones prooxidantes del medio. Además, se observó que la exposición a 50 ó 100 μM de CPF, concentraciones 5-10 veces mayores a las consideradas representativas de la exposición medioambiental en humanos, indujo un incremento en la generación de las ROS, producto de la metabolización del tóxico y una disminución en el contenido de GSH, sugiriendo que CPF altera el equilibrio redox en estas células. En respuesta a este desbalance redox la actividad de CAT aumentó comparado con el control.

Se sabe que el sistema Nrf2/INrf2 detecta principalmente el estrés oxidativo de baja intensidad (Lushchak, 2011). En respuesta a esto, Nrf2 se trasloca al núcleo, donde se une a los sitios ARE (antioxidant-response element) de los genes blanco para inducir la expresión de múltiples genes de la defensa celular. En coincidencia, el análisis del contenido proteico de Nrf2 mostró un aumento significativo. Adicionalmente se comprobó un aumento en la expresión transcripcional y localización en la fracción nuclear enriquecida en respuesta a la exposición a CPF.

Además, se demostró inducción transcripcional en dos de los tres genes detoxificantes de fase II estudiados, hemo-oxigenasa 1 (HO-1) y glutatión reductasa (GR), mientras que no se hallaron cambios en el ARNm de la superóxido dismutasa-1 (SOD1).

Estos resultados indican que la tolerancia de las células JEG-3 a la exposición a CPF se explica, al menos en parte, por la capacidad de éstas para activar mecanismos de defensa antioxidante.

En resumen, se demuestra por primera vez en células del trofoblasto in vitro que CPF altera el equilibrio redox e induce un aumento de los genes de fase II de detoxificación HO-1 y GR, mediado en parte por la activación de la vía adaptativa del sistema Nrf2/ARE.

ABSTRACT

The organophosphate pesticides (OPs) widely used in agricultural production, constitute an important class of pollutants chemicals in the environment. The majority of people is or has been exposed to pesticides OPs at home by insecticides, by contamination of food, of water courses, occupational exposure and/or by residing in rural areas close to the pesticide application areas. It is growing concern about the consequences of exposure to environmental contaminants on vulnerable groups such as those represented by pregnant women and children in development. Intrauterine exposure may have adverse consequences for the health of the fetus during short- or long-term. Considering that the structure and normal function of the placenta is a prerequisite for the growth and development of the fetus; and the placenta is a tissue of utility to biomonitorear the effect of exposure to xenobiotics, the aim of this thesis work was to establish some relevant aspects related to the balance redox of trophoblastic cell exposed to pesticides. Two different models of study: homogenates from placentas of women environmentally exposed to OPs and the JEG-3 choriocarcinoma-derived cell line were used.

Placentas of pregnant women in a population living in agricultural areas collected during periods of sprays of pesticides (PP), mainly OPs, during the period of recess (PR), and pregnant women considered urban residents, control group (CG), were studied. The enzymatic activity of carboxylesterase (CaE), a sensitive biomarker to environmental exposure to OPs, diminished 16.5% in the placentas collected during the PP compared with CG; and 19% when it was compared with the values obtained from placentas of the rural population in the PR group. In contrast, there was no significant difference in markers of oxidative stress (lipoperoxides, protein carbonylation) as well as in the enzymatic antioxidant defense (glutathione peroxidase –GPx- and catalase –CAT- activities) and non-enzymatic (level of reduced glutathione –GSH-), nor in the levels of the nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), that exerts protective effects against oxidative damage.

The negative association between the activity of CAT, observed in samples of placentas of pregnant women coming of the PP group, and the placental rate (weight

of the placenta / weight of the newborn) suggest that CAT could represent a biomarker of susceptibility to toxins to be explored in future studies, since a lesser ability to detoxify reactive oxygen species (ROS) could constitute a potential threat to the placental function.

Together, the results of the study population suggest that placental tissues exposed environmentally showed no changes in the antioxidant response as well as in markers of oxidative stress, suggesting that the redox balance was maintained even in pro-oxidant conditions that could be generated by exposure.

The studies conducted in the JEG-3 cell line, in conditions in which the cell viability by exposure to chlorpyrifos (CPF) was not affected, showed that these cells express acetylcholinesterase (Anzenbacher and Anzenbacherova, 2001), primary target of the OPs, and that they metabolize OPs to oxon form, since AChE activity was inhibited by 5 and 50 μM of CPF. This inhibition was recovered by the presence of the antioxidant N-acetylcysteine suggesting that the decrease in the activity of the enzyme AChE was due partly to the pro-oxidant conditions of the environment. In addition, it was observed that cell exposure to 50 or 100 μM of CPF, concentrations 5-10 times higher than those considered representative of the human environmental exposure, induced an increase in the generation of ROS, product of the metabolism of toxic, and a decrease in GSH content suggesting that CPF alters the redox balance in these cells. In response to this redox imbalance CAT activity increased compared to control.

It is well-known that the Nrf2/INrf2 system detects mainly oxidative stress of low intensity (Lushchak, 2011). In response to this, Nrf2 is translocated to the nucleus, where it binds to the ARE sites in target gene to induce the expression of multiple genes of cell defense. In line with these, the Nrf2 protein level showed a significant increase in response to exposure to CPF. Additionally, an increase in the transcriptional expression and nuclear localization of the protein Nrf2 was found. Furthermore, an increase in the transcription of two of the three antioxidant genes of phase II investigated in this study, heme-oxygenase 1 (HO-1) and Glutathione reductase (GR) was demonstrated, while there was no change in superoxide dismutase-1 (SOD1) mRNA.

These results indicate that the tolerance to CPF exposure of JEG-3 cells is explained, at least in part, by its ability to activate antioxidant defense mechanisms.

In summary, in this thesis work is shown, for the first time, in “in vitro” trophoblast cells that CPF alters the redox balance and induces an increase of phase II detoxification HO-1 and GR genes, mediated in part by the activation of the Nrf2/ARE adaptive pathway.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.1 PLAGUICIDAS

1.1.1 Definición

Según la FAO (Organización de Agricultura y Alimentos de las Naciones Unidas, del inglés: **F**ood and **A**griculture **O**rganization of the United Nations, 1986), un pesticida o plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar las acciones perjudiciales originadas por animales, vegetales o microorganismos nocivos. Incluye no sólo a los utilizados para evitar dichas acciones en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos y productos de madera sino también a los compuestos que se administran en medicina veterinaria y en actividades sanitarias para el control de insectos vectores de enfermedades (Casida and Quistad ,2004)

1.1.2 Clasificación

Los plaguicidas pueden clasificarse atendiendo a diversos aspectos: según su acción específica en insecticida, acaricida, fungicida, desinfectante y bactericida, herbicida, rodenticida, fitoregulator, protectores de madera, etc. Según su estructura química en arsenicales, carbamatos, derivados de cumarina, derivados de urea, dinitrocompuestos, organoclorados, organofosforados, organometálicos, tiocarbamatos, piretroides, tiazinas etc. Otro aspecto tenido en cuenta para clasificarlos es en base a la toxicidad aguda, cuantificando la respuesta de animales de laboratorio a una serie de dosis crecientes del plaguicida. El valor de la dosis letal media (DL₅₀) es la dosis requerida para matar al 50% de la población de animales de experimentación y se expresa en términos de mg/kg del peso del animal (OMS, 1999). Al aumentar la DL₅₀ la peligrosidad decrece desde el grupo I (sumamente peligroso) al grupo IV (no peligroso) (Tabla I).

Es importante señalar que las formulaciones de plaguicidas además del principio activo incluyen sustancias transportadoras, diluyentes como solventes

orgánicos, aditivos e impurezas, que pueden tener potencial tóxico por sí mismas (Karalliedde et al.2003).

	DL ₅₀ en ratas (mg/kg)			
	Por vía oral		Por vía dermal	
	Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos
Ia	5 o menos	20 o menos	10 o menos	40 o menos
Ib	5- 50	20- 200	10- 100	40- 400
II	50- 500	200- 2000	100- 1000	400- 4000
III	500- 2000	2000- 3000	Más de 1000	Más de 4000
IV	Más de 2000	Más de 3000		

Tabla I. Clasificación de los plaguicidas expresada en DL₅₀ en ratas (mg/kg de peso vivo) dependiendo del modo de ingreso. Fuente: resolución SAGPyA N° 350/1999 y posteriores normas modificatorias (<http://www.casafe.org/>).

1.1.3 Plaguicidas organofosforados

Los plaguicidas organofosforados (OFs) integran un grupo de compuestos químicos utilizados desde 1940 para la protección de los cultivos, la ganadería, la salud humana y como agentes de guerra. Sobre la base de las características estructurales se dividen en al menos 13 tipos diferentes. Entre ellos se incluyen los fosfatos, fosfonatos, fosfinatos, fosforotionatos, fosforotioatos, fosforotritioatos, etc (Gupta,2006). Junto a los piretroides y carbamatos son los plaguicidas más utilizados en agricultura.

Los efectos adversos a la exposición a estos químicos han sido estudiados ampliamente en el sistema nervioso, tejido blanco primario de estos compuestos (Gupta et al. 1999;Gupta et al.2000), pero además hay una preocupación creciente sobre los efectos tóxicos en otros tejidos, producto de la exposición crónica.

1.1.3.1 Estructura y propiedades físico-químicas de los organofosforados

Estructuralmente los plaguicidas OFs son derivados del ácido fosfórico y pueden ser representados en forma genérica como se indica en la Figura 1 donde un

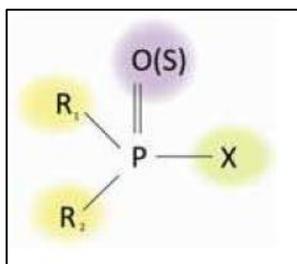
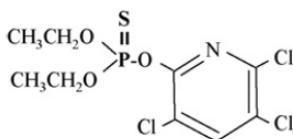


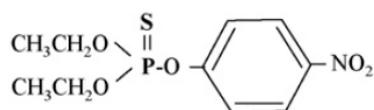
Figura 1. Estructura general de los OFs.

átomo de fósforo central (P) está unido mediante un doble enlace al átomo de oxígeno o azufre y por enlace simple a (X), que representa al grupo “saliente” y es el más sensible a la hidrólisis, y a R_1 y R_2 que son generalmente grupos alcoxis u otros sustitutos químicos (Eleršek and Filipič 2011). La mayoría de los OFs en estado puro tienen estructura de fosforotionatos (paratión, CPF, fenitrotión, diazinón) y de fosforoditioatos (malatión, dimetoato, metil azinfos), como se muestran en algunos ejemplos de la Figura 2.

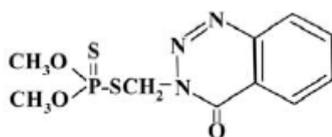
A



B



C



D

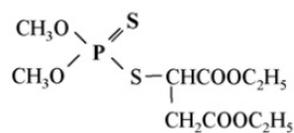


Figura 2. Estructuras de fosforotionatos (A, clorpirifos; B, paratión) y fosforoditioatos (C, metil azinfos; D, malatión).

Los OFs son ligeramente solubles en agua, estables a pH neutro, y la mayoría se hidrolizan rápidamente a pH alcalino. Su estabilidad puede ser afectada por la luz, la temperatura, el aire y/o los disolventes, provocando su oxidación o isomerización a derivados más tóxicos (Matsumura 1985).

1.1.3.1.1 Propiedades físico-químicas de clorpirifos

En la Tabla II se incluyen algunas propiedades de CPF, uno de los OFs más usados en todo el mundo como ingrediente activo de una variedad de formulaciones comerciales (Eaton et al.2008). CPF es un sólido cristalino de color blanco, con olor semejante a los mercaptanos, cuya volatilización es el principal factor por el cual se dispersa en el medio ambiente luego de ser aplicado (ATSDR 1997).

Fórmula química	C ₉ H ₁₁ C ₁₃ NO ₃ PS
Peso molecular	350,57
Punto de fusión	41-42°C
Solubilidad en agua a 25 °C	2 mg/L
Solubilidad en solventes orgánicos	79% p/p en isooctano
	43% p/p en metanol
Coefficientes de partición	log <i>K_{ow}</i> 4,82
	log <i>K_{oc}</i> 3,73
Presión de vapor a 20 °C y 25 °C	1,87 x 10 ⁻⁵ mm Hg

Tabla II. Propiedades físico-químicas de CPF. *K_{ow}*, coeficiente de partición octanol/agua; *K_{oc}*, coeficiente de partición carbono orgánico/agua (Eaton et al.2008)

1.1.3.2 Dinámica en el medio ambiente

El ingreso de los plaguicidas en el medioambiente se debe principalmente a su aplicación para el control de plagas en agricultura (Whyatt et al.2002). El estudio del transporte y persistencia en el medioambiente es de gran interés por la potencial toxicidad en humanos y en otros organismos no blanco. Los plaguicidas pueden transportarse en el ambiente dependiendo de las condiciones climáticas, las características morfológicas de la superficie vegetal y de las características

fisicoquímicas del plaguicida (Enriquez 2000). Adicionalmente, las técnicas de aplicación influyen en el riesgo de producir deriva (Gil Moya 1993). Se ha reportado que del total de plaguicidas aplicados, solo el 1% llega a las plagas (Gavrilescu 2005), siendo la deriva, transporte del plaguicida fuera del sitio de aplicación (Hilz and Vermeer 2013; Majewski and Capel 2010) una ruta importante de ingreso de estos tóxicos al medioambiente (Gil and Sinfort 2005).

El proceso de transporte en el ambiente está relacionado con el coeficiente de partición octanol/agua ($\log Kow$), las constantes de disociación ácida y básica (Ka y Kb), el coeficiente de partición carbono orgánico/agua ($\log Koc$), el índice potencial de lixiviación (desplazamiento de sustancias solubles) y la presión de vapor de los plaguicidas. Estas propiedades, determinan el destino final de estas sustancias en el suelo, en el agua o en el sedimento (Jekel and Reemtsma 2006). En particular, la volatilización supone uno de los principales mecanismos de transferencia del plaguicida hacia la atmósfera. En algunos casos se pueden esperar pérdidas por volatilización de hasta el 90% en un período de 48 horas. En este proceso, los factores climáticos viento y temperatura son los más importantes (Evangelista and Candela 1998). Se ha establecido que existe una asociación temporal y espacial entre el uso de OFs en agricultura y su presencia en el aire, dentro del radio de 4,8 km, debido a la volatilización (Harnly et al. 2005).

Los procesos de degradación natural, como la biodegradación, la fotodegradación y la hidrólisis química, ocurren mediante reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis, ruptura y reorganización de enlaces moleculares. Estas reacciones, involucran la actividad enzimática de microorganismos, la luz ultravioleta y el pH del medio (Kumar et al.1996; Lu et al.2006; van der Linden et al.2009). La persistencia de los plaguicidas en un compartimiento ambiental depende de la eficiencia de dichos procesos de degradación natural, los cuales inducen en algunos casos la transformación de estas sustancias en metabolitos con mayor toxicidad (Belfroid et al.1998; Cavoski et al.2008; Vittozi et al. 2001). En ambientes naturales el CPF, se transforma en 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP), un metabolito con alto riesgo tóxico (Cáceres et al.2007).

Cuando un plaguicida resiste a los procesos de transformación y además no se evapora resulta muy persistente; esto significa que tiene un período de semidegradación (vida media) muy largo y un alto potencial para contaminar las aguas subterráneas.

A diferencia de los organoclorados, los OFs, tienen una menor persistencia debido a que los procesos de transformación ambiental se efectúan con mayor eficiencia sobre los enlaces fosfoéster de estas moléculas. Los valores de vida media son muy variados, a modo de ejemplo, CPF tiene una vida media de 94 días, mientras que el diazinon, de 23 días (Evangelista and Candela 1998).

1.1.3.3 Situación derivada del uso de plaguicidas en la zona del Alto Valle del Río Negro

El riesgo de impacto ambiental del uso de plaguicidas y los posibles efectos sobre la salud humana en grupos vulnerables, constituyen un tema prioritario para la región del Alto Valle del Río Negro, zona densamente poblada, ubicada al noroeste de la provincia de Río Negro, en la Patagonia Argentina. La producción frutícola, principal actividad económica de la provincia, representa más del 64% del ingreso de divisas de la misma y ocupa tanto en forma directa como indirecta al 35% de la población económicamente activa. En dicha área se cultiva el 80% de la producción argentina de peras y manzanas, equivalente al 50% de la producción de frutas frescas del país (SENASA 2008). Estas plantaciones se ven afectadas por un insecto denominado *Cydia pomonella* o carpocapsa el cual daña principalmente a la frutas de pepitas (Copes 2012).

Los principales plaguicidas aplicados en la región del Alto Valle del Río Negro durante el transcurso de esta tesis, fueron los OFs: CPF, metidatió n y metil azinfos además de carbamatos basadas en las recomendaciones de (INTA 2006-2007) las cuales se mantuvieron durante el período de recolección de muestras 2009-2011 (comunicación personal ingeniero agrónomo Fagotti y col.). Dichos compuestos son aplicados con máquinas pulverizadoras durante los meses de setiembre a diciembre (Fig. 3).

Estudios realizados en el Alto Valle revelaron la migración de los OFs desde su lugar de aplicación. Loewy y col. detectaron la presencia de residuos de metil azinfos, CPF, dimetoato, metidati6n, carbaril y propoxur **en suelo y aguas superficiales durante el per6odo de aplicaci6n (Loewy et al.2003)**. Los mismos residuos fueron hallados en **aguas subterr6neas, cuya contaminaci6n es como consecuencia de la metodolog6a empleada en el riego de los montes frutales consistente en inundar el terreno (Loewy et al.2011)**.



Figura 3. Pulverizaci6n de montes frutales con plaguicidas (modif. de Copes 2012).

En otro estudio se detectaron residuos de OFs y carbamatos en agua de pozo y de red destinada al consumo humano colectadas en el per6odo de aplicaci6n de plaguicidas, cuyos niveles superaron, en algunos casos, los establecidos por la Uni6n Europea (Santagni 2006).

Un aspecto a destacar es que los centros urbanos est6n rodeados de montes frutales y los barrios perif6ricos separados solamente por una calle. Dado que los productores aprovechan toda la superficie productiva, es com6n que las plantaciones de frutales se encuentren a escasos metros de casas y escuelas rurales (Fig. 4)(Copes 2012).



Figura 4. Escuela y vivienda rural en zona productiva.

Un factor adicional que aumenta el riesgo de la exposición a plaguicidas para la población establecida en comunidades rurales o en áreas periurbanas es que el período de aplicación coincide con la época de vientos moderados y fuertes, lo que favorece la dispersión aérea de estos compuestos. Según un relevamiento realizado por nuestro grupo de trabajo a mujeres de comunidades rurales situadas en esta región, se suman además como conducta de riesgo, el uso de los canales de riego para recreación durante el verano y el consumo de frutas producidas en las chacras sin respetar los tiempos de carencia (Bulgaroni 2008).

De hecho, se ha reportado la exposición en período de aplicación de OFs tanto en embarazadas (Cecchi et al. 2012; Souza et al. 2005; Souza et al. 2006; Vera et al. 2012), como en niños y en sus madres (Bulgaroni et al. 2012). Por todo lo expuesto, surge como problemática indiscutible en las poblaciones de la región expuestas crónicamente a OFs el potencial riesgo para la salud desde el ambiente intrauterino.

1.1.3.4 Exposición a organofosforados

Existen dos tipos de exposición por las cuales el hombre entra en contacto con estos tóxicos. Una es la exposición **directa**, que tiene lugar cuando el individuo afectado puede reconocer la fuente y es consciente de la exposición. Se produce en trabajadores agrícolas, trabajadores en zonas vedadas, por el uso doméstico de plaguicidas y en las intoxicaciones intencionales. Miles de casos de intoxicación por OFs han sido reportados en el pasado y lo siguen siendo anualmente en todo el

mundo, sea su causa suicida, accidental u ocupacional (Recena et al. 2006; Steenland et al. 2000; Viswanathan 2013).

En cambio, la exposición **indirecta** es la que tiene lugar cuando se desconoce la presencia del contaminante. Se produce por la presencia de residuos de plaguicidas en el ambiente e involucra a un mayor segmento de la población. La exposición puede darse a través del aire, por la vía digestiva en la que ingresan residuos de plaguicidas junto con los alimentos y el agua (Rana et al. 2012; Szpyrka et al. 2013, y/o por vía dérmica producto de la contaminación ambiental (Ecobichon 2001; Jeyaratnam 1990). Este tipo de exposición ha sido demostrada por la detección de metabolitos de OFs en orina, de diferentes poblaciones no expuestas laboralmente (Adgate et al. 2001; Curl et al. 2003; Kawalakis and Tsatsakis 2012).

1.1.4 Ingreso y distribución de plaguicidas en el organismo

Los plaguicidas que ingresan al organismo ya sea por vía respiratoria, dérmica y/o gastrointestinal, deben atravesar diversas barreras como la piel, las mucosas, el epitelio pulmonar o el del tracto gastrointestinal. La vía dérmica e inhalatoria son las dominantes en la exposición ocupacional, mientras que la digestiva es la predominante para la población en general (Eaton et al. 2008). Una vez alcanzado el torrente sanguíneo, los plaguicidas se distribuyen en los órganos y compartimentos del organismo con una velocidad característica, dependiendo de factores como la irrigación sanguínea de cada órgano, el pH tisular, el contenido de lípidos y de agua del mismo; así como de las propiedades físicoquímicas y características tóxico-cinéticas propias del plaguicida (Castro 1985).

Dentro de los OFs, los compuestos fosforotionatos como por ejemplo CPF son más lipofílicos que los fosfatos, por lo que se pueden depositar en tejido graso disminuyendo la concentración en sangre (Jokanović 2001).

1.1.4.1 Ingreso y distribución de plaguicidas durante la vida intrauterina

Existe una vía adicional de ingreso de plaguicidas al organismo: la vía *intrauterina*. Se han detectado OFs en líquido amniótico (Bradman et al. 2003), sangre de cordón (Barr et al. 2012; Huen et al. 2012) y meconio (Ostrea Jr et al. 2009; Ostrea Jr et al 2002). La transferencia de estos tóxicos desde la sangre materna a la circulación fetal tiene lugar a través de la membrana del sincitiotrofoblasto. Un estudio de la toxicocinética y transferencia a la placenta de una única dosis dérmica del OF metilparatión administrada a ratas preñadas demostró que a las 96 hs la orina materna contenía el 91 % de la marca administrada, con una importante transferencia transplacentaria (Abu-Qare et al. 2000). Sin embargo, los valores de residencia relativa, que reflejan la exposición de cada tejido respecto al plasma materno, sugieren que la placenta funciona como un depósito temporario (Abu-Qare et al. 2000). Más aún, este órgano influye en la distribución de plaguicidas entre el compartimento materno y fetal ya que posee enzimas metabolizantes de xenobióticos y transportadores de membrana que extruyen xenobióticos hacia la sangre materna (ver punto 1.3.5). Los polimorfismos asociados tanto a la actividad enzimática como a dicho transporte pueden afectar la exposición a los plaguicidas tanto en la placenta como en el feto (Prouillac and Lecoeur 2010).

1.1.5 Tejidos involucrados en la detoxificación

La metabolización de OFs ocurre principalmente en el hígado. Sin embargo todos los tejidos expresan al menos algunas de las enzimas metabolizantes de xenobióticos, por lo que en menor proporción también ocurre en otros tejidos como cerebro, intestino, piel y placenta (Castro 1985).

1.1.6 Metabolización de plaguicidas

Simultáneamente con su distribución en el organismo, el plaguicida sufre procesos de biotransformación pudiendo resultar en productos biológicamente más activos que el original, proceso que se denomina **bioactivación**, o bien en compuestos

inactivos. Las biotransformaciones que provocan la pérdida de la actividad biológica, constituyen el proceso de **detoxificación**.

Las reacciones de biotransformación se dividen en dos fases, la fase I consiste de reacciones de oxidación, reducción y/o hidrólisis, mediante las cuales un grupo polar es introducido dentro de la molécula. En este proceso se pueden formar metabolitos más tóxicos que el compuesto parental (forma oxón) pero también, se forman otros compuestos no tóxicos. La Fase II consiste en reacciones de conjugación, los metabolitos polares de fase I son conjugados con compuestos endógenos activados tales como ácido glucurónico, glutatión, sulfonato u aminoácidos resultando productos hidrosolubles que pueden ser excretados por riñón (Jokanović 2001). En estas reacciones intervienen enzimas tales como glucuronosil transferasas (GT), sulfottransferasas y glutatión S-transferasas (GST). En adición a las reacciones citadas, la destrucción estequiométrica de los OFs, constituye un importante mecanismo de detoxificación (Tang et al. 2006).

1.1.6.1 Reacciones de biotransformación de Fase I

La **bioactivación** de OFs ocurre principalmente mediante reacciones de oxidación destacándose la desulfuración oxidativa y la oxidación de grupos sulfidrilos o sulfoxidación. La desulfuración oxidativa es llevada a cabo por complejos enzimáticos de monooxigenasas que dependen del citocromo P₄₅₀ (CYP) y monooxigenasas que contienen flavina (OFM). La bioactivación mediada por CYP se produce en OFs con estructuras (P=S) generándose un metabolito de estructura (P=O) (oxón) con potente actividad biológica como lo es la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (Anzenbacher and Anzenbacherova 2001; Costa 2006). El sistema enzimático de CYP constituye la superfamilia más importante de enzimas metabolizantes de xenobióticos. Este sistema está constituido por el citocromo P₄₅₀, citocromo P₄₅₀ reductasa y citocromo b₅ reductasa, las que necesitan de NADPH y oxígeno para su actividad. Como se muestra en la Figura 5, este proceso de óxido-reducción lleva implícito la formación de especies derivadas de oxígeno, anión superóxido (O₂⁻) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Orellana

and Guajardo 2004). Las etapas catalizadas por las enzimas CYP involucran la reducción de un átomo de oxígeno molecular a agua, siendo el otro átomo incorporado en el sustrato (RH) para dar el correspondiente producto (ROH).

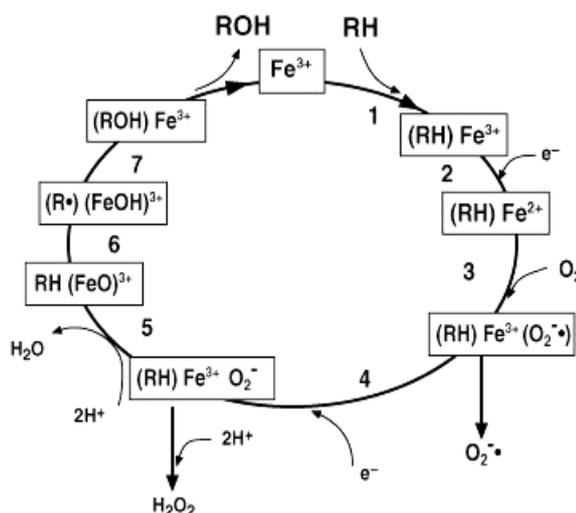


Figura 5. Esquematación del mecanismo de catálisis de citocromo P₄₅₀. Fe, representa el átomo de hierro del grupo hemo en el sitio activo; RH, un sustrato y ROH, el correspondiente producto de monooxigenación (Orellana and Guajardo 2004).

Las bioactivación por parte de las OFM requieren que el átomo de fósforo del OF esté unido a un átomo de C (P-C), como en los fosfonatos (Jokanović 2001). Las reacciones de sulfoxidación, que convierten a algunos OFs que contienen grupos tioéster en sulfóxidos y sulfonas, son mediadas principalmente por las OFM aunque también pueden intervenir el CYP.

Las biotransformaciones de fase I que llevan a la **detoxificación** de los OFs ocurren principalmente por ruptura de uno de las uniones del fósforo, formando usualmente una molécula cargada negativamente. Esta carga negativa no permite al OF ser activo como agente anticolinesterásico, generándose así metabolitos menos tóxicos (Jokanović 2001). Dichas biotransformaciones son mediadas por reacciones de oxidación o de hidrólisis. Las reacciones de oxidación pueden ser: a) de dearilación por CYP (Fig. 6) pudiendo intervenir también las A-esterasas; y b) de desalquilación mediada por A-esterasas. En la Figura 6 se ilustran los pasos involucrados en la fase I de metabolización de CPF. Tanto las reacciones de dearilación como la de hidrólisis

tienen al grupo saliente como producto. La desulfuración oxidativa mediada por CYP produce la forma oxón, metabolito activo, el cual puede ser hidrolizado por A-esterasas y formar los metabolitos inactivos TCP y dietil fosfato (Furlong 2008). Además, mediante la reacción de dearilación, se producen los metabolitos TCP y dietil-tio-fosfato y con ello la detoxificación de este OF.

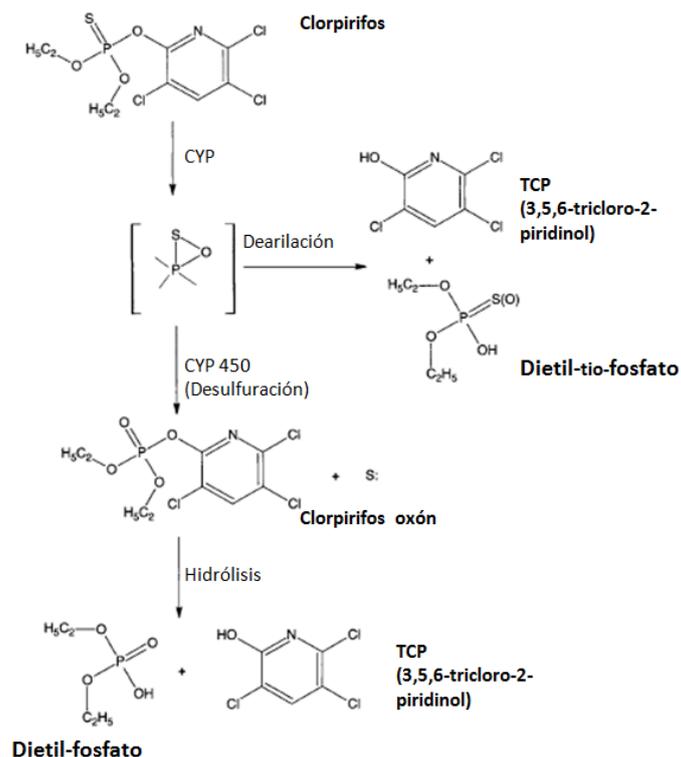


Figura 6. Metabolismo de CPF (Fase I).Tang et al. 2006.

Otras reacciones importantes de fase I son las reacciones de **hidrólisis** de uniones éster, amidas o grupos éster fosfato (Figura 6). Las esterasas que intervienen en las reacciones de hidrólisis han sido clasificadas en base a la naturaleza de la interacción con los OFs (Aldridge 1953). Las **A-esterasas**, paraoxonasas o arilesterasas que hidrolizan ciertos OFs, pero no son inhibidas por estos compuestos. Incluyen a las enzimas dependientes de Ca^{2+} que contienen cisteína acetilada en su sitio activo.

Las **B-esterasas** son enzimas que pueden ser inhibidas por OFs y tienen residuos de serina en su sitio activo. En este grupo se incluyen a las carboxilesterasas (CaE) (Jokanović 2001). Las CaE, que hidrolizan ésteres de ácidos carboxílicos, son capaces de

degradar al OF malatión, y también a carbamatos y piretroides (Barata et al. 2004; Crow et al. 2007; Nishi et al. 2006).

En resumen, debido a la variedad de tipos de átomos presentes en los OFs (C,O,P,N,S y Cl) y la variedad de grupos presentes (ácidos, alcoholes, ésteres y éteres), estos compuestos pueden metabolizarse por distintas reacciones de Fase I, siendo las más prominentes las oxidaciones mediadas por CYPs y las OFMs, así como la hidrólisis mediada por las A-esterasas (Tang et al. 2006).

Se conocen varias isoformas de CYPs, que tienen como sustratos a OFs específicos (Kappers et al. 2001; Mutch et al. 2003). El polimorfismo genético de las CYP (Buratti et al. 2003; Buratti et al. 2006) y la isoforma 1 de paraoxonasa (Chen et al. 2004; Huen et al. 2009) desempeñan un importante rol en la modulación de la toxicidad de los OFs. El balance entre los procesos de activación y detoxificación dan cuenta del riesgo de daño al organismo (Jokanović 2001).

1.1.7 Blancos de acción de los organofosforados

Además de los aductos que los OFs forman con el sitio activo de enzimas de la superfamilia de serina-hidrolasas, el análisis de una variedad de proteínas por espectrometría de masa permitió la identificación de la unión covalente de OFs a residuos tirosina y lisina de otras proteínas, lo que sugiere que numerosas proteínas pueden ser modificadas por los OFs (Terry Jr 2012). Adicionalmente a la formación de aductos, se han reportado efectos en el fosfoproteoma asociado a alteraciones en la actividad y expresión de quinasas (Magnarelli and Fonovich 2013).

1.1.7.1 Blanco primario: AChE

La principal función de la AChE es la de hidrolizar a acetilcolina (ACh) y finalizar la neurotransmisión a nivel de la sinapsis colinérgica, la cual controla las mayores funciones del cerebro, como el aprendizaje y la memoria, el control de la comunicación nervio-músculo, la actividad muscular, etc. (Tsim and Soreq 2013). Tanto la estructura como el sitio activo de esta enzima, contiene regiones similares a otras serina-

hidrolasas. El dominio catalítico es la tríada de aminoácidos Ser-His-Glu. La reacción catalítica de AChE es extraordinariamente rápida a pesar de que el sitio activo reside en la parte inferior de un bolsillo profundo, según se comprobó mediante estudios cristalográficos (Fig. 7A). La naturaleza nucleofílica del carboxilato se transfiere a través del anillo imidazol de la His al grupo hidroxilo de la Ser lo que permite desplazar al resto colina del sustrato, formándose un intermediario acetil-enzima. Luego mediante una hidrólisis se libera el grupo acetato (Fig. 7B). En cambio, el sitio de unión periférico parece ser fundamental para algunas de las funciones “no clásicas” de AChE.

Esta enzima tiene una distribución tisular variada con notable presencia en tejidos no neuronales, inclusive en placenta (Bhuiyan et al. 2006).

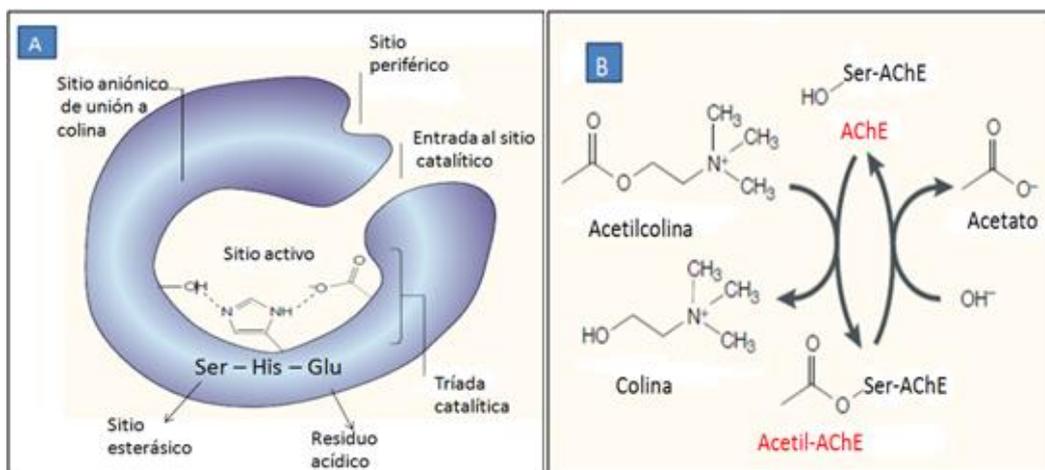


Figura 7. A. Características estructurales de AChE obtenida por cristalografía de rayos X. B. Reacción enzimática. Adaptado de(Soreq and Seidman 2001).

1.1.7.1.1 Inhibición de la actividad enzimática de AChE por organofosforados

La enzima AChE es considerado el principal blanco de los OFs. Los OFs con estructura P=O y los derivados oxón tienen la capacidad de fosforilar a la enzima uniéndose al grupo -OH de la serina que ocupa el sitio activo de la enzima (sitio esterásico) de manera análoga al sustrato natural.

La Figura 8 muestra un esquema comparativo de la dinámica de interacción de la enzima con ACh y con el metabolito CPF oxón. La interacción con el metabolito oxón forma una unión éster fosfato más estable que la unión al sustrato fisiológico. Su velocidad de hidrólisis es muy lenta y presenta variaciones dependiendo de la

naturaleza química de los grupos R sustituyentes. El envejecimiento ocurre por hidrólisis no enzimática de uno de los grupos alcoxi (R-O-R) y el grado del mismo depende de la naturaleza de dicho grupo. La enzima envejecida permanece inhibida irreversiblemente. La recuperación de los niveles de actividad de AChE tiene lugar cuando se produce síntesis *de novo* de la enzima, proceso que lleva días (Costa 2006).

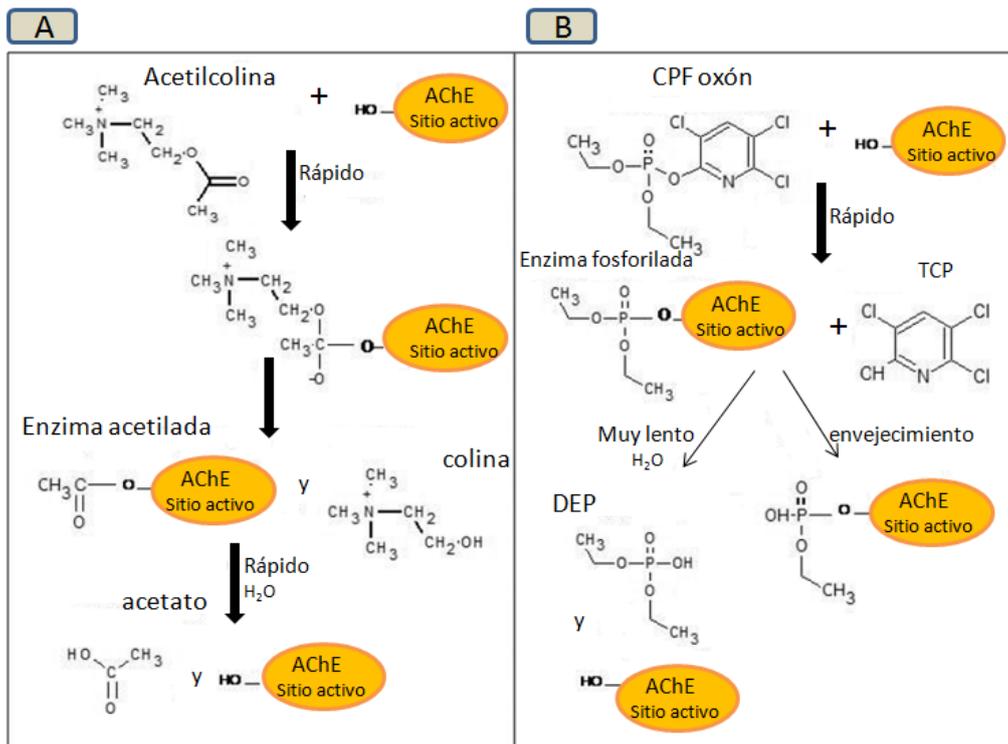


Figura 8. Esquema de la interacción de acetilcolina (A) y de clorpirifos oxón (B) con el sitio activo de la enzima AChE. Adaptada de (Barry et al. 2008).

La inhibición de la enzima por OFs produce el “síndrome colinérgico”, por acumulación de ACh en las terminales sinápticas, provocando la estimulación continua de los receptores nicotínicos y muscarínicos con manifestación de los síntomas clínicos correspondientes, tales como taquicardia, contracciones musculares, diaforesis, sialorrea, epífera, broncoconstricción, cefaleas etc.

1.1.7.2 Blancos secundarios

1.1.7.2.1 Esterasa neuropática

Otra esterasa blanco de varios OFs es la esterasa neuropática, fosfolipasa involucrada en el metabolismo fosfolipídico, el crecimiento neuronal y la

diferenciación neuronal (Terry Jr 2012). La fosforilación de ésta por OFs es similar a la observada en AChE, y conlleva a la degeneración axonal (Lotti and Moretto 2005). Sin embargo sólo los OFs que conducen al envejecimiento de la esterasa neuropática (por mecanismo análogo al descrito para AChE) pueden causar polineuropatía. Esta polineuropatía ocurre 2-3 semanas posterior a una sola exposición a OFs, no tiene relación con la inhibición de AChE y se caracteriza por hormigueo de las manos y pies seguido por pérdida sensorial, debilidad muscular progresiva y flacidez muscular (Costa 2006).

1.1.7.2.2 Carboxilesterasas

Las CaEs de mamíferos son enzimas ubicuas localizadas en el retículo endoplasmático (RE) de muchos tejidos. Como se muestra en la Figura 9, al igual que AChE, la CaE posee la tríada catalítica de aminoácidos Ser, His, Glu en su sitio activo (Casida and Quistad 2004).

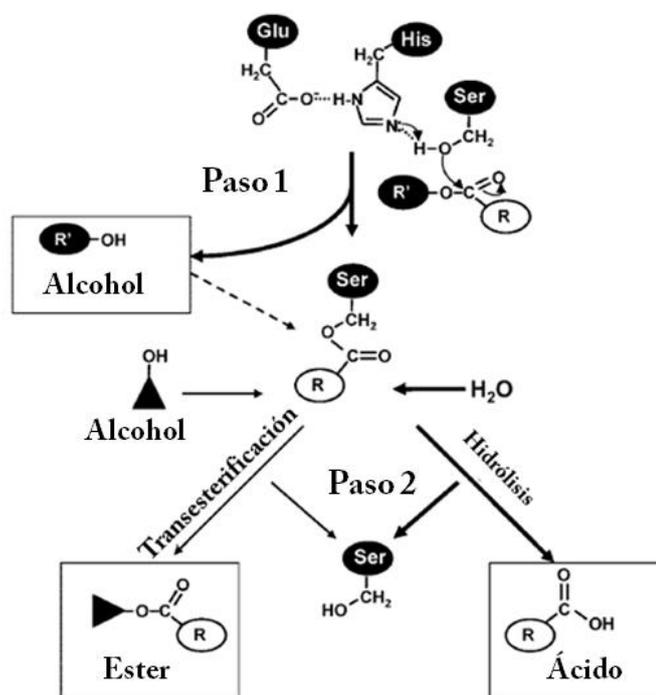


Figura 9. Mecanismo catalítico de carboxilesterasa de mamíferos (Imai 2006).

Estas enzimas hidrolizan ésteres carboxílicos incluyendo ésteres de ácidos grasos como palmitoil-CoA, acilcarnitinas y mono-, di- y tri-acilglicerol. Por otra

parte, las CaEs especialmente hCE1 (isoforma hepática), puede llevar a cabo reacciones de transesterificación. También pueden participar en el transporte de ácidos grasos a lo largo del RE ó en el mantenimiento de la estructura de membrana. La hidrólisis de xenobióticos que contengan ésteres, tioésteres ó amidas les otorga un importante rol en la biotransformación de químicos, incluyendo insecticidas y diversas drogas (Wallace et al. 1999).

Los metabolitos oxón de CPF, diazinón y paratión son potentes inhibidores de CaE tanto *in vitro* como *in vivo*. Estos OFs no son hidrolizados por estas enzimas, pero se unen a ellas estequiométrica e irreversiblemente permitiendo de este modo que las CaEs sean consideradas “scavengers” estequiométricos de compuestos OFs (Cole et al.2010). La Figura 10 muestra como la CaE pueden ser inhibida por el OF paratión como resultado de la unión al grupo fosforilo de este compuesto (Tang et al. 2006).

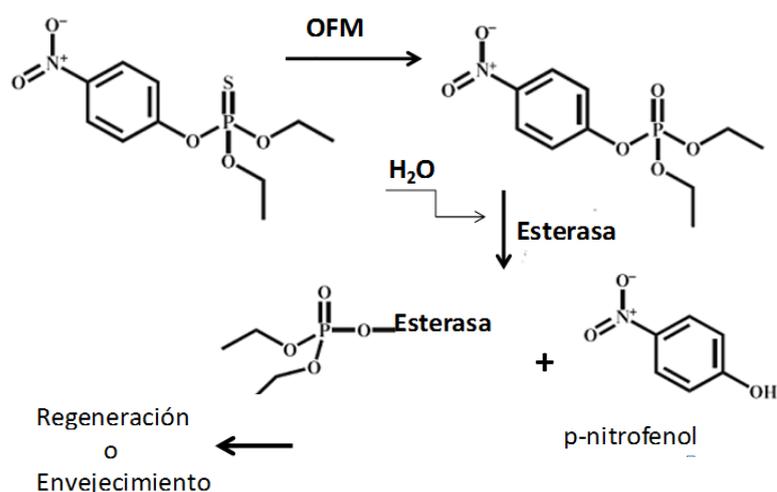


Figura 10. Mecanismo de inhibición de CaE por el OF paratión. El paratión mediado por las OFMs se activa a la forma “oxón” (paraoxón). A continuación paraoxón se une a la esterasa y es hidrolizado por la adición de agua. Se libera p-nitrofenol y la esterasa fosforilada, pudiendo ésta liberar el grupo fosfato y recuperar la actividad catalítica o conservar dicho grupo y envejecer perdiendo así la actividad. Modif. de Wheelock et al. 2005.

Algunos OFs tiene mayor afinidad para unirse a CaEs que para AChE por lo que las CaEs limitan la neurotoxicidad de estos compuestos (Tang et al. 2006). Debido a ello resultan un indicador sensible de la exposición ambiental a plaguicidas como se ha demostrado en diversas especies (Wheelock et al. 2005). Las CaEs contribuyen así, de manera importante, a la detoxificación estequiométrica de muchos de los oxones

incluso a aquellos que son de baja afinidad para las A-esterasas. Los oxones y fosfatos tienen generalmente alta afinidad por el grupo serina del sitio esterásico de AChE, el cual es el blanco para la toxicidad aguda. Sin embargo, también, tienen una alta afinidad por otras serina-hidrolasas tales como las CaEs. La fosforilación estequiométrica de esta enzima genera la liberación del grupo "saliente" del sustrato. Dicha fosforilación ocurre a relativamente bajas concentraciones de oxón (Chambers et al. 1990). La CaE puede proteger así a la AChE de la inhibición por destrucción de oxones antes que tengan oportunidad de circular por el sistema nervioso. Sin embargo, al ser una detoxificación catalítica "suicida", la enzima es saturable y podría limitar su eficacia cuando el OF está presente en altas concentraciones (Tang and Chambers 1999).

1.1.7.2.3 Otros blancos de acción

Otros blancos alternativos que pueden contribuir a los efectos secundarios a corto y largo plazo son: butirilcolinesterasa que tiene un rol en la regulación de los niveles de ACh en el sistema nervioso central (Reid et al. 2013; Tsim and Soreq 2013) ácido graso amida hidrolasa, serina hidrolasa que cataboliza lípidos bioactivos entre los que se incluyen endocannabinoides; acil péptido hidrolasa, serina proteasa que interviene en la degradación proteica; aril formamidasa, enzima que interviene en la conversión del triptófano en ácido nicotínico y NADH; los receptores muscarínicos de acetilcolina, y el receptor de cannabinoides CB1; transferrina, etc (Casida and Quistad 2004; Terry Jr 2012).

También se ha demostrado unión covalente de OFs al aminoácido tirosina de quinesina, molécula involucrada en el transporte intracelular, lo que debilita las interacciones quinesina-microtúbulos necesarias para el transporte axonal (Terry Jr 2012). Adicionalmente, existen reportes que evidencian que los OFs pueden interferir con numerosas vías de señalización en el sistema nervioso central a través de la inducción de la fosforilación de quinasas reguladas extracelularmente (del inglés, extracellular regulated kinases, ERK) y c-Jun quinasas terminales (del inglés, c-Jun N-terminal kinases JNK) vía proteína quinasa C (PKC) así como a través de la fosforilación

de la proteína de unión al elemento de respuesta de AMP cíclico (del inglés, cyclic AMP response element (CRE)-binding protein, CREB) en diversos sistemas experimentales. En particular CPF afecta la expresión de genes que codifican para isoformas de PKC y de moduladores de su actividad en el cerebro de ratas en desarrollo (Magnarelli and Fonovich 2013). También se ha demostrado que CPF, en dosis que no producen signos manifiestos de toxicidad aguda, puede afectar la actividad de factores neurotróficos y de sus receptores asociado a la alteración de su autofosforilación (Terry Jr 2012).

1.1.8 Utilidad de enzimas blanco como biomarcadores

Un biomarcador desde el punto de vista toxicológico, se define, como una respuesta biológica a un agente químico. Sin embargo, no hay duda que la medición de un xenobiótico en un sistema biológico es una medida de la exposición (Gil and Pla 2001). Por lo tanto, a los efectos prácticos, se considera que un biomarcador de exposición puede ser un compuesto exógeno (o su metabolito). Es así que el biomonitoreo de exposición a plaguicidas OFs implica la medición en medios biológicos (orina, sangre, saliva, aire exhalado, cabello, uñas y tejidos) del compuesto parental, sus metabolitos o bien los productos de reacción entre el compuesto (o metabolito) y un componente endógeno. Sin embargo, la evaluación del riesgo ambiental asociado a los plaguicidas OFs puede resultar complejo ya que su bajo coeficiente de partición octanol/agua y su alta velocidad de biotransformación evita que estos tóxicos se acumulen en la cadena alimentaria y puedan por lo tanto ser detectados por las técnicas analíticas convencionales. En ese sentido, el uso de biomarcadores ha sido particularmente conveniente para evaluar los efectos de esta clase de compuestos (Chambers et al. 2002). De hecho, un biomarcador de efecto se considera indicativo de un cambio bioquímico, o de la capacidad funcional de un organismo como resultado de la exposición al xenobiótico. En cuanto, al biomarcador de susceptibilidad, es un indicador de que el individuo es especialmente sensible al efecto de un xenobiótico o a los efectos de un grupo de xenobióticos (Manno et al. 2010).

Un biomarcador ideal debería ser altamente específico y capaz de detectar el impacto a nivel bioquímico/molecular de forma temprana previo a que los efectos adversos sean irreversibles.

1.1.8.1 Acetilcolinesterasa

La AChE ha sido universalmente reconocida como un biomarcador de efecto de alta especificidad para OFs y carbamatos (Gil and Pla 2001). No obstante dado que refleja el grado de exposición, ha sido utilizada ampliamente en toxicología básica, toxicología humana y en ecotoxicología como indicador de exposición, habiéndose determinado en tejidos tan diversos como eritrocitos, cerebro, hígado y placenta de animales de experimentación (Lassiter et al. 1999). AChE cumple con las condiciones necesarias para ser considerado como un biomarcador en la vigilancia biológica: es fácil de medir, muestra un comportamiento dependiente de la dosis de exposición a contaminantes, es sensible y muestra asociación con los efectos adversos para la salud (Lionetto et al. 2013). Desde hace más de dos décadas, se utiliza para evaluar el grado de exposición laboral. AChE se expresa en las neuronas colinérgicas y tiene una actividad relativamente alta en los eritrocitos, siendo responsable de la degradación de ACh plasmática.

La OMS ha establecido la necesidad de intervención cuando la inhibición de la AChE eritrocitaria es del 30% con respecto al valor basal (Ames et al. 1995; Ohayo-Mitoko et al. 2000). Adicionalmente, el uso de AChE como biomarcador para evaluar la exposición a OFs ha sido de utilidad en distintos modelos de estudio: humanos (Garabrant et al. 2008; Lionetto et al. 2013; López et al. 2007; Rovedatti et al. 2012), en peces: (Botté et al. 2012), en ratas (AM Aboul-Soud et al. 2011; Chanda et al. 1997), en insectos: (Wu et al. 2011; Kavitha and Rao 2008), entre otros. Hernández y col han sugerido la utilidad de usar como biomarcador de exposición a la AChE en la vigilancia de los trabajadores expuestos a largo plazo a diferentes plaguicidas OFs y carbamatos (Hernández et al. 2005). Por otra parte, en los últimos años se ha demostrado la sensibilidad de AChE a otras especies químicas distintas de OFs y carbamatos, como metales pesados (Frasco et al. 2005; Frasco et al. 2007) , otros pesticidas como

piretroides (Reddy and Philip 1994), triazinas (Davies and Cook 1993) y paraquat (Szabó et al. 1992).

Contrariamente a la inhibición de AChE, existen antecedentes de aumento de expresión de AChE después del tratamiento con anticolinesterásicos en células de retina (Keller et al. 2001) y cerebro de ratas (Grisaru et al. 1999), lo que se ha interpretado como una respuesta autoregulatoria. En este sentido, se ha reportado, en diferentes muestreos, un aumento significativo en la actividad de AChE en placenta de embarazadas residentes en el área del Alto valle de Río Negro asociado al período de pulverizaciones con OFs (Souza et al.2005; Rovedatti et al. 2012; Vera 2010; Vera et al.2012).

1.1.8.2 Carboxilesterasa

Los efectos del tratamiento con CPF sobre la actividad microsomal hepática de CaE y los niveles de glutatión reducido citosólico (He 1999), sugieren que los mecanismos de detoxificación están involucrados en proteger a la célula de los efectos inducidos por CPF en la exposición a largo plazo y probablemente en la inducción de tolerancia (Cometa et al. 2007). Dado que los OFs tiene mayor afinidad por las CaEs que por AChEs, se ha sugerido que CaE representa un biomarcador más sensible para evaluar la exposición ambiental de diversas especies a estos tóxicos, por lo que se ha propuesto su inclusión en ensayos de monitoreo (Wheelock et al. 2008). Respecto a poblaciones expuestas ambientalmente a OFs, estudios realizados en el Alto Valle de Río Negro utilizando saliva de niños en edad preescolar y de sus madres se concluyó que la CaE salival refleja más apropiadamente el nivel de exposición ambiental que AChE (Bulgaroni et al. 2012). En relación a la población de embarazadas residentes de la misma zona, hemos hallado inhibición de CaE en homogenato de placenta en diferentes muestreos durante el período de pulverizaciones. Más aún, dicha inhibición resultó menor a partir de la disminución en el uso de OFs acorde a las normas establecidas por el control integrado de plagas (Roveatti et al. 2012; Vera et al. 2012).

1.2 ESTRÉS OXIDATIVO

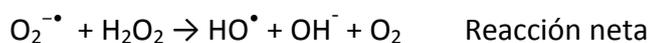
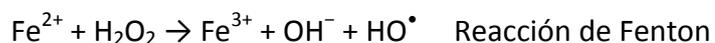
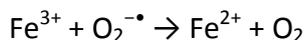
1.2.1 Especies derivadas del oxígeno y del nitrógeno

Las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés), consisten en pequeñas moléculas de diversas estructuras derivadas del O₂ que poseen un electrón desapareado en su último orbital. El O₂ es una molécula bi-radical, que contiene dos electrones desapareados de spin o giro paralelo (conocido como un estado de triplete), característica que no lo hace altamente reactivo *per se*, pero sí es capaz de reaccionar con otras moléculas, convirtiéndose en precursor de las demás especies reactivas (Turrens 2003).

Las ROS incluyen a estructuras radicales de O₂ como el anión superóxido (O₂^{-•}), el radical hidroxilo (HO[•]), el radical peroxilo (RO₂[•]) y el radical alcoxilo (RO[•]), y a estructuras no radicales, agentes oxidantes que son fácilmente convertidos a radicales como, peróxido de hidrógeno (H₂O₂), ácido hipocloroso (HOCL), ozono (O₃) y oxígeno en singulete (¹O₂).

Las especies reactivas derivadas del nitrógeno son el óxido nítrico (NO[•]) y las especies formadas por reacción de éste con el O₂^{-•}, entre ellas el peroxinitrito (ONOO^{-•}), potente oxidante. El NO[•] es producido por la enzima óxido nítrico sintasa (Martínez Vidal et al. 2009) y forma una amplia variedad de especies reactivas derivadas del nitrógeno (Ma 2010).

El O₂^{-•} no es un oxidante fuerte pero es el precursor de la mayoría de las ROS, y además está involucrado en la propagación de las reacciones oxidativas en cadena. Por dismutación espontánea o reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa (Latini et al.2010) se produce H₂O₂ el cual puede ser totalmente reducido a H₂O o parcialmente a radical hidroxilo. La generación de HO[•] a partir de H₂O₂ y O₂^{-•} ocurre *in vivo* en una reacción conocida como reacción de Haber Weiss, la cual es catalizada por los metales de transición cobre o hierro, especialmente Fe³⁺ (ver reacciones).



La formación de HO[•] catalizada por metales Cr²⁺, Ni²⁺ y Co²⁺ entre otros, puede ocurrir *in vitro* (Halliwell and Gutteridge 2007).

1.2.2 Fuentes de especies reactivas

El O₂^{-•}, cuya concentración celular es 10⁻¹¹ M, se forma en estado fisiológico en la mitocondria a nivel del complejo I (NADH-ubiquinona oxido-reductasa), complejo II (succinato deshidrogenasa) y complejo III (Ubiquinol citocromo C reductasa) (Turrens 2003). Su formación en el citosol está dado por diversas oxidasas como la xantina oxidasa en el proceso de conversión de xantina a ácido úrico (Dröge 2002) y en RE por las oxigenasas citocromo P₄₅₀ provocando la oxidación de hierro contenido en la molécula.

El H₂O₂, con una concentración celular del orden de 10⁻⁷ M, se genera principalmente en los peroxisomas, mediado por la acción de oxidasas sobre O₂^{-•}. En la matriz mitocondrial se forma a través de la enzima superóxido dismutasa dependiente de manganeso (MnSOD), en el RE mediante flavoproteínas, y en el citosol por la enzima superóxido dismutasa dependiente de cobre-zinc (Cu-ZnSOD) (Halliwell and Gutteridge 2007).

La vida media de las ROS son muy diferentes, la difusión del radical HO[•] es limitada, por lo que la reacción con las moléculas blanco se llevan a cabo prácticamente en el sitio de generación, algunos radicales peroxilos son relativamente estables, con una vida media del orden de segundos, pudiendo difundir lejos del su sitio de generación (Sies 1997), mientras que el H₂O₂ se mezcla fácilmente con el agua y puede difundir dentro y entre las células *in vivo* (Halliwell and Gutteridge 2007).

1.2.3 Acciones biológicas de las especies reactivas

A nivel homeostático, las ROS tienen diversas acciones sobre la función celular que incluyen la activación de factores de transcripción redox sensibles tales como AP-1, p53 y NFκB, quienes regulan la expresión de diversas citoquinas entre ellas las pro inflamatorias, la diferenciación celular y la apoptosis. También se activan proteínas

quinasas de la familia de las proteína quinasas activada por mitógeno (del inglés, mitogen-activated protein kinases, MAPK). La activación de las ERK1/2 promueven la supervivencia celular y la proliferación mientras que la activación de p38 MAPK y SAPK-JNK (stress-activated protein kinase–c-Jun amino terminal kinases) generalmente inducen la apoptosis. Ambas proteínas quinasas son activadas por fosforilación a través de ASK1 (apoptosis-regulating signal kinase 1) la cual se mantiene inactiva por su unión a tiorredoxinas en condiciones redox basales (Burton and Jauniaux 2011a).

1.2.4 Sistema antioxidante

Para neutralizar el exceso de ROS y prevenir el daño a ciertas estructuras celulares, los organismos aerobios poseen mecanismos de detoxificación enzimático y no enzimático.

a- Mecanismos de detoxificación enzimáticos: incluyen a las enzimas antioxidantes SOD, catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx). Estas enzimas tienen la característica de poseer un centro metálico mediante el cual transfieren electrones para el proceso de detoxificación (Agarwal et al. 2012).

Se conocen tres isoformas de SOD, SOD dependiente de manganeso de localización mitocondrial, SOD dependiente de cobre-zinc, citosólica y extracelular (EC-SOD), que contiene cobre y zinc en su sitio reactivo. Como se mencionó, todas catalizan la conversión de $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 .

El H_2O_2 puede ser removido por dos tipos de enzimas: catalasas y peroxidasas como se muestra en la Fig. 11.

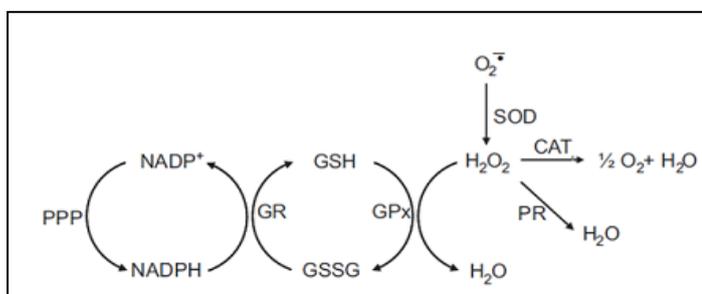


Figura 11. Esquema de la detoxificación de peróxido de hidrógeno. CAT, catalasa; SOD, superóxido dismutasa; PR, peroxirredoxina; GPx, glutatión peroxidasa; GR, glutatión reductasa; GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado; PPP, vía pentosa fosfato. Extraído de Kalyanaraman 2013.

1.2.4.1 Catalasa

La enzima CAT de mamíferos (EC 1.11.1.6) es un homotetrámero formado por 4 subunidades idénticas de 60 kDa con un grupo hemo en cada una de ellas (Kirkman and Gaetani 2007). Es un enzima ubicua (mitocondrial y peroxisomal) presente en casi todos los seres vivos, cataliza la descomposición directa del peróxido de hidrógeno a O_2 y H_2O .

La función de la CAT es más importante cuando los niveles de H_2O_2 son bajos, mientras que a altas concentraciones de H_2O_2 es la enzima GPx la responsable de la detoxificación (Kalyanaraman 2013). Gaetani y col concluyen que CAT elimina la mitad del H_2O_2 que puede ser generado en condiciones fisiológicas y patológicas sugiriendo que GPx elimina la otra mitad. Estos autores además sugieren que independientemente de la relación GPx a CAT, la fracción de H_2O_2 eliminada por la GPx debería permanecer igual en un rango de concentraciones de las dos enzimas o de velocidad de generación de H_2O_2 (Gaetani et al. 1996).

1.2.4.2 Glutatión peroxidasa

La GPx (EC 1.11.19) junto a tioredoxina reductasa y a iodotironina deiodinasa son identificadas como selenoproteínas, están involucradas en reacciones redox y tienen un residuo esencial para la actividad catalítica en el sitio activo: una selenocisteína. Las selenoproteínas tienen función biológica en oxidorreducciones, señalización redox, defensa antioxidante, metabolismo de hormona tiroidea y en la respuesta inmune (Lu and Holmgren 2009). La enzima GPx cataliza la oxidación de glutatión a glutatión oxidado utilizando H_2O_2 o hidroperóxidos orgánicos (ROOH). Esta enzima usa como cofactor al selenio, micronutriente esencial, el cual en el ciclo redox se oxida a ácido selénico y luego se reduce por el sistema de glutatión como se muestra en la Fig. 12.

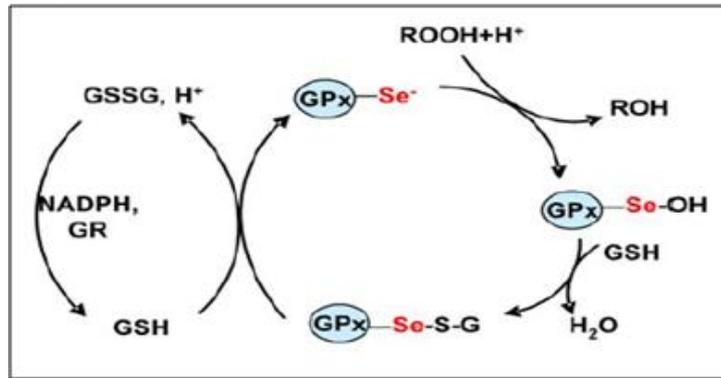


Figura 12. Ciclo redox catalítico de GPx (Lu and Holmgren 2009).

En humanos se conocen cinco isoformas: GPx1, de ubicación citosólica, GPx2 o isoforma gastrointestinal, GPx3 o plasmática, GPx4 ubicada para hidropéroxidos fosfolipídicos en membranas biológicas y GPx6, específica de epitelio olfativo y embrionario (Lu and Holmgren 2009). En homogenato de placenta humana se aisló y purificó una isoforma de GPx dependiente de selenio (Awasthi et al. 1979)

Las GPxs son los principales componentes de la defensa antioxidante. No solo protegen a la célula de la toxicidad del H_2O_2 sino, que detoxifican de hidropéroxidos lipídicos convirtiéndolos a sus correspondientes alcoholes, previniendo así, la autooxidación de estructuras lipídicas (Christopherson and Glass 1969; Little and O'Brien 1968). De la misma manera la GPx dependiente de hidropéroxidos fosfolipídicos detoxifica los fosfolípidos oxidados situados dentro de las membranas (Kritharides et al. 1998).

b- Mecanismos antioxidantes no enzimáticos: en éstos participan proteínas tales como transferrina, ferritina, ceruloplasmina y metaloproteínas que se unen a iones metálicos impidiendo la reacción de Fenton y la formación de radicales hidroxilos y otros aldehídos tóxicos.

Además de enzimas y proteínas encargadas de mantener el estado redox de la célula, existen pequeñas moléculas no enzimáticas con actividad antioxidante, entre ellas GSH, vitaminas C y E, flavonoides, carotenoides, polifenoles, etc (Ma 2010) y mecanismos adaptativos que conducen a la expresión de genes antioxidantes (Kalyanaraman 2013).

1.2.4.3 Moléculas no enzimáticas con actividad antioxidante

GSH es el mayor buffer redox de la célula, propiedad dada por el grupo tiol. Es sintetizado en el citosol a partir de glicina, L-glutamato y L-cisteína, reacción catalizada por las enzimas gama glutamil cisteína sintetasa (γ GCS) y glutatión sintetasa (GS). GSH puede reaccionar directamente con las ROS y detoxificarlas, además, participa como molécula de conjugación en la reacción catalizada por la enzima glutatión S-transferasa (GST) facilitando la excreción de metabolitos intermediarios de fase I de metabolización de xenobióticos (Keppler 1999).

También participa como equivalente de reducción en la detoxificación de lipoperóxidos llevada a cabo por la GPx. En el proceso de detoxificación se forma GSSG, el cual es reducido a GSH por acción de GR a expensas de NADPH, esta coenzima es generada por la vía de las pentosas fosfato. Otros compuestos tioles como las 787y reducir otros peróxidos (Burton and Jauniaux 2011a; Agarwal et al. 2012).

La vitamina C y el α -tocoferol o vitamina E actúan en forma concertada. La vitamina C es hidrosoluble y puede reaccionar rápidamente con $O_2^{\bullet-}$ y HO^{\bullet} formando un radical ascorbato el cual reacciona con otro radical similar formando dehidroascorbato y ascorbato. Éste es necesario para reducir a la vitamina E oxidada, la cual se localiza en membranas biológicas reduciendo a su vez a radicales peroxílicos producidos durante el proceso de peroxidación lipídica (Kalyanaraman 2013).

1.2.4.4 Mecanismos adaptativos de la defensa antioxidante

Ante la exposición continua a niveles moderados de ROS, producidos por diversos compuestos oxidantes y/o electrófilos de naturaleza química diversa (ej. aceptores de Michael, difenoles, quinonas, arsenicales trivalentes, metales pesados, etc.), la célula responde incrementando la síntesis de enzimas y proteínas para restaurar el balance redox (Huang et al. 2000; Osburn and Kensler 2008).

1.2.4.4.1 Factor transcripcional Nrf2

Un mecanismo central en la defensa celular contra el estrés oxidativo o electrofílico está mediado por la inducción transcripcional de genes a través del factor transcripcional Nrf2. Forma parte de una familia de factores de transcripción de los cuales se conocen cuatro miembros: Nrf1 y Nrf2 que se expresan de forma ubicua, Nrf3 se expresa en placenta e hígado y p45 NF-E2 en eritrocitos (Jaiswal 2004; McMahon et al. 2001). De ellos, Nrf2 es el factor de transcripción más potente en la regulación de la expresión basal e inducida de genes que codifican a las enzimas antioxidantes. Pertenecen a una familia de proteínas básicas con un módulo característico denominado "zipper" o cierre de leucinas (bZip) en el dominio C-terminal (Fig. 13). A través de este dominio, heterodimeriza con proteínas Maf o Jun y se une a los genes blancos a través del sitio consenso ARE (antioxidant-response element)(Itoh et al. 2003). La secuencia ARE definida como 5'-TGACnnnGCA-3', está presente en regiones promotoras de genes que codifican enzimas de detoxificación de fase II y proteínas antioxidantes tales como quinona óxido reductasa-1 dependiente de NAD(P)H (NQO1), SOD, GST, GPx, hemo oxigenasa-1 (HO-1), glutamato cisteína ligasa, CAT y tiorredoxina, entre otros (Eggler et al. 2008; Motohashi and Yamamoto 2004). Corriente arriba del dominio bZip de Nrf2 se encuentran: un dominio "Cap'n'Collar" (CNC), un dominio ácido para la activación transcripcional, un dominio de unión a INrf2 (Inhibidor de Nrf2) y un dominio hidrofóbico N-terminal.

La actividad de Nrf2 es regulada negativamente por INrf2 o Keap1 (del inglés, Kelch-like ECH associated protein 1). INrf2 contiene dos dominios principales, un dominio BTB (del inglés, broad complex, tramtrack, and bric-abrac) N-terminal por el cual se une a Cul3/Rbx1 y un dominio DGR C-terminal mediante el cual se une a Nrf2. INrf2 forma un complejo con Nrf2, y funciona como un adaptador para Cul3/Rbx1 permitiendo su ubiquitinación y posterior degradación proteosómica (Fainstein 2007; Niture et al.2013).

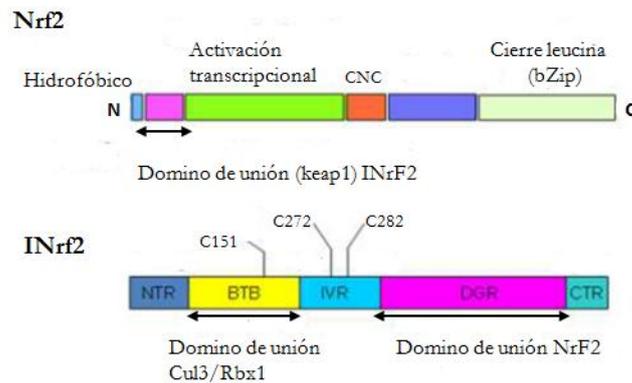


Figura 13. Representación esquemática de los dominios de Nrf2 y Keap1 o INrf2 Niture et al, 2013.

El complejo Nrf2:INrf2 sirve como un sensor del ambiente redox celular. En condiciones basales, Nrf2 se encuentra en citoplasma y en núcleo formando un complejo con INrf2/Cul3-RBX1, y degradándose continuamente (Kobayashi et al. 2004; Niture et al. 2009).

Bajo condiciones pro-oxidantes se interrumpe la interacción Nrf2-INrf2 permitiendo la estabilización y activación de Nrf2. La activación de Nrf2 y posterior reversión al estado basal, está altamente controlada por eventos de señalización que marcan una respuesta de pre-inducción, de inducción y de post-inducción. En la etapa de pre-inducción y ante señales electrofílicas u oxidativas, tirosinas quinasas desconocidas fosforilan residuos específicos de reguladores negativos de Nrf2 como INrf2, Fyn y Bach1 exportándolos del núcleo para su posterior degradación. El núcleo se prepara así para importar Nrf2 sin restricciones (Niture et al. 2011). En una segunda etapa o respuesta de inducción, las señales oxidativas modifican la cisteína 151 de INrf2 citoplasmático, seguida por fosforilación de la serina 40 de Nrf2 mediada por PKC resultando en la liberación de Nrf2 de su proteína inhibidora. Nrf2 se estabiliza y trasloca al núcleo activando en forma coordinada la expresión de genes de respuesta. La etapa final o respuesta de post-inducción controla el “switching off” o apagado de la expresión de genes activados por Nrf2. Gsk3 β bajo el control de AKT y PI3K, fosforila a Fyn y lo conduce al núcleo, allí fosforila la Tyr 568 de Nrf2 resultando en la exportación nuclear y degradación de Nrf2. Al mismo tiempo, los reguladores inhibitorios de Nrf2, INrf2/Cul3-RBX1, Fyn y Bach1 son nuevamente sintetizados e importados al núcleo.

INrf2 mediante la ubiquitinación y degradación de Nrf2, Fyn a través de la fosforilación de Tyr568 de Nrf2 seguida de ubiquitinación y degradación y Bach1 debido a que heterodimeriza con proteínas Maf y compite con Nrf2 por el sitio de unión a ARE. Todo esto lleva al “switching off” de Nrf2 y a suprimir la expresión de genes citoprotectivos llevándolos al estado basal (Fig. 14)(Niture et al. 2013).

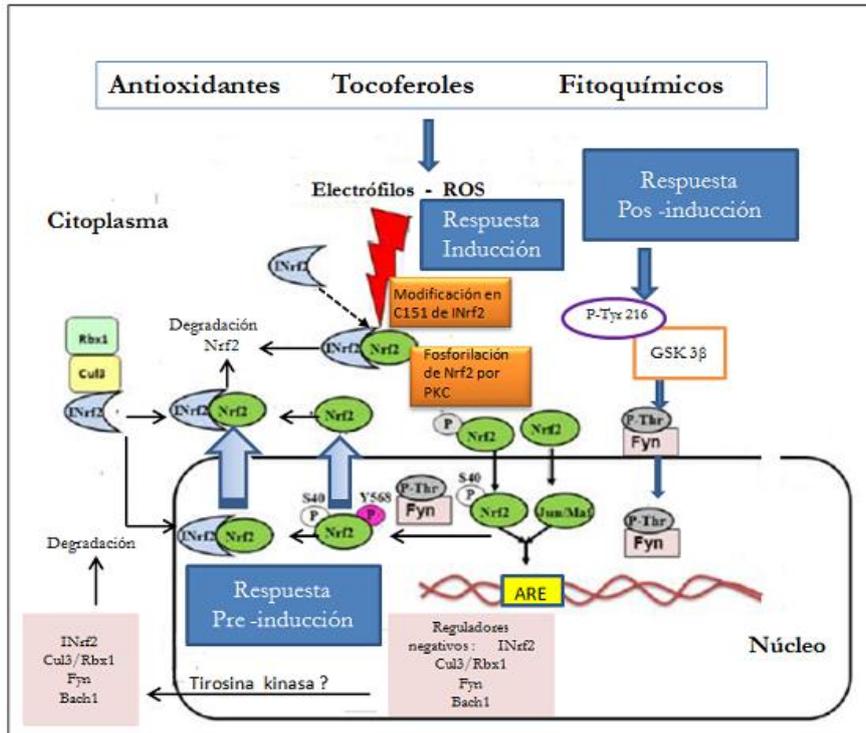


Figura 14. Activación coordinada de genes mediada por la señalización Nrf2-ARE (Niture et al. 2013)

1.2.5 Estrés oxidativo: consecuencias

El aumento en la producción de oxidantes y/o la reducción de antioxidantes genera un desbalance redox conocido como *estrés oxidativo*. En general las ROS en bajas concentraciones operan como moléculas de señalización que promueven la proliferación celular y la supervivencia, como se mencionó previamente. En contraste, un incremento marcado de las mismas puede alterar diversas funciones que de persistir conduce a un severo e irreversible daño, resultando en muerte celular. Estos efectos patológicos son mediados por la apertura de canales iónicos, peroxidación lipídica, modificaciones proteicas y oxidación en el ADN (Ma 2010; Burton and Jauniaux 2011a; Avery 2011).

1.2.5.1 Apertura de canales iónicos

El desbalance redox conduce a la pérdida de la homeostasis del Ca^{2+} con la liberación de iones calcio desde RE y otros depósitos. La mayor concentración de este ión se encuentra dentro del RE comparado con la existente en el citosol, la cual es mantenida por bombas de la familia Ca^{2+} -ATPasas, necesarias para el correcto plegamiento de proteínas. Las ROS son capaces de dañar los canales activando la liberación de Ca^{2+} desde la membrana del RE. Este aumento de calcio, altera vías de señalización dentro de la célula, provocando profundos efectos en diversas funciones. El incorrecto plegamiento de proteínas lleva a su acumulación generando más ROS y estimulando vías de señalización mediados por genes de respuesta a proteínas no plegadas (unfolded protein response, UPR) que llevan a la apoptosis celular. Además el aumento citosólico de iones calcio, tiene efectos adversos en la función mitocondrial, incrementando la propia producción de ROS y la apertura de poros en la membrana externa de la mitocondria, condiciones que alteran el potencial de membrana, colapsa la síntesis de ATP, se pierde la homeostasis iónica y la célula muere por necrosis. Cuando el daño oxidativo ocurre en otras organelas o la apertura de poros es transitoria, la síntesis de ATP puede ser suficiente para permitir la muerte por apoptosis (Burton and Jauniaux 2011a).

1.2.5.2. Oxidación de lípidos

Las membranas plasmáticas o estructuras celulares que contienen grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados son muy vulnerables al ataque de especies reactivas. Esto puede producir cambios en la permeabilidad y fluidez de la membrana, alterando los gradientes iónicos a ambos lados de la misma (Slater 1988). Como se muestra en la Figura 15, la peroxidación lipídica comienza con una *fase de inicio* en la cual, un radical libre con suficiente reactividad extrae un átomo de hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado. El proceso continúa con un reordenamiento de enlaces que estabiliza la molécula por la formación de un dieno conjugado. El radical lipídico

reacciona con un oxígeno para formar un radical peroxilo que puede atacar proteínas de membrana o puede abstraer otro hidrógeno de una cadena de un ácido graso adyacente y así iniciar la *fase de propagación*, pudiendo oxidar a cientos de lípidos de membrana. Unos de los productos de la peroxidación lipídica más estudiado es el malondialdehído (MDA). La *fase de finalización* ocurre cuando un compuesto antioxidante como la vitamina E o BHT (butil-hidroxi-tolueno) dona un hidrógeno al radical peroxilo y forma el correspondiente radical de vitamina E o BHT que luego reacciona con otro radical peroxilo formando un producto no radical (Kalyanaraman 2013).

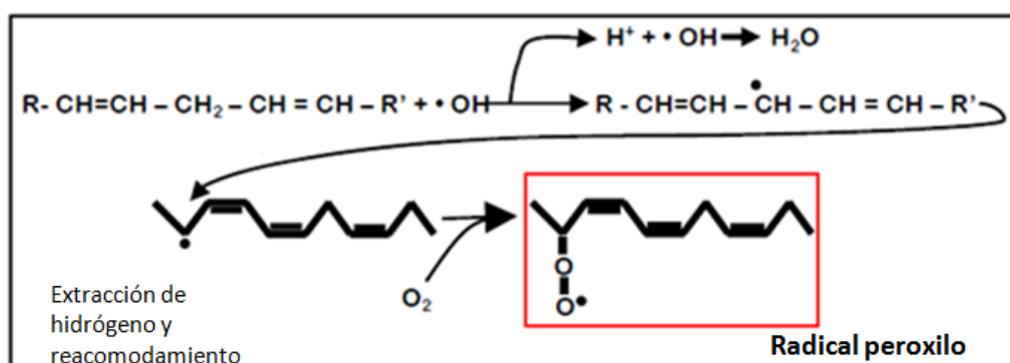


Figura 15. Mecanismo de formación de lipoperóxido (Carney Almroth 2008).

Si el radical peroxilo es atacado en una posición interna, mediante una ciclización o una reacción catalizada por metales puede producir un **radical alcóxido reactivo**. Posterior a la ciclización el ácido graso puede formar un hidroperóxido o someterse a otra ciclización la cual produce **aldehídos** incluyendo malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-2-nonenal (Freed et al. 1979), dos productos de oxidación lipídica bien caracterizados.

El MDA puede reaccionar con bases presentes en el ADN originando una mutación génica, mientras que el HNE reacciona principalmente con proteínas conduciendo a una alteración funcional afectando vías de señalización. El daño oxidativo en fosfolípidos puede conducir a la muerte celular no solo a través del daño en las membranas sino a través de los productos de peroxidación como HNE. El ataque a proteínas tales como JNK y la activación de caspasa 3 son mecanismos que llevan a la muerte celular inducida por peroxidación lipídica (Trachootham et al. 2008).

1.2.5.3 Oxidación de proteínas

Tanto los aminoácidos libres como los que forman parte de las proteínas pueden ser blanco de daño oxidativo. Ciertos sitios de la cadena proteica son particularmente susceptibles a la oxidación. Cadenas laterales de proteínas conteniendo lisina, arginina, histidina, prolina y treonina son altamente sensibles a la oxidación catalizada por metales resultando en la formación de derivados carbonilos (grupos aldehídos y cetonas), los cuales pueden ser generados a través de vías de glicoxidación, peroxidación lipídica, α -amidación, etc. Debido a esta variedad de mecanismos, el nivel de proteínas carboniladas es usado como marcador de oxidación proteica y estrés oxidativo. El secuestro de un hidrógeno del grupo tiol de una cisteína lleva a la formación de puentes disulfuros y a un plegamiento anormal de proteínas que de manera análoga a la activación de ASK1, este anormal plegamiento lleva a la pérdida de la función de la proteína, a la agregación y a la muerte celular. El radical peroxinitrito (ONOO⁻) puede reaccionar con residuos tirosina y formar nitrotirosina que a niveles fisiológicos puede ser un proceso selectivo y reversible pero a niveles mayores son perjudiciales (Trachootham et al. 2008; Burton and Jauniaux 2011a).

1.2.5.4 Oxidación de ADN

El ADN puede ser menos susceptible a la oxidación comparada con proteínas y lípidos debido a su estructura de doble hélice y al escudo protector dado por las histonas y otras proteínas de revestimiento, sin embargo el daño oxidativo al ADN nuclear es detectable bajo ciertas condiciones. Las bases púricas, pirimídicas y azúcares que contienen N y O en su estructura actúan como centros nucleofílicos y son altamente susceptibles a reaccionar con electrófilos especialmente HO[•]. Los radicales ONOO^{-•} y NO[•] reaccionan con bases del ADN e inducen las roturas de simple cadena. Los ataques contra los hidratos de carbonos pueden causar la ruptura de cadenas, mientras que a nivel de las histonas pueden llevar a entrecruzamiento e interferir con el plegamiento de la cromatina, la reparación del ADN y la transcripción, resultando en una expresión génica aberrante (Trachootham et al. 2008).

1.3 PLACENTA

La placenta es un órgano transitorio que se forma durante el embarazo para mantener el crecimiento y desarrollo del embrión-feto. Cumple una multitud de roles críticos para la protección del feto en desarrollo. Es una barrera semipermeable que separa la madre y el feto y regula el intercambio de nutrientes, gases, desechos y moléculas endógenas y exógenas entre las circulaciones fetal y materna. Sirve como un órgano endócrino produciendo varias hormonas asociadas al embarazo y factores de crecimiento y asegura la protección del feto del ataque inmune materno. También interfiere con el ingreso de drogas al feto ya que expresa transportadores de membrana y enzimas que participan en el metabolismo de xenobióticos. El desarrollo de estrategias para entender el rol de la placenta contra el ingreso de drogas es un desafío en toxicología (Ji et al. 2013)(.

1.3.1 Desarrollo

El desarrollo de la placenta humana comienza cuatro días posterior a la fecundación cuando un grupo de células embrionarias indiferenciadas inicia una división celular asimétrica y da origen al blastocisto que contiene dos poblaciones diferentes de células, la masa celular interna que origina al embrión y la externa o trofoblasto (TS) que consiste de células madres que establecen contacto estrecho con la mucosa uterina y forman la placenta. La implantación del blastocisto en el útero, hecho que ocurre en el sexto o séptimo día posterior a la fecundación, requiere de la interacción entre el trofoblasto y el endometrio (Benirschke et al. 2012). En la **implantación**, el blastocisto penetra en el epitelio luminal, atraviesa la lámina basal y se inserta en el estroma. Durante la implantación el trofoblasto comienza a invadir el tejido materno iniciando el proceso de vascularización con el fin de mantener un sistema vascular feto-placentario. Simultáneamente tiene lugar la remodelación vascular materna para generar la circulación útero-placentaria. Para que la **placentación** ocurra exitosamente es requerida una sincronización de la

vasculogénesis, angiogénesis y función trofoblástica, llevadas a cabo por numerosos factores que actúan por mecanismos autócrinos y parácrinos (Lunghi et al. 2007). En este estadio del desarrollo, el trofoblasto está unido al embrión mediante un pedúnculo de fijación que dará lugar al cordón umbilical.

Tanto la implantación como la placentación producen un cambio significativo en las características de la pared uterina en respuesta a diferentes moléculas moduladoras. Esta transformación, denominada decidualización consta de una serie de eventos destinados a crear un ambiente propicio para recibir al **blastocisto** y permitir el desarrollo embrio-fetal. La transformación del endometrio a **decidua** consiste en la modificación de células del estroma endometrial, glándulas uterinas, vasos sanguíneos y células inmune uterinas. Se cree que la decidualización regula la invasión trofoblástica subsecuente y la formación de la **placenta** por alteración en la expresión de factores reguladores tales como metaloproteinasas, citoquinas, integrinas de superficie y moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad. El trofoblasto, a su vez, libera señales parácrinas las cuales modulan la expresión génica de las células deciduales del estroma (Lunghi et al. 2007).

1.3.2 Diferenciación del trofoblasto

Las células TS constituyen el primer linaje celular que exhibe una función altamente diferenciada durante el desarrollo del embrión (Fig. 16).

Las células citotrofoblásticas (CTB) primitivas indiferenciadas que derivan de las TS dan lugar a dos tipos celulares (Bischof and Irminger-Finger 2005; Ji et al. 2012). Los CTBs vellosos (CTBv) que fusionan dando lugar al sinciciotrofoblasto (STB) multinucleado que cubre la vellosidad flotante, la cual está rodeada de sangre materna. El STB es responsable del transporte de proteínas y de la producción de hormonas tales como la gonadotrofina coriónica (hCG) y lactógeno placentaria, que participan en la homeostasis del embarazo (Lunghi et al. 2007).

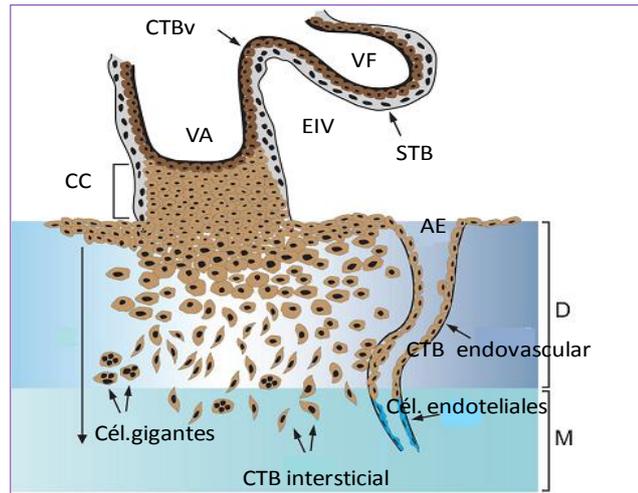


Figura 16. Diferenciación del trofoblasto humano: (VA) vellosidad de anclaje, (CTBv) citotrofoblasto veloso, (D) decidua, (M) miometrio, (AE) arteria espiralada, (CC) células columnares, (EIV) espacio intervelloso, (STB) sinciotrofoblasto, (VF) vellosidad flotante (Knöfler 2010).

Está involucrado en el intercambio de gases, nutrientes y desechos a través de la interfase materno-fetal. La capacidad absortiva de esta capa celular está maximizada por la presencia de microvellosidades que incrementan considerablemente la superficie. Además exhibe un alto grado de tolerancia inmunológica dada por la falta de expresión de los antígenos leucocitarios humanos clase I (Nakamura 2009). La fusión CTB-STB es un proceso fisiológico específico de la placenta que se inicia con modificaciones de la membrana plasmática de ambas células tales como expresión de sincitina, caderina 11, fosfatidilserina y conexina 43, entre otras (Gauster et al. 2009). Este mecanismo de fusión permite mantener el “turn over” del STB el cual es no proliferativo, cuyos núcleos apoptóticos son liberados en los llamados “knots” sinciciales (Gauster et al. 2009). Recientemente se ha reportado que la apoptosis y liberación de fragmentos del STB no ocurre espontáneamente sino como consecuencia de apoptosis e injuria inducida por un insulto en una región localizada del STB (Longtine et al. 2012). Los CTBs extravelosos (CTBv) proliferan para formar el vello de anclaje y unen la placenta a la pared uterina (Knöfler 2010). Parte de estas células llamadas columnares se liberan y migran a la decidua. Una subpoblación de estas células (células trofoblásticas intersticiales) invade el endometrio hasta el primer tercio del miometrio anclando el feto a la madre. Estas células se diferencian en células gigantes en las zonas más profundas del lecho placentario (Knöfler 2010). Otra

subpoblación adquiere características similares a las células endoteliales (células trofoblásticas endovasculares). Dichas células penetran en las arterias uterinas espiraladas y reemplazan a las células endoteliales maternas. Estas modificaciones resultan en el mayor diámetro de los vasos que inician y sostienen el flujo sanguíneo dentro del espacio intervelloso, necesario para mantener los requerimientos de crecimiento del feto (Knöfler 2010; Wang 2010). Recientemente se ha sugerido la existencia de otra subpoblación de CTBev, denominados endogandulares que participarían en el remodelado de las células glandulares abriendo las glándulas uterinas al espacio intervelloso generando un mecanismo de nutrición histiotrófica al embrión (Fitzgerald et al. 2010; Moser et al. 2010).

La diferenciación del trofoblasto está regulada por factores ambientales, tales como la tensión de oxígeno en la interfase materno-fetal y por varias hormonas y factores de crecimiento, incluidos los miARNs (Ji et al. 2013). La concentración de O₂ es crítica ya que la hipoxia promueve la proliferación trofoblástica y la normoxia la inhibe e induce la migración celular (James et al. 2006). La desregulación de las actividades del trofoblasto, especialmente por defectos en la invasión de los CTBev y la subsiguiente falla en el remodelado de las arterias espiraladas son mecanismos que subyacen al desarrollo de la preeclampsia, un desorden asociado al embarazo caracterizada por hipertensión y proteinuria.

1.3.3 Función de la placenta

La implantación y placentación humana es un proceso único entre las especies mamíferas. La placenta humana es hemocorial y se caracteriza por el contacto directo entre la sangre materna y el trofoblasto. Funcionalmente se divide en unidades vasculares llamadas cotiledones, cada **cotiledón** está formado por un árbol velloso o vellosidades coriónicas, que actúan de barrera separando la circulación materna de la circulación fetal. Cada vellosidad está compuesta por estroma velloso, CTB, STB y por el endotelio de los capilares fetales (Fig. 17). Durante la gestación el espesor del STB

disminuye, el CTB se vuelve discontinuo y los procesos de intercambio entre la madre y el feto se facilitan (van der Aa EM et al. 1998).

Como se mencionó, la placenta es un órgano altamente permeable a sustancias químicas que atraviesan desde la sangre materna al feto. Esta barrera formada por el STB, tiene la membrana de las microvellosidades en borde de cepillo en contacto directo con la sangre materna, constituyendo la cara apical de la membrana plasmática del STB. En la cara baso-lateral, la membrana carece de microvellosidades contactando con la circulación fetal. Ambas membranas además de ser estructuralmente distintas, difieren en la localización de los transportadores, enzimas y receptores hormonales (Prouillac and Lecoeur 2010).

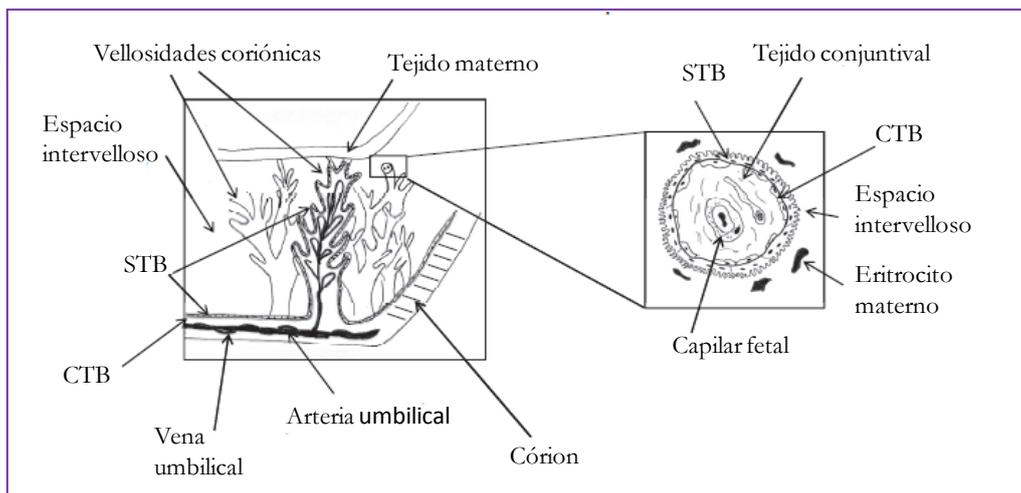


Figura 17. Esquema de la localización y estructura de la barrera placentaria humana (Prouillac and Lecoeur 2010).

Las embarazadas están expuestas a una amplia variedad de agentes químicos. La exposición más frecuente proviene de la administración de medicamentos, factores relacionados al estilo de vida, tales como el cigarrillo, drogas de abuso, consumo de alcohol o factores ambientales y ocupacionales. La exposición ambiental varía geográficamente entre la población urbana y rural. Por lo que el feto está expuesto no solo a los xenobióticos que incorpora la madre en forma voluntaria sino también a los provenientes de los alimentos, del agua y del medio ambiente. En consecuencia el ambiente químico del feto está regulado por la acción de transportadores y de enzimas

biotransformadoras que selectivamente transportan y remueven compuestos químicos.

1.3.4 Enzimas del metabolismo de xenobióticos en placenta

La capacidad de biotransformación de la placenta representa del 2 al 3,3 % de la capacidad hepática (Rama Sastry 1998). Posee enzimas metabolizantes de fase I y II (Marin et al. 2004; Pasanen 1999). Las distintas isoformas de CYP varían con el desarrollo de la función placentaria, el tiempo de gestación y el estado de salud materno (Hakkola et al. 1996a; Hakkola et al. 1996b). Si bien la **placenta humana** expresa una variedad de ARNm de enzimas metabolizantes de xenobióticos durante el primer trimestre y en placenta a término, unas pocas son funcionalmente activas en el primer trimestre, mientras que sólo se demostró la inducción de CYP1 A1 en placentas a término de mujeres expuestas laboralmente a contaminantes medioambientales. De las enzimas de metabolización de fase II involucradas en la detoxificación de organofosforados, se ha detectado expresión de las enzimas GST, sulfo transferasas y UDP glucuronil transferasas (Myllynen et al. 2005) (Anexo 1-Tablas III y IV).

1.3.5 Transportadores y bombas de eflujo

La placenta humana expresa un gran número de proteínas transportadores (Ni and Mao 2011; Vähäkangas and Myllynen 2009). Dependiendo de la localización y función de estos transportadores pueden incrementar o disminuir la transferencia de xenobióticos a través de la placenta hacia la circulación fetal. La expresión difiere en la cara apical o basal de la membrana del STB originando un transporte polarizado. Esta complejidad aumenta por el hecho de que las células de los capilares fetales también poseen transportadores. Numerosos estudios sugieren que varios transportadores ABC (del inglés, ATP binding cassette) disminuyen la exposición fetal a xenobióticos (Myllynen et al. 2007). En el Anexo I-Tabla V se resume los transportadores placentales de xenobióticos y su distribución polarizada en la placenta.

1.3.6 Sistema colinérgico placentario

La placenta humana, un tejido no-neuronal, contiene un activo sistema colinérgico que incluye ACh, colina acetiltransferasa (ChAT), AChE y receptores muscarínicos y nicotínicos de ACh (mAChR y nAChR)(Bhuiyan et al. 2006; Fant and Harbison 1981; Lips et al.2005).

La ACh es sintetizada por la enzima ChAT a partir de colina y acetil coenzima A e hidrolizada por AChE en colina y acetato. A diferencia de lo que ocurre en las neuronas colinérgicas, la ACh no se encuentra almacenada en vesículas sino que se sintetiza y libera cuando es necesario. La colina es transportada desde el espacio extracelular al interior de la célula por dos subtipos de transportadores catiónicos orgánicos poliespecíficos, OCT1 y OCT3 (Wessler and Kirkpatrick 2008).

La ChAT se observó principalmente dentro del CTB de placentas pretérmino y en células mesenquimales de igual manera que la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), sugiriendo que la ACh puede interactuar con las vías de señalización dependientes de óxido nítrico (ON). Usando como modelo células BeWo derivadas de coriocarcinoma humano y un agonista de ACh se demostró la habilidad de este agonista para incrementar significativamente el Ca^{2+} intracelular y la producción de ON en presencia de estradiol. Este efecto fue revertido por un inhibidor de mAChR, sugiriendo que actúa vía receptores muscarínicos. Estas interacciones sugieren un rol fisiológico relevante en la interfase materno-fetal, apoyando la hipótesis de que el sistema colinérgico placentario interactúa con el ON y vías de señalización de estrógenos para regular el crecimiento y/o la función placentaria (Bhuiyan et al.2006).

Además la ACh actúa como molécula de señalización vía nAChR regulando el transporte de nutrientes, el flujo y volumen sanguíneo en vasos placentarios y la vascularización durante el desarrollo de la placenta (Kawashima and Fujii 2008).

1.3.7 Mecanismos generadores de especies reactivas en la placenta

Se reconocen diversos mecanismos fisiológicos generadores de especies reactivas durante la gestación (Myatt and Cui 2004). Entre ellos cabe señalar a la

cadena transportadora de electrones en las mitocondrias, la cual produce $O_2^{\bullet-}$ y es considerada una potencial fuente de peróxidos lipídicos. Diversos autores sostienen que el estrés oxidativo presente en la gestación, es debido en parte al incremento de la masa mitocondrial a medida que transcurre la gestación (Casanueva and Viteri 2003).

Otro mecanismo de generación de $O_2^{\bullet-}$ está mediado por el aumento en la actividad de la enzima xantina oxidasa localizada en las células endoteliales, estroma y vellosidades de la placenta. Este aumento es coincidente con el período de reperusión de la misma, en el cual se demuestra además un aumento de nitrotirosina en el trofoblasto y la activación de varias vías de apoptosis (Hung and Burton 2006).

También se registra una mayor actividad de la enzima NADPH oxidasa entre las semanas 7 y 13 de gestación coincidente con la mayor expresión de la misma en el CTB y microvellosidades. Esto lleva a hipotetizar que las NADPH oxidasas pueden contribuir a la diferenciación y proliferación del trofoblasto (Poston and Raijmakers 2004).

La expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) en el STB, y la NOS tipo II u óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), que se expresa en las células de Hofbauer (macrófagos placentarios), generan óxido nítrico, el cual es un potente vasodilatador de la vasculatura placentaria manteniendo el tono vascular basal y atenuando la acción de los vasoconstrictores (Ghabour et al. 1995; Myatt et al. 1997).

1.3.8 Moléculas antioxidantes

En la placenta humana se ha demostrado la actividad de enzimas antioxidantes tales como MnSOD, Cu-ZnSOD, CAT, GPx, GST, y tiol-sulfuro oxidorreductasas, además de la presencia de antioxidantes no enzimáticos endógenos como el GSH y exógenos como las vitaminas E y C (Myatt and Cui 2004).

Coincidente con el establecimiento de la circulación útero-placentaria se ha demostrado un aumento en la expresión de genes de las enzimas antioxidantes CAT, GPx y SOD por lo que se lo considera como un mecanismo de respuesta adaptativa del tejido placentario (Wand and Walsh 1996).

1.3.9 El rol del oxígeno en la regulación de la invasión del trofoblasto

La hipoxia fisiológica que caracteriza al primer trimestre de la gestación (semana 10 de la gestación), con niveles de presión de O₂ menores a 20 mm Hg, ejerce un efecto regulatorio en el desarrollo y función del tejido placentario, influenciando la proliferación, diferenciación e invasión del trofoblasto (Ji et al.2013; Genbacev et al. 1997), así como la vasculogénesis de las vellosidades (Charnock-Jones and Burton 2000). La hipoxia actúa modificando la expresión de genes y estabilidad de ARNm (Caniggia et al. 2000). Por ejemplo, estimula la expresión del factor inducible por hipoxia (HIF1 α) el cual mantiene la proliferación y del factor de transcripción Hash-2 que previene la diferenciación. Se ha reportado un efecto inhibitorio de la hipoxia sobre la invasión del CTBev. Además el balance oxidativo influencia la diferenciación del CTBv y la función del CTBev afectando la sobrevivencia y el desarrollo del embrión.

Se sabe que la hipoxia de las células madre embrionarias induce la expresión génica de HIF1 α que, a su vez, activa varios genes involucrados en proliferación / diferenciación y respuestas celulares adaptativas a la baja disponibilidad de O₂(Ramirez-Bergeron et al.2004). El ambiente hipóxico, en el cual el embrión se desarrolla en el embarazo temprano puede servir para proteger los tejidos fetales y los procesos de desarrollo contra los efectos nocivos de las ROS durante las fases críticas de la embriogénesis y organogénesis. Esta protección es potenciada por la existencia de mecanismos de defensa antioxidante interno y externo. Los primeros comprenden principalmente enzimas antioxidantes como la SOD, GPx y gamma-glutamylcisteína sintetasa. Mientras que los mecanismos de defensa externos están representados por los antioxidantes no enzimáticos tales como hipotaurina, taurina y ácido ascórbico (Guérin et al. 2001; Jauniaux et al. 2003b).

Por otro lado, se cree que un inicio prematuro y generalizado de la circulación placentaria materna, antes del desarrollo de la defensa antioxidante en la placenta, está correlacionado con daño oxidativo del trofoblasto y podría representar una de las causas de la pérdida temprana del embarazo (Jauniaux et al. 2003a). La demostración que concentraciones fisiológicas de ROS ejercen efectos beneficiosos ha llevado a la formulación de la "teoría del desarrollo de radicales libres". Según esta teoría, el

desarrollo de los organismos puede estar influenciado por suministros diferenciales de O_2 y/o gradientes en el estado redox intracelular (Allen and Balin 1989). De hecho, se sabe que concentraciones bajas de ROS estimulan la proliferación celular, así como la expresión génica, y se ha sugerido que las acciones favorables de las ROS pueden estar relacionadas con el control de la reacción inflamatoria local. Se hipotetiza que altas concentraciones de ROS pueden iniciar y propagar un proceso inflamatorio resultando en una apoptosis del tejido placentar.

El flujo de sangre materna está limitado para ingresar a la placenta hasta la semana 8-9 de gestación debido a la oclusión en la punta de las arterias uteroplacentarias por células trofoblásticas endovasculares ocasionado por una incompleta remodelación de las arterias espiraladas (Fig. 18)(Genbacev et al. 1997; Jauniaux et al. 2003b). La pérdida de estos tapones celulares luego de la semana 10-12 permite establecer la circulación intervéllosa y la presión de O_2 se eleva hasta 40-80 mm Hg. Esta tensión en el espacio intervéllosa disminuye gradualmente desde el segundo al tercer trimestre, alcanzando aproximadamente 40 mm Hg en el tercer trimestre debido al aumento del consumo de O_2 fetoplacentario.

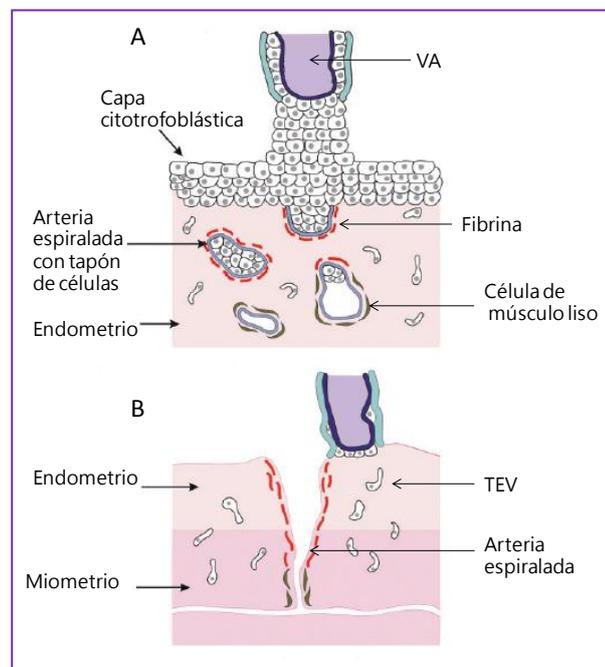


Figura 18. Diagrama de la interfase útero-placentaria A: primer trimestre, B: segundo y tercer trimestre de gestación. (VA) velloso de anclaje, (TEV) trofoblasto extra vellosos (Jauniaux et al. 2006).

Al final del primer trimestre, como consecuencia del ingreso de altas concentraciones de O₂ se produce un estallido de estrés oxidativo que se evidencia en la periferia de la placenta temprana (Jauniaux et al. 2000), esto ocurre en un estadio de la gestación cuando el trofoblasto posee bajas concentraciones y actividad de enzimas antioxidantes, provocando un daño oxidativo local que lleva a la degeneración progresiva de vellosidades disparando la formación de las membranas fetales, esenciales para permitir el parto vaginal (Jauniaux et al.2003b).

Además, el estrés oxidativo estimula la síntesis de estrógenos y de la hormona hCG cuya concentración sérica alcanza el pico máximo al finalizar el primer trimestre. La enzima CYP19 involucrada en la síntesis de estrógenos, es regulada a nivel transcripcional por O₂, lo cual justificaría el aumento significativo de esta hormona al comienzo del segundo trimestre (Mendelson et al. 2005). Como se mencionó, la placenta se adapta a estos cambios en los niveles de O₂ por modulación del HIF1 α y por incremento de la defensa antioxidante celular (Carter 2000). HIF1 α regula la expresión de genes requeridos para la adaptación celular a bajas concentraciones de O₂, además puede regular la proliferación celular y la apoptosis mediada por genes tales como p53, p21 y Bcl2 (Majmundar et al. 2010).

Finalmente otra etapa de la gestación que cursa con estrés oxidativo fisiológico es la que implica el fenómeno de isquemia-reperfusión que ocurre durante las contracciones uterinas. Este estímulo crónico podría tener un efecto regulador de la defensa antioxidante (Hung et al. 2001).

1.3.10 Efectos de los organofosforados en la placenta

El sistema colinérgico de la placenta demostró ser un blanco sensible a la exposición a OFs tanto en animales de experimentación como en humanos. Se demostró que una sola dosis cutánea del OF metilparatió administrada a ratas preñadas disminuyó la actividad de la AChE en placenta (Abu-Qare and Abou-Donia 2001). Sin embargo, como se mencionó, esta enzima aumentó durante el periodo de aplicación de OFs en la exposición subcrónica de residentes rurales, sugiriendo una

respuesta adaptativa (Rovedatti et al. 2012; Souza et al. 2005). Por otra parte, el análisis inmunohistoquímico de placentas de ratas expuestas a dosis subletales de metilparatión demostró disminución en la expresión de los receptores mAChR M1 y M2 respecto al grupo control (González-García et al. 2008). Estos hallazgos indican que podrían afectarse las funciones colinérgicas de la placenta por exposición a OFs.

También ha sido reportado el impacto de OFs en la morfología de la placenta. Mediante un análisis morfométrico de placentas obtenidas de mujeres residentes en zonas agrícolas, expuestas a plaguicidas anticolinesterásicos, se determinó que el índice de madurez placentaria fue mayor en la región central que en zonas periféricas comparadas con el de mujeres no expuestas, cuyos índices fueron similares en ambas regiones. Se ha sugerido que una alteración en la concentración de ACh, la cual podría estar relacionada con el desarrollo de las vellosidades terminales y/o los vasos sanguíneos, precedería a las alteraciones morfológicas observadas (Acosta-Maldonado et al. 2009). Además, en algunas placentas de mujeres expuestas ambientalmente al plaguicida metilparatión, se observaron mediante microscopía electrónica, alteraciones como microinfartos, microcalcificaciones y depósito de material fibrinoide junto a una mayor proporción de características atípicas de las vellosidades (Levario-Carrillo et al. 2001). Estos autores también reportaron en placentas de ratas expuestas oralmente a metilparatión múltiples alteraciones en células trofoblásticas y deciduales, aumento del número de vacuolas fagosómicas en las células, áreas hemorrágicas y fibrosadas en la decidua y persistencia de células inmaduras en circulación fetal, entre otras (Levario-Carrillo et al. 2004).

En un estudio realizado en la zona del Alto Valle de Río Negro, se demostraron cambios en el perfil lipídico de la fracción nuclear y mitocondrial liviana correspondiente al STB de placentas provenientes de mujeres residentes rurales expuestas a OFs. Dichos cambios resultan compatibles con eventos proliferativos (Vera et al. 2012).

1.3.11 Patologías del embarazo: sistemas experimentales de estudio

La perturbación de las funciones del trofoblasto puede ocasionar una variedad de complicaciones del embarazo como malformación, retraso del crecimiento fetal, aborto espontáneo y muerte fetal. Por ejemplo, una invasión limitada del trofoblasto por los vasos maternos se ha correlacionado con preeclampsia y restricción del crecimiento fetal, mientras que una invasión excesiva del trofoblasto se asocia con mola invasiva, placenta acreta y coriocarcinoma (Bernirchke 2006).

Además, como se mencionó, las embarazadas están expuestas a una amplia variedad de agentes químicos. Estos compuestos pueden interferir con la función placentaria a diferentes niveles: en las vías de señalización, en la producción y liberación de hormonas y enzimas, en el transporte de nutrientes y productos de desecho, en la implantación, crecimiento celular y maduración y finalmente, en la fase terminal de la vida placentaria/ parto. Por lo tanto, cualquier desviación del desarrollo normal puede constituir una amenaza potencial para la función placentaria, resultando en partos prematuros, malformaciones congénitas o aborto en el peor de los casos. Sin embargo, es bien sabido que la placenta tiene una capacidad de reserva sustancial modulando estos efectos tóxicos. En lo que respecta a la toxicología placentaria, hay dos áreas principales de investigación, una de ellas estudia los cambios que se producen en los xenobióticos una vez ingresados en el tejido placentario y la otra estudia las modificaciones anatómicas y / o funcionales que se producen en el mismo como consecuencia de la exposición a xenobióticos.

Para abordar estos temas numerosos modelos *in vitro* utilizando tejidos placentarios humanos y animales se han desarrollado en las últimas décadas (Bode et al. 2006; Correia Carreira et al. 2011; Evseenko et al. 2006; Glazier and Sibley 2006). Los estudios en animales dan información valiosa acerca de los efectos y la cinética de compuestos químicos en la unidad feto-placentaria. En los últimos años, los modelos animales “knockout” han proporcionado nuevos conocimientos sobre la importancia de los transportadores placentarios en estudios de toxicidad del desarrollo. Los modelos animales que imitan la situación humana se basan fundamentalmente en la organización histológica hemocorial de la placenta en roedores y primates. Es importante considerar las diferencias entre especies en lo que respecta a permeabilidad placentaria, actividad de transporte, patrones de flujo de sangre y las

actividades metabólicas (Enders and Blankenship 1999). Por otra parte, la estructura placentaria sufre cambios durante el embarazo (Panigel 1986). Por lo que, dependiendo de la especie, los productos químicos y toxinas pueden interferir diferentemente en el desarrollo placentario. También puede haber cambios en la función placentaria debido a la exposición a sustancias químicas durante los diferentes períodos de la gestación. Por lo tanto, las diferencias entre las especies deben tenerse en cuenta en los intentos de extrapolar los resultados a los seres humanos.

Los modelos *in vitro* procedentes de placenta humana constituyen una opción atractiva porque este órgano resulta fácilmente disponible para estudios experimentales (Hutson et al. 2011). Los métodos varían desde la utilización de fracciones subcelulares aisladas, líneas celulares establecidas originadas de placenta humana, cultivo de células primarias aisladas de placenta humana, cultivos de explantos placentales a modelos de perfusión placentaria.

La perfusión placentar humana retiene la estructura, incluyendo la polarización de la célula del STB por lo cual es un modelo válido para estudios de transporte placentar. Los sistemas basados en el modelo de líneas celulares establecidas originadas de placenta humana han demostrado ser herramientas útiles para el estudio de expresión y función de proteínas transportadoras, así como del metabolismo de xenobióticos. Las líneas celulares comúnmente utilizadas en investigación toxicológica son las BeWo, JAR y JEG-3, las cuales están disponibles desde hace más de 30 años (Kohler and Bridson 1971; Patillo and Gey 1968; Patillo et al. 1971). El cultivo de células primarias aisladas de placenta humana es utilizado rutinariamente en algunos laboratorios. Sin embargo, comparado con el uso de líneas inmortalizadas, es un método laborioso. El procedimiento incluye una digestión con tripsina del vello placentar seguida por pasos de purificación (Kliman et al. 1986). Además se debe considerar que los trofoblastos primarios no proliferan en cultivo, lo que es una desventaja importante. Por otro lado, las células primarias claramente tienen la ventaja de representar a las células normales, mientras que las líneas celulares son provenientes de coriocarcinoma.

Los cultivos de explantos placentarios humanos han sido ampliamente utilizados en la investigación placentaria. Los primeros estudios se centraron en

transporte placentario, metabolismo y función endocrina pero también se ha utilizado para otros fines, como es el estudio de la proliferación celular y diferenciación (Genbacev et al. 1992; Orendi et al. 2011). Los tejidos placentarios usados para los experimentos han sido principalmente de primer y tercer trimestre. De manera similar a la situación in vivo, los explantos vellosos contienen múltiples tipos celulares además de células trofoblásticas incluyendo células del estroma mesenquimales (miofibroblastos, fibroblastos, células musculares lisas), células endoteliales, células de la sangre y las células inmunes placentarias, lo cual es una ventaja para este sistema (Miller et al., 2005). Del mismo modo a las células trofoblásticas primarias, los explantos vellosos pueden utilizarse para estudiar los mecanismos de transferencia transplacentaria, así como la regulación de los transportadores y enzimas del metabolismo de xenobióticos. Sin embargo, porque no poseen una membrana continua no son útiles para el estudio de transporte transplacental.

En relación al uso de sistema libre de células, este incluye homogenato total o fracciones subcelulares, (citosólicas, microsomas) utilizados ampliamente en estudios del metabolismo de xenobióticos (Partanen et al. 2010; Vähäkangas et al. 1989).

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

La alteración del balance redox y el estrés oxidativo placental se asocian a diversas complicaciones de la gestación (Al-Gubory et al. 2010; Burton and Jauniaux 2011b; Burton et al. 2009). Además se ha sugerido que el estrés oxidativo puede ser el vínculo clave entre insultos adversos y la programación fetal (Luo et al. 2006; Merlot et al. 2008). Teniendo en cuenta la alta vulnerabilidad de esta etapa y considerando que la placenta es una matriz de fácil acceso, se planteó la siguiente hipótesis de trabajo:

“La exposición a plaguicidas OFs impacta sobre el balance redox de la placenta con consecuencias que pueden abarcar desde una respuesta adaptativa de las enzimas de la defensa antioxidante hasta la injuria y muerte celular”.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Considerando que el balance redox representa una pieza clave en la fisiopatología placentaria y que existen escasos antecedentes referidos al impacto del estrés oxidativo en la exposición a OF, este plan de tesis tuvo los siguientes objetivos:

3.1 Objetivo General

Analizar el efecto de plaguicidas OFs en el estado redox de la placenta y en cultivos de células trofoblásticas y su asociación con los mecanismos de respuesta al estrés oxidativo.

3.2 Objetivos Específicos

En el presente trabajo de tesis se utilizó como modelo de *estudio poblacional* homogenato de placentas provenientes de mujeres expuestas ambientalmente a OFs y como modelo *in vitro* la línea celular JEG-3 derivada de coriocarcinoma humano. Para el primer modelo se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Estudiar si los OFs modifican la actividad del CaE.
- ✓ Analizar el efecto de la exposición a OFs sobre los niveles de GSH, peróxidos lipídicos y carbonilación de proteínas.
- ✓ Estudiar el efecto de la exposición a OFs sobre la actividad de enzimas de la defensa antioxidante CAT y GPx.
- ✓ Estudiar el efecto de la exposición a OFs sobre los niveles de expresión del factor de transcripción Nrf2.

Los objetivos planeados en el modelo de células JEG-3 fueron:

Estudiar el efecto de CPF sobre:

- ✓ la actividad de AChE en ausencia y presencia de un antioxidante.

- ✓ la generación de ROS.
- ✓ los niveles de GSH.
- ✓ la actividad de la enzima antioxidante CAT.
- ✓ la expresión del factor de transcripción Nrf2, a nivel de proteína y ARNm.
- ✓ la transcripción de los genes de respuesta antioxidante HO-1, GR y SOD1.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Estudio poblacional

4.1.1 Diseño experimental

El diseño del estudio de corte transversal se realizó en una población de la zona del alto Valle del Río Negro y Neuquén. Las características de esta región hacen que la producción agrícola sea el principal recurso económico de la provincia. Por ello en los valles se observan grandes plantaciones frutales predominando las de pepitas como manzanas y peras. Como se citó en 1.1.3.3, paralelo al inicio del riego y por un período próximo a la recolección de los frutos, se aplican diversos plaguicidas en su mayoría sobre la superficie foliar llegando al suelo entre el 20 y 50% (OMS. 1992) y dispersándose parte por el viento (Loewy et al. 2003). Las poblaciones cercanas a dichas plantaciones se encuentran expuestas en mayor grado. Los individuos más vulnerables a la exposición son mujeres embarazadas y niños, por lo que este estudio se realizó en 44 mujeres y sus neonatos residentes en zonas de chacras o comunidades aledañas a zonas de cultivo de la ciudad de General Roca. Fueron atendidas durante el parto en el servicio de Ginecología – Obstetricia y Neonatología respectivamente del Hospital F. López Lima de General Roca entre 2009 y 2011. Adicionalmente, se realizó el mismo procedimiento con 22 gestantes y sus neonatos de la ciudad de Neuquén atendidas en el Hospital Castro Rendón. Dicha población se consideró como grupo control sin historia previa de exposición a plaguicidas según autoreporte (ver Anexo II, ítem 1).

Se organizaron tres grupos para este estudio: **PP:** (período de pulverizaciones) grupo expuesto constituido por mujeres embarazadas residentes en zona rural y cuyos partos coincidieron con los meses de aplicación de plaguicidas (octubre – diciembre); **PR:** (período de receso) grupo no expuesto constituido por mujeres embarazadas residentes en zona rural cuyos partos coincidieron con los meses de receso de aplicación de plaguicidas (abril-agosto); **GC:** (grupo control) constituido por mujeres embarazadas residentes en la ciudad de Neuquén cuya parición ocurrió entre los meses de abril-agosto.

Se utilizaron criterios de inclusión- exclusión. Se incluyeron mujeres de 15 a 35 años con buen estado de salud general que asistieron al programa de atención prenatal. Se excluyeron mujeres obesas, diabéticas, con enfermedad tiroidea, cardíaca o hipertensión, fumadoras activas, alcohólicas, consumidoras de drogas de abuso, medicadas con fármacos que no se incluyan en el grupo A (según FDA, **F**ood, **D**rug **A**dministration), expuestas a Rayos X en el primer trimestre, con historia previa de eclampsia, pre-eclampsia o diabetes gestacional, con serología positiva para Chagas, HIV, toxoplasmosis y/o con cualquier enfermedad infecciosa. El muestreo fue al azar y quedó supeditado a la concurrencia al hospital por parte de las madres. Al momento del ingreso para la parición a los respectivos centros de atención, la obstétrica y los médicos obstetras solicitaron un consentimiento informado para la toma de muestras y realizaron una entrevista estandarizada para obtener información sobre hábitos y conductas de riesgo de las pacientes. La información requerida se registró en una planilla según Anexo II. Se registraron factores de confusión, cuya influencia sobre las variables de respuesta fue analizado estadísticamente. Los datos morfométricos de los neonatos se obtuvieron de las historias clínicas de los mismos y el peso de la placenta en balanza pediátrica.

4.1.2 Material biológico: Placenta

El tejido se recolectó de la cara materna de placentas a término en un radio de 5 cm respecto al cordón umbilical. Las muestras se recolectaron dentro de los veinte minutos posteriores al parto natural e inmediatamente se colocaron en N₂ líquido hasta su traslado al laboratorio donde se conservaron en freezer a -80 °C hasta su procesamiento.

4.1.3 Determinaciones analíticas en muestras de placenta

Previo a las determinaciones analíticas, el tejido placentar fue lavado al menos tres veces con solución salina tamponada (PBS, del inglés Phosphate Buffered Saline) hasta obtener un sobrenadante límpido e incoloro, se secó con papel de filtro y se

pesó, todos los pasos se realizaron en baño de hielo. Posteriormente, el tejido se homogeneizó como se indica en cada determinación analítica.

Las mediciones se hicieron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-Visible 1601 con termoestabilizador Shimadzu TB-85. Las actividades registradas fueron expresadas en función de la concentración de las proteínas (Lowry et al. 1951). Todas las determinaciones se hicieron por triplicado. Se calculó el tamaño muestral requerido para detectar cambios significativos en las variables analíticas en estudio ($p < 0,05$).

4.1.3.1 Biomarcador de exposición a organofosforados

4.1.3.1.1 Carboxilesterasa

La actividad enzimática CaE (EC 3.1.1.1) se determinó según la técnica colorimétrica de Morgan y col. El método utiliza como sustrato α -naftil acetato obteniéndose como producto de la hidrólisis α -naftol el cual reacciona con el colorante Fast Garner produciendo un compuesto coloreado cuya intensidad se lee a 550 nm (Morgan et al. 1994). Las condiciones de linealidad se habían establecido previamente en el laboratorio (Vera 2010).

Se homogeneizaron 60 mg de tejido en 1,25 ml de buffer fosfato 0,1M pH 6,5 conteniendo 0.5% Tritón X-100, se filtró y se centrifugó 10 min a 20000 g y 4 °C. Se realizó una dilución 1/10 del sobrenadante en buffer fosfato pH 6,5 sin Tritón. Se utilizaron para la reacción enzimática alícuotas de 200 μ l a las que se le agregó 400 μ l de una solución conteniendo α -naftil acetato 60 mM y 400 μ l de una solución acuosa del colorante Fast Garner 2,5 mM. La mezcla de reacción se incubó durante 10 min y posteriormente se determinó su absorbancia. Se utilizaron blancos de reactivos y de muestra. Para la curva de calibración se utilizaron diferentes cantidades de una solución estándar de α -naftol 6 mM. Los resultados se expresaron como mUI/mg de proteína.

4.1.3.2 Biomarcadores del estado redox

4.1.3.2.1 Enzimas del sistema antioxidante

4.1.3.2.1.1 Catalasa

La actividad de CAT (EC1.11.1.6) se determinó según la técnica de Beers basado en la siguiente reacción

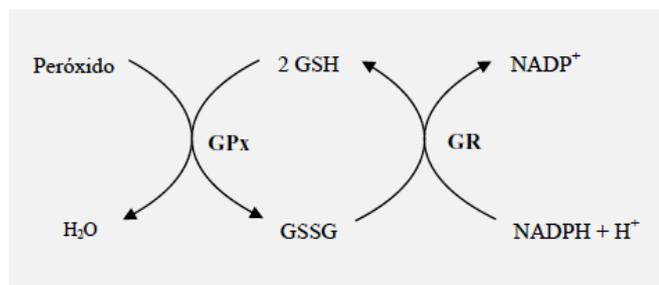


registrando espectrofotométricamente de manera continua la disminución de la absorbancia del peróxido de hidrógeno a 240 nm (Beers and Sizer 1952).

Para tal fin se homogeneizaron 60 mg de tejido en 2,5 ml de buffer fosfato 50 mM pH=7. El homogenato se filtró y centrifugó 5 min a 2600 g y 4 °C. La reacción se efectuó en cubeta de cuarzo agregando 1 ml del sobrenadante (conteniendo 0,1 mg de proteínas) y 40 µl de H₂O₂ 25 mM a una temperatura constante de 25 °C. El delta de absorbancia se dividió por la concentración inicial del sustrato y para calcular la actividad específica de CAT se utilizó el coeficiente de absortividad molar del peróxido de hidrógeno (40 M⁻¹cm⁻¹). Se expresó como UI/miligramo de proteínas del tejido. Una UI de CAT se define como la cantidad de enzima que descompone 1 µmol de sustrato por minuto a 25 °C. Las condiciones de linealidad se habían establecido previamente en el laboratorio (Souza 2005).

4.1.3.2.1.2 Glutación peroxidasa dependiente de selenio

La actividad de glutación peroxidasa (EC 1.11.1.9) se determinó según el método modificado de Di Ilio que se basa en las siguientes reacciones:



El peróxido es reducido mediante la reacción catalizada por la GPx, en la cual el GSH actúa como donante de hidrógeno; a continuación el GSSG se reduce de nuevo, es decir, es regenerado por reacciones subsiguientes, mediante una reacción en la que participan la GR y un donante de hidrógeno (NADPH+H⁺)(Di Ilio et al.1983). El consumo de NADPH se registra midiendo la disminución de absorbancia a 340 nm. Para ello, se homogeneizaron 300 mg de tejido en 1,2 ml de buffer fosfato de sodio 50 mM pH=7,4. El homogenato se filtró y centrifugó 20 min a 10000 g a 4 °C. La reacción enzimática se realizó en una cubeta conteniendo 0,3 mM de H₂O₂, como sustrato, en 1 ml (volumen final) de buffer fosfato de sodio y GSH 1 mM como cosustrato, 0,5 UI/ml de GR, 0,21 mM de NADPH y 1 mM de azida sódica como inhibidor de CAT. La reacción se inició con el agregado de 50 µl de sobrenadante del homogenato registrando en forma continua la oxidación de NADPH a 37 °C. La actividad de la enzima se expresó como mUI/mg de proteína. Para los cálculos se utilizó el coeficiente de extinción molar del NADPH ($\epsilon = 5,8857 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Para trabajar en condiciones de linealidad, se realizó una curva de actividad de GPx en función de la concentración de proteínas del sobrenadante. La elección de la alícuota de 50 µl (0,266 mg de proteína) para la determinación enzimática (Fig. 19) se hizo en base a un compromiso entre mantener las condiciones de linealidad y la disponibilidad de la muestra.

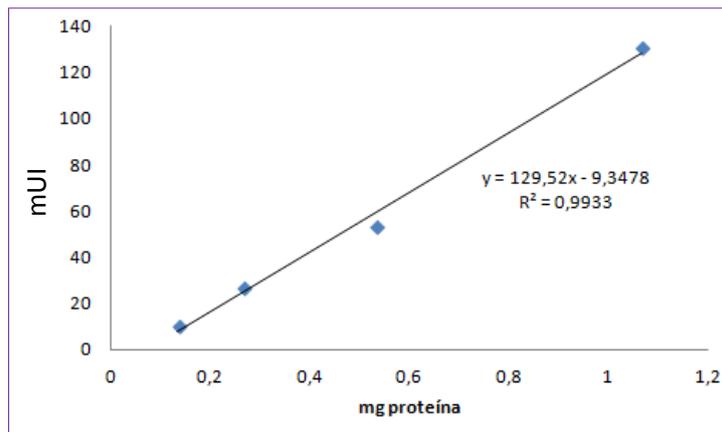


Figura 19. Actividad enzimática en función del contenido de proteínas del sobrenadante 10000 g.

4.1.3.2.2. Sistema antioxidante no enzimático

4.1.3.2.2.1 Glutatión

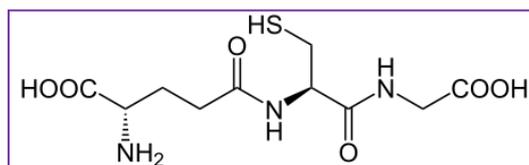


Figura 20. Fórmula estructural del glutatión

El contenido de glutatión (Fig. 20) se determinó según técnica de Tietze. Los compuestos no proteicos con grupos $-SH$ reaccionan con el ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) para formar ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, compuesto coloreado que absorbe a 412 nm (Tietze 1969). Para tal fin, se homogeneizaron 150 mg de tejido en 1,25 ml de $HClO_4$ 0,5 N en baño de hielo para precipitar las proteínas con grupos sulfidrilos y evitar la oxidación de GSH durante el proceso. El homogenato se filtró y se centrifugó 10 min a 10000 g a 4 °C. La reacción se realizó en una cubeta conteniendo 1,8 ml de buffer fosfato 100 mM pH = 7, EDTA 10 mM y 20 μ l de sobrenadante, se mezcló y se corrigió a pH=7 con buffer fosfato. Posteriormente se agregaron 100 μ l de DTNB 6 mM, se mezcló por inversión y se leyó la absorbancia luego de 1 minuto de reacción contra blanco de H_2O . Para calcular el contenido de grupos tioles solubles se

usó el coeficiente de extinción molar del 5-tio-2-nitrobenzoico ($\epsilon = 13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Los resultados se expresaron en $\mu\text{moles/mg}$ proteína.

4.1.3.2.3 Biomarcadores de estrés oxidativo

4.1.3.2.3.1 Oxidación de lípidos: Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Las reacciones en cadena que ocurren durante la oxidación de lípidos conducen a la formación de hidroperóxidos los cuales se descomponen en productos secundarios como aldehídos, cetonas, etc. Entre los aldehídos formados el marcador más ampliamente usado como oxidación lipídica es el malondialdehído (MDA). Este compuesto se une al ácido tiobarbitúrico (TBA) formando una base de Schiff que absorbe a 535 nm (Ohkawa et al. 1979). Se utiliza butil hidroxitolueno (BHT) como antioxidante para impedir que se forme MDA durante el procesamiento de las muestras y sobreestimar el resultado final.

Para tal fin, se homogeneizaron 300 mg de tejido en 3 ml de buffer fosfato 30 mM conteniendo KCl 120 mM pH=7,4. El homogenato se filtró y se centrifugó durante 10 min a 2600 g. Con el fin de eliminar las proteínas presentes en la mezcla de reacción se mezclaron 2,5 ml de sobrenadante, 250 μl de BHT y 2,5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 20%; la mezcla se centrifugó 10 min a 7000 g y 4 °C. Se descartó el pellet y la reacción se realizó en una cubeta conteniendo 1 ml del sobrenadante y 500 μl de TBA incubando la reacción en baño a 95 °C durante 15 min. Se determinó la absorbancia utilizando blancos de reactivos y blancos de muestra. Para calcular la concentración se realizó una curva de calibración usando como solución testigo diferentes diluciones de 1,1,3,3-tetra-metoxipropano. Los valores se expresaron como nmoles/mg de proteína.

4.1.3.2.3.2 Oxidación de proteínas: Determinación de grupos carbonilos

Para la cuantificación de los grupos carbonilos se utilizó la técnica modificada de Levine basada en la reacción covalente de estos grupos con 2,4 dinitrofenilhidracina

(2,4 DNFH) formando como producto 2,4 dinitrofenolhidrazona (DNP) detectable por espectrofotometría (Levine et al. 1990).

Para ello, se homogeneizaron 1.500 mg de tejido en 3 ml de buffer Krebs-Ringer. El homogenato se filtró. Una alícuota de 1 ml del homogenato se trató con 1 ml de TCA al 6,5% y se centrifugó 5 min a 2600 g a temperatura ambiente. El pellet se resuspendió con 1,6 ml de TCA al 6,5% y se dispusieron 200 µl en cada uno de los tubos “blanco” y “problemas” (por triplicado), se centrifugó 5 min a 2600 g a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y los pellets de los tubos blanco se resuspendieron con 1 ml HCl 2 N y los de los problemas con 1 ml DNPH. Posteriormente se incubaron durante 1 h en baño a 37 °C y en oscuridad agitándolos cada 15 min. Luego se colocaron en baño de hielo, se agregaron 200 µl TCA al 50% y se dejaron reposar 10 min, posteriormente se centrifugaron 5 min a 2600 g descartando el sobrenadante. Se realizaron al menos tres lavados con 2 ml de etanol/acetato de etilo (1/1 v/v cada vez) hasta que el pellet quedó totalmente incoloro. Luego de cada lavado se centrifugó 5 min a 2600 g descartando el sobrenadante. Finalmente se disolvieron los pellet con 1,3 ml de urea/Tris-HCl/EDTA, se separaron 20 µl para cuantificación de proteínas por triplicado y se leyó la absorbancia a 370 nm. Para los cálculos se utilizó el coeficiente de extinción molar de 2,4 DNP ($\epsilon = 2,1 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Los resultados se expresaron en nmoles/mg proteína.

4.1.4 Determinación de la proteína Nrf2: ensayo de western blot

4.1.4.1 Preparación de extractos proteicos

Para determinar el nivel proteico de Nrf2 en el tejido placentar se analizaron nueve placentas elegidas al azar de cada grupo poblacional mediante la técnica de western blot. Se utilizó el equipo Mini PROTEAN R 3 cell de BioRad siguiendo las instrucciones del fabricante. Se homogeneizaron 500 mg de tejido en 1 ml de buffer RIPA (Tris-HCl 50 mM pH=7,2; NaCl 150 mM; Tritón X-100 1% v/v; SDS 0,1%) conteniendo 20 µl de fluoruro de fenilmetilsulfonilo y 20 µl de cocktail inhibidor de proteasas en baño de hielo. Se dejó 30 min en hielo y se centrifugó 10 min a 2600 g a 4 °C. En el sobrenadante se cuantificaron las proteínas mediante la técnica de Bradford

usando como testigo albúmina sérica bovina (BSA), se fraccionó (60 µg de proteínas aproximadamente) en tubos eppendorf previo al agregado de buffer de siembra, se guardó a -80°C hasta su procesamiento. Además de medir el nivel proteico de Nrf2 en el tejido, es interesante conocer si esta proteína transloca a núcleo como respuesta a una modificación en el ambiente redox celular, en este caso no fue posible su estudio dado que las muestras conservadas a -80°C sufren la rotura de membranas en el proceso de descongelamiento no siendo factible la separación de la fracción nuclear.

4.1.4.2 Preparación de los geles

a. Gel separador (acrilamida al 10% de 1 mm de espesor)

Agua destilada	4,00 ml
Buffer Tris-HCl 1,5 M pH=8,82	5,00 ml
SDS 10% P/V	0,10 ml
Bisacrilamida 30 %	3,34 ml
Persulfato de amonio (0,2 g/ml)	0,20 ml
TEMED	5,00 µl

b. Gel concentrador

Agua destilada	3,05 ml
Buffer Tris-HCl 1,5 M pH=6,8	1,25 ml
SDS 10% P/V	0,05 ml
Arcilamida Bis 30%	0,65 ml
Persulfato de amonio (0,2 g/ml)	0,01 ml
TEMED	5,00 µl

Una vez preparados los geles, se sembraron 60 µg de proteínas por calle, previamente hervidas durante 5 min, en una calle de cada gel se corrió un marcador de peso molecular. Se conectó el sistema a una fuente de poder y se dejó correr a 150 V hasta que el marcador de peso llegara a la parte inferior, aproximadamente 2 h.

4.1.4.3 Transferencia de proteínas a soporte sólido

Finalizada la migración, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories), utilizando como buffer de transferencia (Tris-Base 24,7 mM; glicina 0,19 M; metanol 200 ml; H₂O csp 1000 ml) pH 8,1-8,4. Finalizada la

transferencia se tiñeron los geles con azul de Coomasie y la membrana con rojo Ponceau.

4.1.4.4 Tinción de geles

Se colocaron los geles en una solución de azul Coomasie 0,1% (0,1 g del colorante en metanol 40% y ácido acético 10%) durante 1 h, luego se lavaron repetidas veces con una solución decolorante (metanol 40% y ácido acético 10%).

4.1.4.5 Tinción de membranas

Las membranas se tiñeron con una solución colorante de rojo Ponceau (colorante Ponceau S 0,5 mM disueltos en 100 ml de ácido acético al 1%) durante 5 min, se lavaron con ácido acético 1%, se colocaron entre dos films y se “escanearon” para verificar calidad y cantidad de proteínas. Luego se lavaron con TBS 1x pH=7,6 (Tris HCl 0,02 M; NaCl 136,8 mM; H₂O csp 1000 ml) hasta desteñir y se procedió a bloquear con leche descremada al 5% en TBS-Tween 0,2% durante 2 h a temperatura ambiente con agitación. Se lavaron las membranas con TBS-Tween 0,2% y se incubaron con anticuerpo primario policlonal de conejo anti-Nrf2 (1:500) en TBS 1x durante la noche a 4-10 °C con agitación. Transcurrido el tiempo, se lavaron las membranas durante 5 min dos veces con TBS-Tween 0,2% y una vez con TBS 1x, luego se incubaron con la solución del anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano, (1:5000) (Amersham Biosciences) en TBS durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Transcurrido el tiempo se lavaron las membranas durante 5 min dos veces con TBS-Tween 0,2% y una vez con TBS 1x. Se procedió a revelar con una solución v/v de los reactivos A y B.

A: 2,5 ml Tris-HCl 100 mM pH=8,6; 25 µl luminol 250 mM; 11 µl cumárico 90 mM.

B: 2,5 ml Tris.HCl 100 mM pH=8,6; 2 µl H₂O₂.

Las señales reveladas se cuantificaron utilizando un software de análisis de imágenes (GelPro). Como estándar interno se utilizó la señal dada en la detección inmunológica de la proteína β-actina.

Para poner de manifiesto la señal de β -actina, se realizó el “striping” de la membrana con OHNa 1N durante 3 min, se lavó 6 veces con TBS 1x durante 5 min cada vez y se bloqueó la membrana con leche descremada al 5% en TBS-Tween 0,2% durante 2 h a temperatura ambiente con agitación. Se lavó la membrana con TBS-Tween 0,2% y se incubó con anticuerpo primario anti- β -actina (1:300) en TBS 1x durante la noche a 4-10 °C con agitación. Transcurrido el tiempo se lavó la membrana durante 5 min dos veces con TBS-Tween 0,2% y una vez con TBS 1x. Finalmente, la membrana se incubó con la solución del anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano, (1:5000) (Amersham Biosciences) en TBS durante 1 h a temperatura ambiente con agitación y se lavó con TBS-Tween 0,2% durante 5 min dos veces y una vez con TBS 1x. Luego se procedió a revelar.

4.2 Estudio *in vitro*

4.2.1 Línea celular JEG-3. Cultivo

En esta parte del trabajo de tesis se utilizó la línea celular JEG-3 (ATCC, HTB-36) derivada de coriocarcinoma humano, provistas por la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA). Las células se cultivaron en medio Dulbecco's modificado por Eagle suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10%, 100 U/ml de penicilina y 0.1 mg/ml de estreptomicina a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂.

Cuando las células llegaron a una confluencia de 80-90% se tripsinizaron para ser repicadas o congeladas. Para repicar, las células se lavaron 2 veces con PBS y posteriormente se trataron con 1 ml de tripsina 0,2% (P/V) 5 min a 37 °C. Una vez desprendidas las células, se agregó 1 ml del medio suplementado al 10% con SFB. Posteriormente las células se dividieron de acuerdo al número de placas que se necesitaba o se congelaron gradualmente a -80 °C en dimetilsulfóxido (DMSO).

4.2.2 Tratamiento de células JEG-3 con clorpirifos

Para evaluar el efecto de CPF en la línea celular JEG-3, se plaquearon $1,5 \times 10^6$ células en placas de 10 cm de diámetro a las que se agregó 10 ml de medio de cultivo

(para el estudio de biomarcadores) y $5,5 \times 10^5$ células/pocillo en placas de 6 pocillos en 2 ml de medio de cultivo (para estudiar la expresión y niveles de transcritos de proteínas). Después de 24 hs, se descartó el medio, las células se lavaron dos veces con PBS 1x pH 7,4-7,6 (NaCl 136,8 mM; KCl 2,6 mM; Na_2HPO_4 10 mM; KH_2PO_4 1,7 mM; H_2O csp 1000 ml) y se las expuso a 5, 50 ó 100 μM de CPF (solución stock de clorpirifos 0,25 M en DMSO) en medio de cultivo suplementado, como se describió previamente pero con SFB al 1% para evitar la interacción del tóxico con las proteínas séricas. La concentración final de DMSO usada fue menor a 0,04% en todos los casos. Para el tratamiento con N-acetilcisteína (NAC), las células se incubaron con 10 mM de NAC en medio de cultivo durante 2 h, luego se les retiró el medio de cultivo y se les agregó las respectivas concentraciones de CPF con un nuevo agregado de NAC 10 mM. Se incubó durante 3 ó 24 hs. Finalmente las células se levantaron en:

- a- buffer fosfato de sodio 50 mM pH=7 y se guardó a -20°C para las determinaciones bioquímicas.
- b- buffer Laemmli (Tris-HCl 60 mM pH=6,8; glicerol 10%; SDS 2%; 2-mercaptoetanol 1%) y se guardó a -20°C para el estudio de proteínas por western blot.
- c- Trizol (Sigma) y se guardó a -80°C para extracción de ARN.

4.2.3 Determinaciones analíticas en células JEG3

Para las determinaciones bioquímicas se descongelaron las células en baño de hielo, se lisaron y se determinó la concentración de proteínas por método de Lowry usando como testigo BSA. Los resultados de las actividades enzimáticas se expresaron como UI/mg de proteína, definiendo una UI como la cantidad de enzima que descompone 1 μmol de sustrato por minuto a 30°C para AChE y a 25°C para CAT. Se establecieron las condiciones de linealidad en ambos casos.

4.2.3.1 Biomarcador de exposición a organofosforados

4.2.3.1.1 Acetilcolinesterasa

La actividad enzimática se determinó de acuerdo al método de Ellman y col. usando acetiltiocolina como sustrato. Se utilizaron 200 μ l de extracto celular equivalente a 500 mg de proteínas en un volumen final de 1570 μ l de buffer fosfato de sodio 100 mM pH=8 conteniendo 10 mM de DTNB y 0,75 mM de ioduro de acetiltiocolina. El ioduro de acetilcolina fue usado como sustrato y la tiocolina, producto de su degradación, fue detectada colorimétricamente en su reacción con DTNB. El cambio en la absorbancia se registró a 412 nm de manera continua durante 2 min a una temperatura constante de 30 °C. Los cálculos se realizaron empleando el coeficiente de extinción molar del TNB (producto de reacción entre el DTNB y los ésteres de la colina) $14,150 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ previa corrección de la absorbancia debido a hidrólisis espontánea no enzimática del sustrato.(Ellman et al.1961). La linealidad del método se comprobó analizando diluciones del extracto celular. La ecuación lineal obtenida fue $y = 0,3241x$ con un coeficiente de correlación de $R^2 = 0,9786$. La actividad específica se expresó como mUI/mg de proteína.

4.2.3.2 Biomarcadores del estado redox

4.2.3.2.1 Sistema antioxidante enzimático

4.2.3.2.1.1 Catalasa

La actividad de catalasa (EC1.11.1.6) se determinó como se describe en el ítem 4.1.3.2.1.1 utilizando 100 mg de proteínas del extracto celular, previa determinación de las condiciones de linealidad (Beers and Sizer 1952).

4.2.3.2.2 Sistema antioxidante no enzimático

4.2.3.2.2.1 Glutación

La determinación de GSH se realizó mediante la técnica colorimétrica, basada en la reacción producida por los grupos tioles con DTNB en medio alcalino que absorbe a 412 nm (Ellman, 1959). Para su cuantificación se realizó una curva de calibración con GSH como estándar. Se expresó en nanomoles/ miligramo de proteína.

4.2.4 Detección de ROS

Las células se cultivaron sobre cubreobjetos en las placas de cultivo según se indica en 4.2.2 y se expusieron a CPF. Se incubaron durante 3 y 24 hs, luego de transcurrido el tiempo se les cambió el medio de cultivo por otro carente de suero y rojo fenol para evitar interferencias. Se incubaron las células durante 30 min a 37 °C en presencia de 10 mM del reactivo fluorogénico diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA). Luego se realizaron tres lavados con PBS 1x. Las células se observaron en microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TE 2000U (Nikon Corporation, Japón). El colorante H₂DCFDA es hidrolizado por esterasas inespecíficas y la posterior reacción con las ROS, produce fluorescencia. Se obtuvieron tres fotos (tres campos observados) por condición de tres experimentos independientes.

4.2.5 Ensayo de western blot

4.2.5.1 Preparación de extractos proteicos

Los extractos proteicos totales se prepararon según se indica en el ítem 4.2.2 inc b". Los extractos correspondientes a las fracciones citoplasmáticas y nucleares se obtuvieron como lo describió (Schreiber et al. 1989) con modificaciones. Luego del período de incubación las células se levantaron y se lavaron con PBS 1x frío, se resuspendieron en 300 µl de buffer **A** (HEPES 20 mM pH=8.0, EDTA 1 mM, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM, DTT 1 mM) con el agregado de un cocktail inhibidor de proteasas (Sigma). Se dejó reposar 15 min en baño de hielo, se agregó 7,5 µl de Nonidet P-40 al 10% se agitó vigorosamente 10 seg y luego se centrifugó 1 min a 16000 g a 4 °C, se separó el **sobrenadante**. El pellet correspondiente a la **fracción nuclear enriquecida** se lavó 3 veces con solución "**A**" y se resuspendió en 50 µl de buffer **B** (HEPES 20 mM pH=8x, EDTA 1 mM, MgCl₂ 1,5 mM, NaCl 10 mM, DTT 1 mM, cocktail inhibidor de proteasas y glicerol al 20%). Tanto los extractos proteicos de células enteras, como las fracciones sobrenadante (correspondiente a la fracción citoplasmática) y las fracciones nucleares enriquecidas se sonicaron. A todos los extractos se les determinó la

concentración de proteínas por el método de Bradford usando BSA como estándar. Todas las muestras se conservaron a -80 °C hasta su análisis.

4.2.5.2 Detección inmunológica de proteínas transferidas a soporte sólido

Los extractos proteicos se descongelaron, se hirvieron durante 5 min y se centrifugaron. Las proteínas de los extractos (50 µg) se separaron en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS) al 10 %, posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Bioscience) y se siguió según técnica descrita para muestras de placenta, ítem 4.1.4.3. En los extractos celulares se probaron los siguientes anticuerpos primarios: policlonal anti-Nrf2 (1:500), anticuerpo monoclonal β-actina (1:300), anti-GAPDH (1:2000) y anticuerpos secundarios conjugado con peroxidasa de rábano, (1/5000) (Amersham Biosciences).

4.2.6 Purificación de ARN total

Las células crecidas a una confluencia entre el 80-90% provenientes de una placa de 6 pocillos se lavaron dos veces con PBS 1x y se resuspendieron en 750 µl de TRIZOL (Sigma) en baño de hielo. Se agregó 150 µl de cloroformo, se dejó reposar 15 min y luego se centrifugó 15 min a 12000 g a 4 °C. La fase superior se transfirió a un nuevo tubo y el ARN se precipitó con 750 µl de isopropanol 10 min a temperatura ambiente. El pellet obtenido se centrifugó a 12000 g 10 min a 4 °C y se lavó con 750 µl de etanol. El ARN precipitado se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en agua libre de RNasas. La calidad del ARN se confirmó mediante electroforesis en geles desnaturizantes. Para tal fin la muestra se disolvió en buffer MOPS (formaldehído 7,2% (v/v), formamida 50% (v/v), y bromuro de etidio 10 ng/µl, y se calentó 15 min a 65 °C, (para romper estructuras secundarias), se sembró en un gel desnaturizante de agarosa 1% (P/V) con formaldehído 7,2% (v/v) en MOPS, y se corrió en buffer MOPS a 25-30 mA. Las bandas del ARN ribosomal 28S y 18S se observaron bajo la luz ultravioleta. La calidad del ARN se evaluó mediante la relación de la cantidad de la banda correspondiente a 28S respecto a la de 18S, una relación mayor o igual a 1 se

considera que la muestra es apropiada. Por otro lado, la cuantificación de los ARN se obtiene mediante la lectura de la absorbancia a 260 nm, sabiendo que 1 DO₂₆₀ equivale a 40 µg/ml de ARN. A su vez la pureza puede ser evaluada mediante la relación obtenida de absorbancias a 260 nm *versus* a 280 nm, considerándose valores aceptables entre 1,8 y 2. Finalmente las muestras se conservan a -80 °C hasta su utilización.

4.2.7 Reacción de Transcriptasa Reversa (RT)

La síntesis de ADNc se realizó a partir de 1 µg de ARN purificado en un volumen final de 20 µl. Al volumen conteniendo 1 µg de ARN se agregó 1 U/µl de RNasin (Promega), inhibidor de RNasas, 2 µl de buffer de reacción 1x (Tris-HCl -pH =8,3- 50 mM, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM), 12,5 pmoles/µl de una mezcla de hexadesoxinucleótidos de secuencias al azar (iniciadores de la RT), DTT (10 mM) y H₂O. Esta mezcla se incubó a 65 °C durante 15 min para destruir estructuras secundarias. Posteriormente se agregaron, 1 mM dNTPs (de cada uno) y 10 U/µl de la enzima M-MLV transcriptasa reversa (Invitrogen) y se incubaron 10 min a 25 °C y luego 50 min a 37 °C. Finalmente se inactivó la reacción incubando a 95 °C durante 3 min.

4.2.8 PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

4.2.8.1 Semi-cuantificación del ADNc

Los fragmentos de ADNc sintetizados por la reacción de RT se amplificaron por PCR. El número de ciclos utilizados se optimizó para que la amplificación de los transcritos se encontrase en el rango lineal. Los productos de amplificación se corrieron en geles de agarosa y se visualizaron a través de la tinción con bromuro de etidio. El protocolo de amplificación para todos los ADNc incluyó: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, seguido por 22-27 ciclos (dependiendo de la abundancia del transcritos a amplificar) de 30 seg a 95 °C, 30 seg a 60 °C, 30-90 seg (dependiendo del tamaño del transcritos a amplificar) a 72 °C y un ciclo de 10 min a 72 °C.

4.2.8.2 PCR en tiempo real

La expresión de Nrf2, SOD1, HO-1 y GR se cuantificó por la técnica de PCR en tiempo real (ABI 7500, Applied Biosystems) con el software de detección v1.4. Los experimentos se realizaron usando 1x SYBRGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems) y los “primers” correspondientes para cada transcripto. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados para amplificar cada transcripto y la concentración usada se detalla en el Anexo I- Tabla VI. Las condiciones de ciclado incluyeron un ciclo de 10 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 seg a 95 °C y 1 min a 60 °C. La especificidad se verificó por el análisis de las curvas de “melting”. Cada muestra se analizó por triplicado y los datos fueron normalizados a los niveles de transcriptos de ciclofilina A calculando los niveles de expresión relativa con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen 2001). La eficiencia de amplificación de la reacción fue cercana al 98%.

RESULTADOS

RESULTADOS

5.1 Estudio poblacional

5.1.1 Características de la población estudiada

Para conocer las características, hábitos y conductas de riesgo de la población estudiada, se elaboró una entrevista (Anexo II) y se llevó a cabo el registro de dichos aspectos según se mencionó en Materiales y Métodos 4.1. Los resultados se indican en la Tabla VII.

Tabla VII. Características demográficas de los grupos control, período de receso (PR) y período de pulverizaciones (PP) en la población estudiada.

Características demográficas	Control (n=24)	Período de receso (n=22)	Período de pulverizaciones (n=24)
Edad (años) ^a	23.6 ± 5.6	24.6 ± 5.9	21.9 ± 5.9
Paridad ^a	1.2 ± 1.7	1.6 ± 1.7	1.1 ± 1.5
Nivel de instrucciónl (%) ^b			
Sin instrucción	0	0	5
Primario	60	80	79
Secundario	40	20	8
Terciario	0	0	8
Hábito de fumar (%) ^b			
Fumador activo	0	0	0
Fumador pasivo	4	23	25
Consumo de agua de pozo (%) ^b	0	15,4	8,3
Pulverizaciones domésticas(%) ^b	0	11,5	16,7

^a Los resultados se expresan en valores promedios ± desviación estándar. ANOVA y *test a posteriori* de Tukey: diferencias no significativas.

^b Los resultados se expresan como porcentaje. Prueba *chi-cuadrado*: diferencias no significativas.

Del análisis comparativo de los datos pertenecientes a los tres grupos, se observa que los grupos rurales PR y PP tienen características demográficas

homogéneas y las diferencias que se observan no fueron significativas cuando se las compara con el grupo control, particularmente las relacionadas con los factores de confusión: fumadora pasiva, consumo de agua de pozo y uso de insecticidas domésticos.

En la tabla VIII se muestran los datos morfométricos registrados de los neonatos y placentas estudiadas según el Anexo II. De igual modo a los datos relacionados a las características demográficas de la población, los datos morfométricos de neonatos y placentas no mostraron cambios significativos entre los grupos estudiados.

Tabla VIII. Parámetros morfométricos de los neonatos y las placentas del grupo control y de la población rural en los períodos de receso y pulverizaciones.

Características	Control (n=24)	Período de receso (n=24)	Período de pulverizaciones (n=24)
Peso del neonato (kg) ^{a,c}	3.313 ± 0.49	3.437 ± 0.34	3.209 ± 0.38
Talla del neonato (cm) ^{a,c}	48.28 ± 3.22	49.12 ± 1.65	48.91 ± 2.77
Perímetro cefálico (cm) ^{a,c}	35.40 ± 3.46	34.76 ± 1.12	34.38 ± 1.06
Peso de la placenta (gr) ^c	515.80 ± 88,49	510.77 ± 98.00	494.92 ± 104.52
Índice placentario ^{b,c}	0.16 ± 0.02	0.15 ± 0.03	0.15 ± 0.02
Índice ponderal ^{c,e}	3.05 ± 1.13	2.91 ± 0.37	2.75 ± 0.31
Edad gestacional ^c	38.72 ± 1.34	38.27 ± 1.22	39.29 ± 1.16
Neonatos masculinos ^d	64	54	29
Neonatos femeninos ^d	36	46	71

Los resultados se expresan en valores promedios ± desviación estándar.

^a Datos corregidos por edad gestacional y sexo.

^b Dato expresado como peso placenta (kg)/peso neonato (kg)

^c Prueba de ANOVA y *test a posteriori* de Tukey: diferencias no significativas.

^d Prueba *chi-cuadrado*: diferencias no significativas.

^e Índice ponderal: (peso al nacer en gramos/talla en centímetros al cubo por 100)².

5.1.2 Biomarcador de exposición: Actividad de Carboxilesterasa

Para evaluar la exposición a plaguicidas en las mujeres gestantes se determinó la actividad de CaE en homogenato de placentas. Como se mencionó en Introducción (ítem 1.1.7.2.2), las CaEs constituyen blancos sensibles de los OFs (Casida and Quistad 2004). Los resultados de la actividad enzimática de CaE de placentas recogidas durante el PP muestran que ésta disminuyó un 16,5% comparado con el grupo control y un 19% cuando se la compara con los valores obtenidos en placentas provenientes de la población rural recogidas en el PR (Fig. 21). Los valores obtenidos en el grupo control se hallan dentro del rango reportado por Yan y col. para placenta humana (85 a 170 mUI/mg proteína x min) con una media de $97,37 \pm 16,38$ mUI/mg proteína x min (Yan et al. 1999).

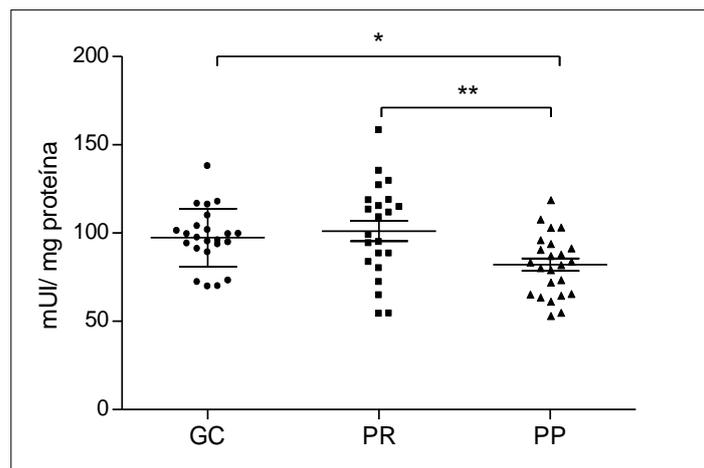


Figura 21. Actividad enzimática de carboxilesterasa en homogenatos de placentas humanas expresada en mUI/mg proteína. GC: grupo control (n=23): $97,37 \pm 16,38$ mUI/mg proteína; PR: período de receso (n=22): $101,15 \pm 26$ mUI/mg proteína y PP: período de pulverizaciones (n=24): $82,09 \pm 17,25$ mUI/mg proteína. Los datos representan los valores promedios \pm desviación estándar. Las diferencias entre los grupos se evaluaron por ANOVA y *test a posteriori* de Tukey (*p < 0,05; **p < 0,01).

5.1.3 Biomarcadores del estado redox

5.1.3.1 Concentración de Glutación reducido

El GSH, tripéptido que contiene el grupo tiol en estado reducido, es el

antioxidante de mayor importancia celular. Los resultados obtenidos de la valoración de GSH en homogenato de placentas no mostraron variaciones significativas entre los grupos estudiados (Fig. 22). Los valores obtenidos son ligeramente menores que los rangos de valores hallados en placenta humana que es de $5,24 \pm 3,01 \mu\text{mol/mg}$ de proteína (Ahamed et al. 2009).

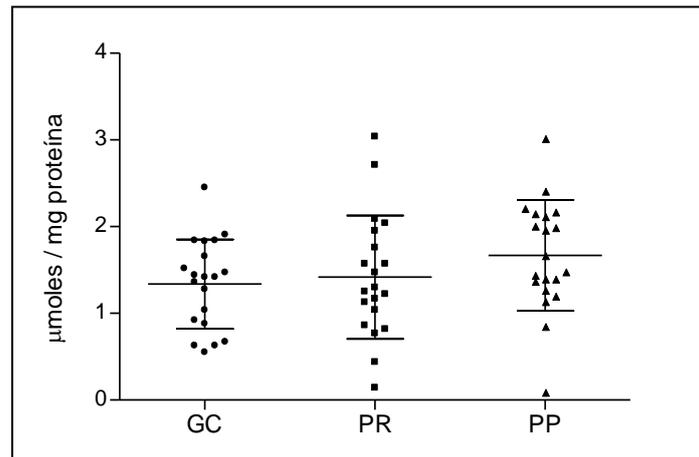


Figura 22. Concentración de GSH en homogenato de placentas humanas. GC: grupo control (n=20): $1,34 \pm 0,51 \mu\text{moles/mg}$ proteína; PR: período de receso (n=20): $1,42 \pm 0,71 \mu\text{moles/mg}$ proteína y PP: período de pulverizaciones (n=20): $1,67 \pm 0,64 \mu\text{moles/mg}$ proteína. Los datos representan los valores promedios \pm desviación estándar. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos cuando se evaluaron con ANOVA y *test a posteriori* de Tukey.

5.1.3.2 Actividad de Catalasa y Glutación peroxidasa

Los resultados de la valoración de las dos enzimas de la primera línea antioxidante en homogenato de placentas no mostraron variaciones significativas entre los grupos (Fig. 23A y 23B). Los valores obtenidos para CAT están en el rango de valores obtenidos por Wang y col. (Wang and Walsh 1996). Igualmente los valores de GPx hallados en este estudio fueron similares a los reportados por Zamudio y col. (Zamudio et al. 2007).

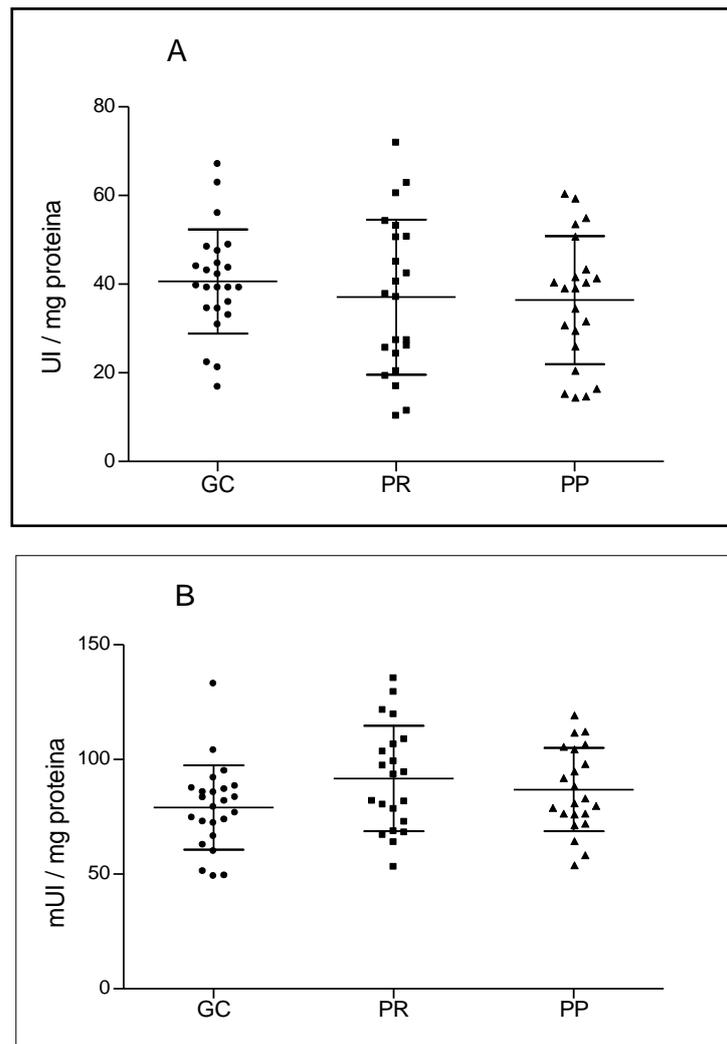


Figura 23. Actividad enzimática de catalasa (A) GC: grupo control (n=24): 40,26±12,26 UI/mg proteína; PR: período de receso (n=22): 37,09±17,49 UI/mg proteína y PP: período de pulverizaciones (n= 22): 36,42±14,42 UI/mg proteína. Actividad enzimática de glutatión peroxidasa (B) en homogenatos de placentas humanas, GC: grupo control (n=24): 78,10±18,41 mUI/mg proteína; PR: período de receso (n=22): 91,70±22,98 mUI/mg proteína y PP: período de pulverizaciones (n= 22): 86,82±18,18 mUI/mg proteína. La diferencia entre los grupos fueron evaluadas con ANOVA y *test a posteriori* de Tukey. Los datos representan los valores promedios ± desviación estándar. No se encontraron diferencias significativas.

5.1.3.3 Niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y carbonilación de proteínas

Se realizó la valoración de los biomarcadores de estrés oxidativo en homogenato de placenta tales como: lipoperóxidos, mediante la determinación de TBARS, así como la medición de la carbonilación de proteínas. Los resultados no

mostraron variaciones significativas entre los grupos estudiados (Fig. 24). Es importante destacar que no fue posible comparar los valores obtenidos en el presente trabajo con aquellos reportados por otros autores debido a las diferentes condiciones experimentales utilizadas.

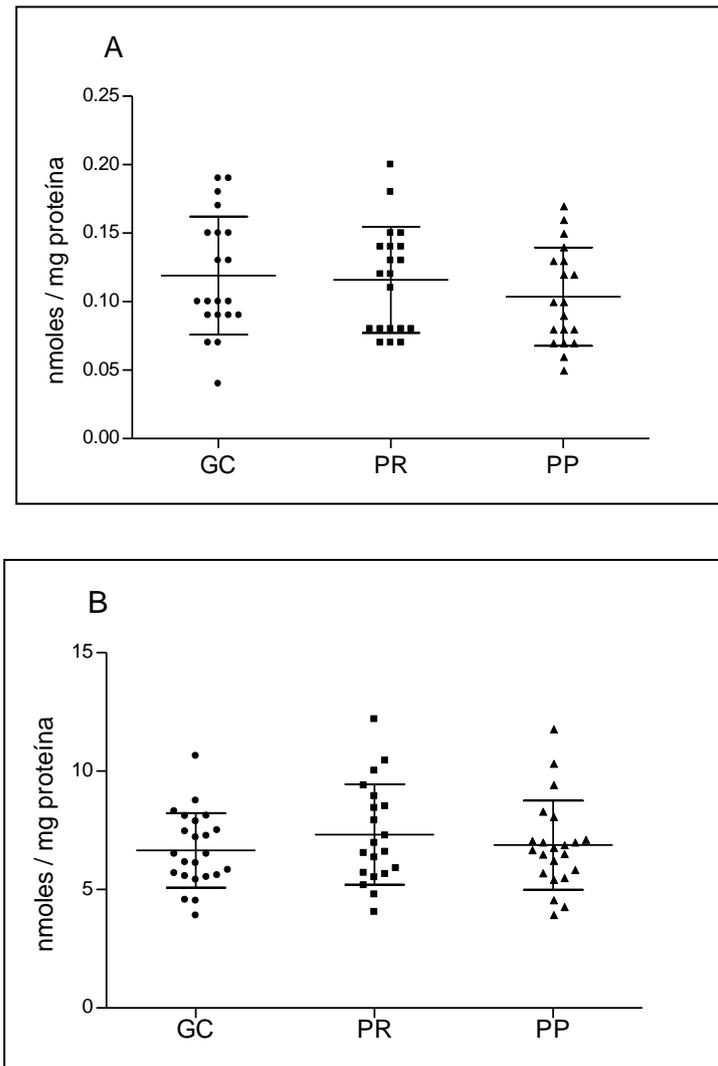


Figura 24. Biomarcadores de estrés oxidativo en homogenatos de placentas humanas. **A:** niveles de TBARS en GC: grupo control (n=20): $0,12 \pm 0,04$ nmoles/mg proteína; PR período de receso (n=20): $0,11 \pm 0,04$ nmoles/mg proteína y PP: período de pulverizaciones (n=19): $0,10 \pm 0,03$ nmoles/mg proteína. **B:** contenido de grupos carbonilos en GC: grupo control (n=23): $6,67 \pm 1,61$ nmoles/mg proteína; PR: período de receso (n=20): $7,32 \pm 2,11$ nmoles/mg proteína y PP: período de pulverizaciones (n= 22): $6,88 \pm 1,87$ nmoles/mg proteína. La diferencia entre los grupos fueron evaluadas con ANOVA y *test a posteriori* de Tukey. Los datos representan los valores promedios \pm desviación estándar. No se encontraron diferencias significativas.

5.1.4 Asociación entre biomarcadores de estrés oxidativo y el tiempo de exposición a plaguicidas o la actividad de carboxilesterasa

El análisis de regresión de los parámetros estudiados en los homogenatos de placentas correspondiente al grupo PP no permitió establecer una asociación significativa entre los biomarcadores de estrés oxidativo y el tiempo de exposición (cantidad de días transcurridos desde la primera aplicación de OFs hasta la fecha de parto) a plaguicidas o con la actividad de la enzima CaE.

5.1.5 Asociación entre parámetros morfométricos del neonato y la placenta con los diferentes biomarcadores analizados

Se realizó un análisis de regresión a los fines de establecer posibles asociaciones entre los parámetros morfométricos del neonato y la placenta con los biomarcadores estudiados dentro de cada grupo. Sólo se halló asociación significativa negativa entre el índice placentario y la actividad de CAT para el grupo PP (Fig. 25).

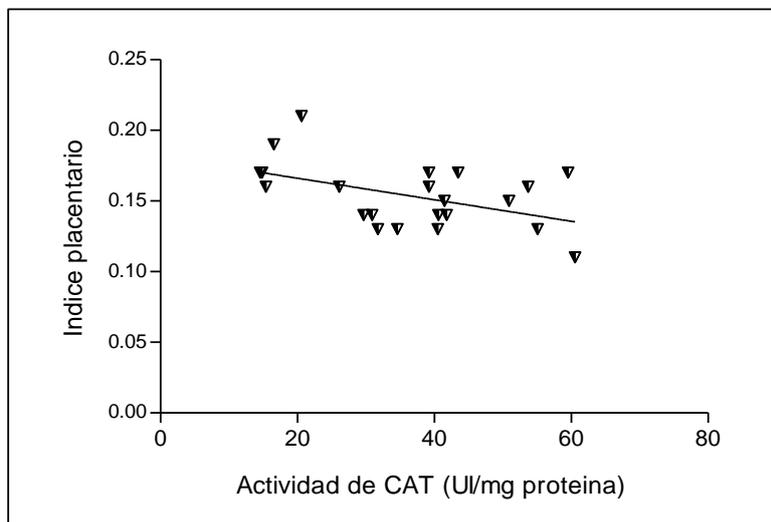


Figura 25. Relación entre el índice placentario (peso de la placenta/peso del neonato) y la actividad de catalasa en placenta en el grupo PP. La línea representa la regresión lineal ($p = 0,023$; $r = -0,48$).

5.1.6 Niveles placentales del factor de transcripción Nrf2

Finalmente, se evaluó en homogenato de placenta los niveles proteicos del factor de transcripción Nrf2, el cual desempeña un rol clave en el mantenimiento de la homeostasis redox. La Figura 26 muestra un análisis de western blot representativo de los niveles obtenidos en extractos de placentas correspondientes a los distintos grupos poblacionales, los cuales no mostraron cambios significativos.

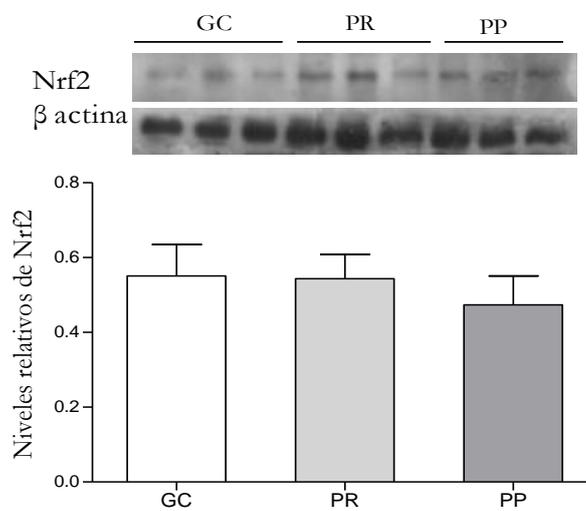


Figura 26. Western blot de extractos proteicos obtenidos de homogenato de placentas humanas provenientes de GC: grupo control; PR: período de receso; PP: período de pulverizaciones. El ensayo se realizó usando anticuerpos anti-Nrf2 y anti- β -actina, como se detalló en materiales y métodos. El gráfico de barras representa la cuantificación densitométrica de los valores promedios \pm desviación estándar de los niveles relativos de Nrf2 respecto a β -actina de nueve muestras de placenta de cada grupo.

5.2 Estudio *in vitro*

En este trabajo de tesis se utilizaron cultivos de la línea celular JEG-3 derivada de coriocarcinoma humano como un sistema de células trofoblásticas modelo para evaluar el impacto y posibles mecanismos involucrados en la exposición al organofosforado CPF. Trabajos previos del laboratorio habían demostrado que el tratamiento de células JEG-3 con concentraciones de CPF de hasta 100 μM durante 24 hs no altera significativamente la viabilidad, medida por ensayos de MTT, ni la morfología celular (Fig. 27)(Ridano et al. 2012).

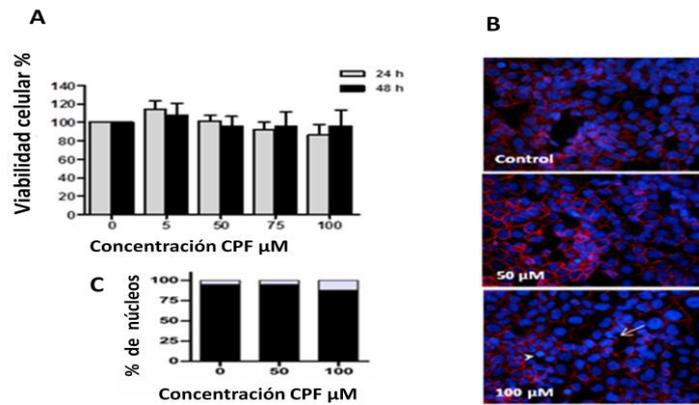


Figura 27. A. Viabilidad de las células JEG-3 expuestas a CPF. Las células fueron cultivadas en presencia de las concentraciones indicadas de CPF o vehículo solamente (CPF 0, condición del control) para 24 hs (barras grises) o 48 hs (barras negras). La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de reducción de MTT. Los resultados representan la media \pm SEM de cuatro experimentos independientes realizados por cuadruplicado y se presentan como porcentaje de control. No se detectó diferencias significativas ($p < 0,05$) en comparación con el control. **B.** Efecto de CPF sobre la morfología celular de JEG-3. Las células fueron expuestas a 0,04% DMSO (control), 50 μM ó 100 μM de CPF por 24 hs. Las células se fijaron y analizaron por microscopia de inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-desmoplaquina (rojo) y tinción nuclear por H \ddot{o} echst (azul). Flecha: un núcleo anormal; punta de flecha: un núcleo mitótico. **C.** Se contaron más de 500 núcleos en al menos cinco campos al azar en cada condición de cultivo en tres experimentos independientes y los resultados se expresan como porcentaje de los núcleos totales. Barra negra: normal y barra gris: anormales (núcleos condensados/fragmentados). Adaptado de (Ridano et al. 2012), reproducción autorizada por los autores.

5.2.1 Biomarcador de exposición

5.2.1.1 Acividad de Acetilcolinesterasa

No se registraban al momento de realizar este trabajo datos bibliográficos del efecto de CPF sobre la actividad de acetilcolinesterasa en células JEG-3 y dado que esta enzima es reconocida como el blanco principal de exposición a OFs se realizó su medición.

Como se observa en la Fig. 28A, la exposición de células JEG-3 a CPF durante 24 hs inhibió la actividad de la enzima de forma dependiente de la concentración del OF.

La Fig. 28B muestra que ante el agregado del antioxidante NAC, previo a la incubación con el OF, la actividad de la enzima en las células JEG-3 expuestas a 5 μM de CPF se mantiene, mientras que a 50 μM se observó una inhibición parcial de la enzima. Estos resultados demuestran que AChE se expresa en estas células, que su actividad es inhibida por CPF y que la misma se revierte en parte por la presencia del antioxidante NAC.

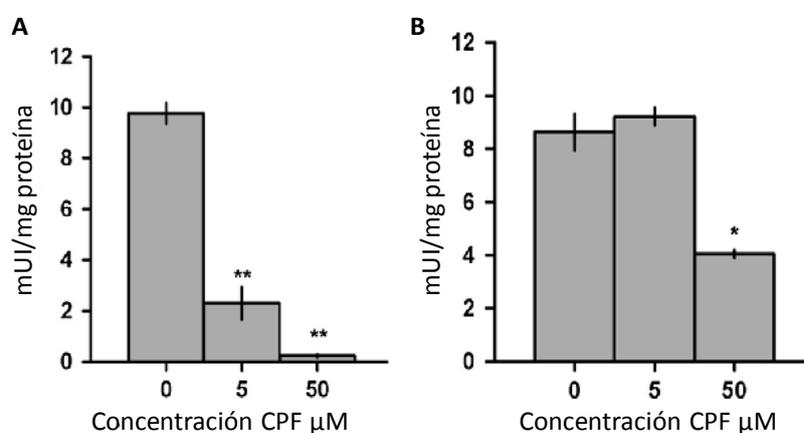


Figura 28. Actividad de acetilcolinesterasa en células JEG-3 tratadas durante 24 hs. **A:** células grupo control (0) incubado con DMSO al 0,04 %: $10,09 \pm 0,59$ mUI/mg proteína, grupo tratado con CPF 5 μM : $2,38 \pm 0,91$ mUI/mg proteína y grupo tratado con CPF 50 μM : $0,24 \pm 0,08$ mUI/mg proteína. **B:** agregado de 10 mM de NAC previo al tratamiento durante 24 hs. Grupo control (0): $8,91 \pm 0,99$ mUI/mg de proteína, grupo 5 μM : $9,52 \pm 0,48$ mUI/mg de proteína y grupo 50 μM : $4,17 \pm 0,21$ mUI/mg de proteína. Los valores expresados en mUI/mg de proteína representan los valores promedios \pm desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Análisis estadísticos evaluados por ANOVA y *test a posteriori* de Tukey. Diferencias significativas con el grupo control (0) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

5.2.2 Generación de especies reactivas del oxígeno

Para comprobar si la exposición a CPF genera ROS, se cultivaron células JEG-3 con distintas concentraciones de CPF durante 3 y 24 hs según se explicó en Materiales y Métodos ítem 4.2.2. Transcurrido el tiempo, se incubó con un colorante permeable no fluorescente (H_2DCFDA), el cual al ser clivado por esterasas intracelulares puede reaccionar con ROS y producir fluorescencia verde detectable por microscopía (Fig. 29A y 29B). La Figura 29C corresponde al control positivo en el que se expusieron las células a $100 \mu M$ de H_2O_2 . Estos resultados permiten concluir que CPF induce la generación de H_2O_2 o radicales peroxilos.

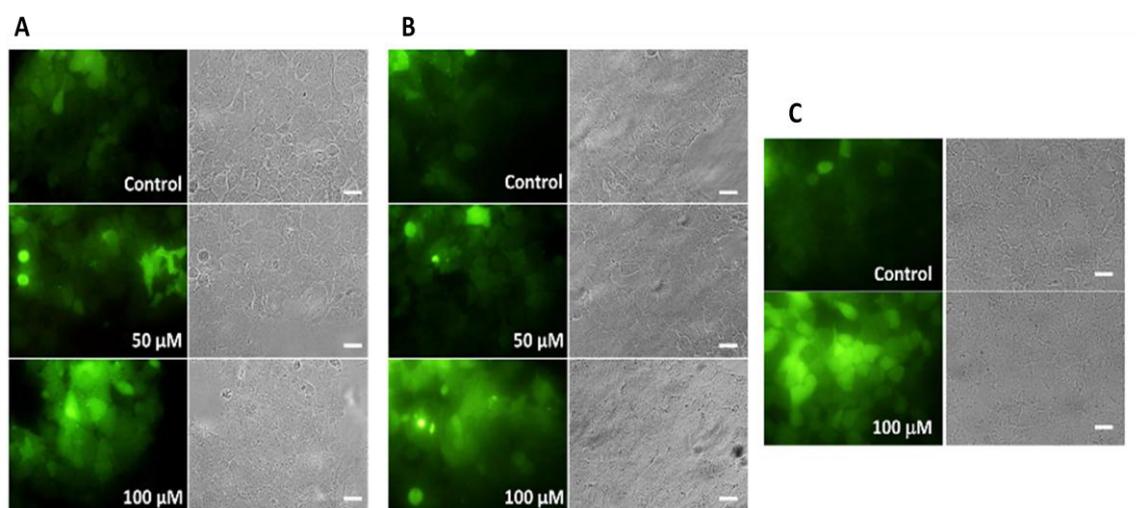


Figura 29. Generación de ROS en células JEG-3 expuestas a CPF. Las células se cultivaron con 50 ó $100 \mu M$ de CPF durante 3 (A) ó 24 hs (B). Las células control sin tratamiento se cultivaron con DMSO al 0,04%. Finalizado el tiempo de cultivo se agregó 10 mM de H_2DCFDA por 30 minutos y se observó la intensidad de la fluorescencia por microscopía. (C) control positivo tratado con $100 \mu M$ de H_2O_2 durante 3hs.

5.2.3 Sistema de defensa antioxidante

Con el fin de analizar si la exposición de células JEG-3 a CPF altera la capacidad del sistema de defensa antioxidante se determinó la actividad de la enzima CAT, “scavenger” de H_2O_2 , y el contenido de GSH, principal antioxidante no enzimático. Como se muestra en la Figura 30A la actividad de CAT en células expuestas a $100 \mu M$ de CPF, se incrementó un 37% con respecto a las células control tratadas sólo con el

vehículo ($p < 0,05$). Por el contrario, como se observa en Figura 30B, el contenido de GSH disminuyó un 32% y un 39% cuando se compara los grupos tratados con 50 ó 100 μM respecto al grupo control ($p < 0,001$). Estos datos demuestran que CPF modifica la defensa antioxidante de células JEG-3.

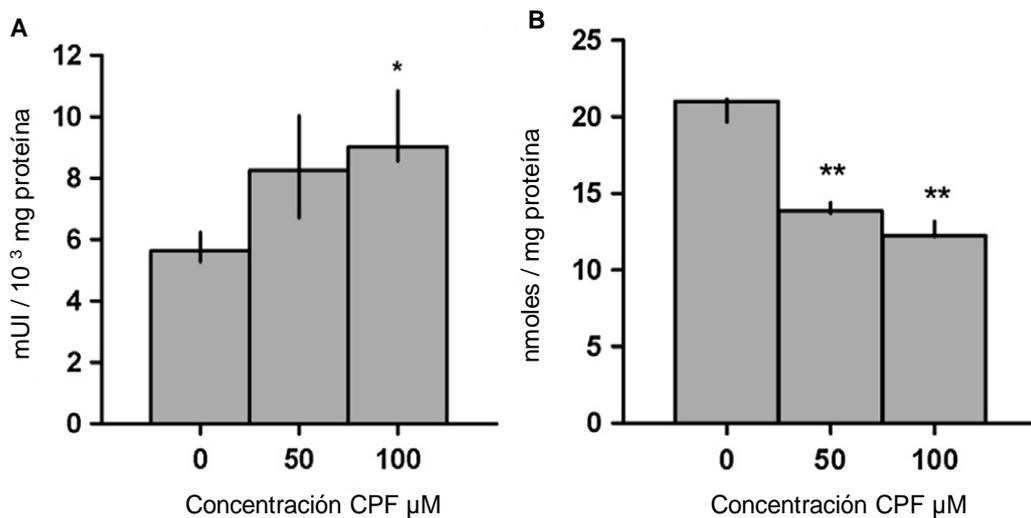


Figura 30. Efecto del tratamiento con CPF en células JEG-3 sobre la actividad de CAT (A), grupo control: $5,88 \pm 0,43$ mUI/ 10^3 mg proteína, grupo 50 μM : $8,05 \pm 0,19$ mUI/ 10^3 mg proteína y grupo 100 μM : $9,08 \pm 0,13$ mUI/ 10^3 mg proteína y (B) contenido de GSH grupo control: $20,61 \pm 0,82$ nmoles/mg proteína, grupo 50 μM : $13,99 \pm 0,38$ nmoles/mg proteína y grupo 100 μM : $12,52 \pm 0,56$ nmoles/mg proteína. Las células fueron cultivadas durante 24 hs con las cantidades indicadas de CPF. Las barras representan los valores promedios \pm desviación estándar de al menos cinco experimentos independientes realizados por duplicado. Diferencias significativas con el grupo control (0) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

5.2.4 Expresión de Nrf2

Con la finalidad de conocer los mecanismos que median la inducción de la actividad enzimática de CAT se analizó la expresión del factor de transcripción Nrf2 en las células JEG-3. Los resultados muestran que CPF induce la expresión proteica de Nrf2 en las células tratadas con 50 ó 100 μM de CPF durante 24 hs (Fig. 31A). Células JEG-3 tratadas con H_2O_2 100 μM mostraron un aumento similar.

Con el fin de establecer si el incremento en la expresión de la proteína Nrf2 se asociaba con incrementos similares en su transcripción, se evaluó mediante qRT-PCR el nivel del transcrito de Nrf2. Como se muestra en la Figura 31B el ARNm de Nrf2 aumentó significativamente con 100 μM de CPF cuando se lo compara con el control.

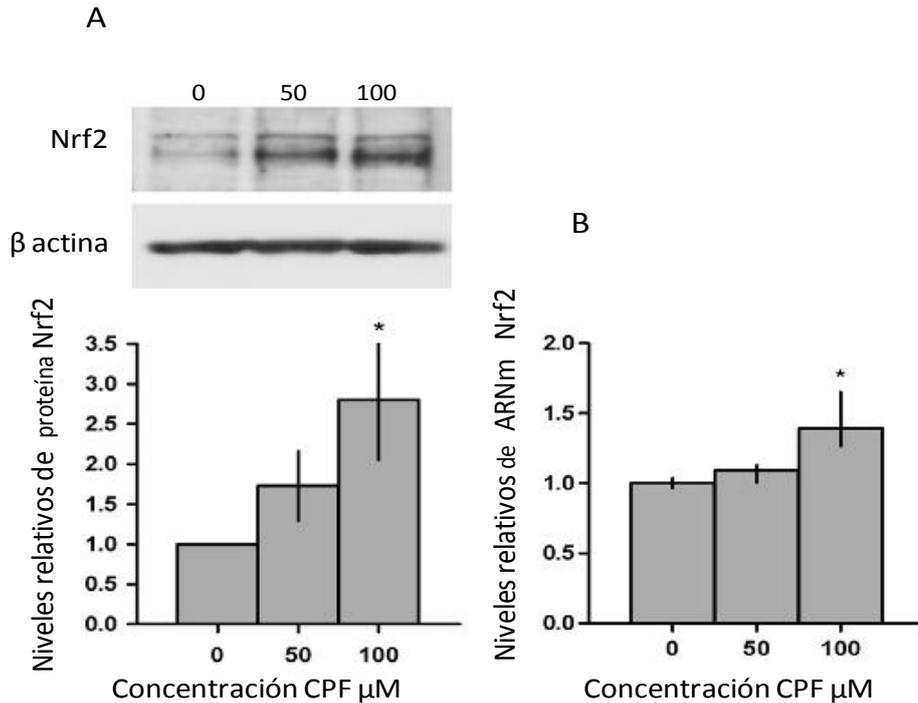


Figura 31. A. Efecto de CPF en los niveles de la proteína Nrf2 y su transcrito en extractos proteicos de células enteras JEG-3. Las células expuestas a CPF (0; 50 ó 100 μM) durante 24 hs se analizaron mediante western blot. Se utilizó anticuerpos anti-Nrf2 y anti-β-actina según se describe en materiales y métodos. La imagen que se muestra es representativa de al menos tres experimentos diferentes. El gráfico de barras representa la cuantificación densitométrica de los niveles relativos de Nrf2 respecto a β-actina de tres experimentos diferentes. Diferencias significativas con el grupo control (0) (*p<0,05). **B.** Expresión del ARNm de Nrf2 en células JEG-3 expuestas a CPF. La expresión se cuantificó por qRT-PCR (ABI 7500, Applied Biosystems). Las células se cultivaron durante 24 hs en presencia de las concentraciones indicadas de CPF o sólo con el vehículo (0). Los resultados fueron normalizados con el transcrito de ciclofilina A y expresados de acuerdo al método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando como calibrador el nivel de ARNm obtenido en la condición control (0). Los datos son presentados como la media ± DE de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado. Diferencias significativas con el grupo control (0) (*p<0.05).

5.2.5 Traslocación de Nrf2

Dado que la traslocación de Nrf2 desde el citoplasma al núcleo es un evento esencial para la inducción de numerosos genes antioxidantes y detoxificantes se analizó el patrón de localización de la proteína Nrf2 en extractos de células JEG-3 tratadas con CPF. El análisis mediante western blot de extractos celulares correspondientes a las fracciones nucleares enriquecidas y sobrenadante utilizando el anticuerpo anti-Nrf2 demostró un traslocación significativo de la proteína Nrf2 en la

fracción nuclear enriquecida luego de 3 hs de exposición a CPF (Fig. 32A). Una cantidad importante de Nrf2 se mantuvo en dicha fracción luego de 24 hs de exposición a CPF, si bien la proporción no fue diferente a la observada en la muestra control, el ensayo confirma el aumento significativo en la cantidad total de Nrf2 frente al agregado de CPF (Fig. 32B). La ausencia del marcador citoplasmático de la proteína GAPDH en la fracción nuclear enriquecida confirma que no hubo contaminación cruzada.

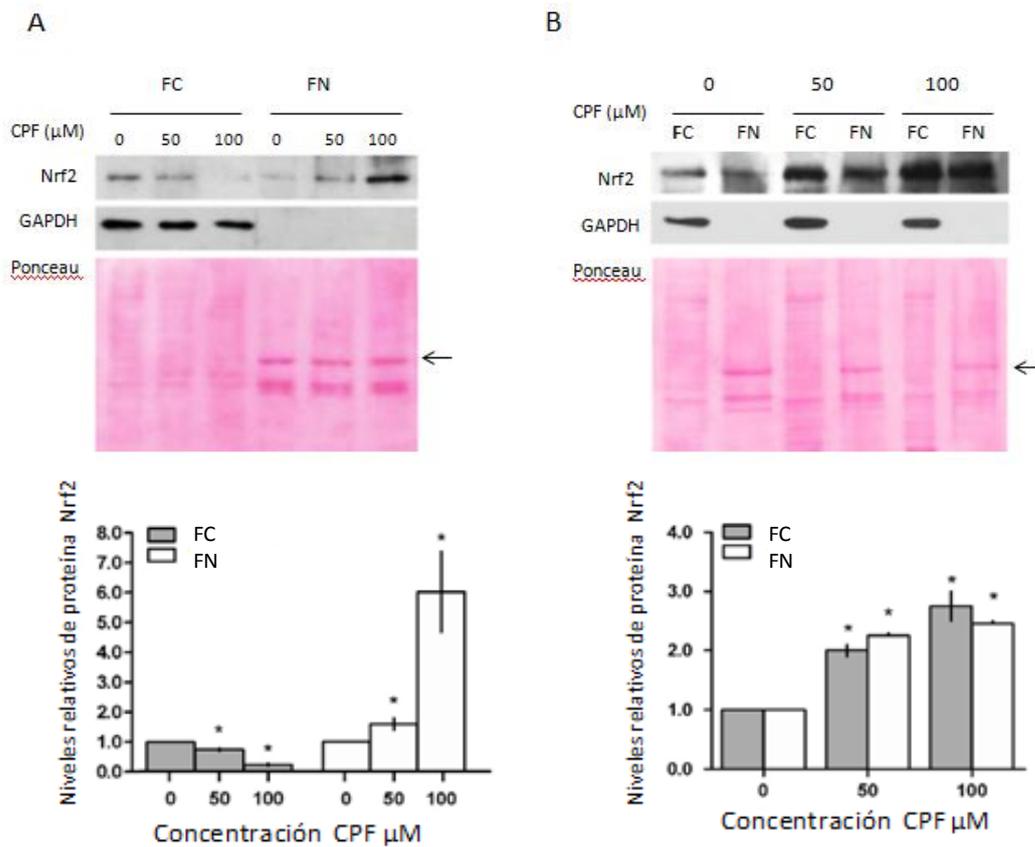


Figura 32. Efecto de CPF en la de la proteína Nrf2. Extractos proteicos preparados de células JEG-3 expuestas a CPF (0; 50 ó 100 μM) por 3 hs (A) y 24 hs (B) se analizaron mediante western blot. Los extractos correspondientes al sobrenadante (FC) y fracciones nucleares enriquecidas (FN) se obtuvieron según se detalló en Materiales y Métodos. Igual cantidad de proteínas de los extractos proteicos fueron sembradas en las correspondientes calles de los geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio para electroforesis. Para el análisis de inmunoblot se utilizó un anticuerpo anti-Nrf2. Se utilizó un anticuerpo anti-GAPDH como control de contaminación. Para normalizar la corrida proteica en los extractos correspondientes a las fracciones nucleares se utilizó la tinción de Ponceau. Las barras representan la cuantificación densitométrica de los niveles relativos de Nrf2 respecto a GAPDH en el sobrenadante (barras grises) y de Nrf2 respecto a la intensidad de la banda señalada con una flecha en la tinción de Ponceau (barras blancas). Los gráficos de barras son representativos de tres experimentos. Diferencias significativas con el grupo control (*p<0,05).

5.2.6 Transcripción de genes de enzimas antioxidantes

Para determinar si el aumento en la expresión y traslocación nuclear de la proteína Nrf2 modula, en parte, la transcripción de los genes que codifican a enzimas del sistema de defensa antioxidante se analizó la expresión de HO-1; SOD1 y GR mediante qRT-PCR en células JEG-3 expuestas a CPF. Como se muestra en la Figura 33, los niveles de ARNm de HO-1 y GR fueron significativamente incrementados, mientras que el de SOD1 se mantuvo sin cambios en las condiciones analizadas. El incremento en los niveles de transcritos de HO-1 se correlacionó con un aumento en sus niveles proteicos tanto a las 3 hs como a las 24 hs de exposición a CPF (Fig. 34).

Estos resultados claramente indican que CPF induce la activación transcripcional de enzimas antioxidantes.

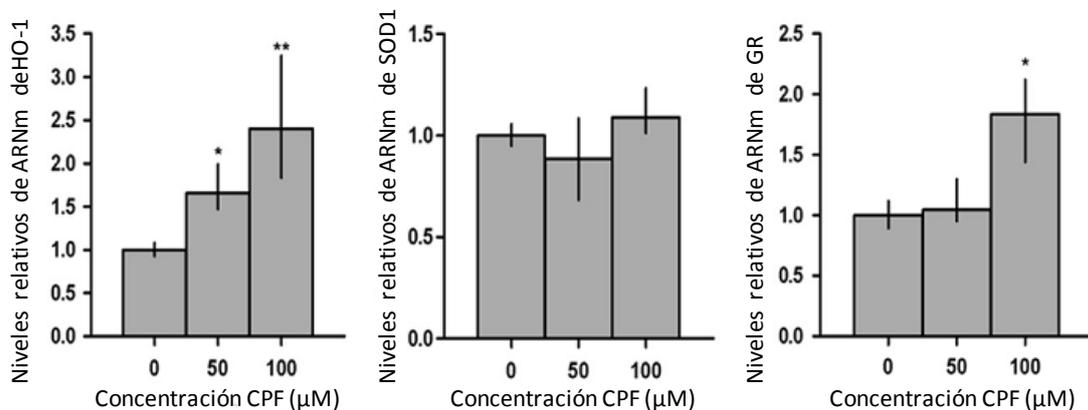


Figura 33. Efecto de CPF en los niveles de expresión de ARNm de HO-1, SOD1 y GR en células JEG-3. La expresión de los genes indicados fue cuantificada por qRT-PCR (ABI 7500, Applied Biosystems). Las células fueron cultivadas durante 24 hs en presencia de las concentraciones indicadas de CPF o sólo con el vehículo (0). Los resultados fueron normalizados con el transcritos de ciclofilina A y expresados de acuerdo al método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando como calibrador el nivel de ARNm obtenido de la condición control (0). Los datos son presentados como la media \pm DE de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado. Diferencias significativas con el grupo control (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

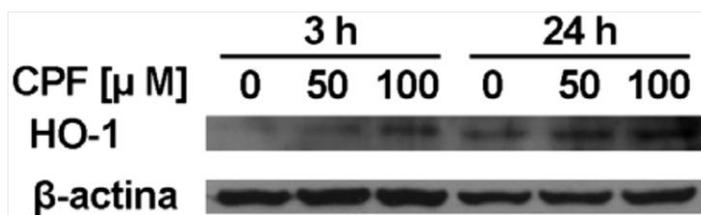


Figura 34. Efecto de CPF en los niveles de la proteína HO-1. Extractos proteicos de células JEG-3 expuestas a CPF (0; 50 ó 100 μ M) durante 3 y 24 hs se analizaron mediante western blot. Se utilizó anticuerpos anti-HO-1 y anti- β -actina según se describe en materiales y métodos. La imagen que se muestra es representativa de al menos dos experimentos diferentes.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Los plaguicidas OFs utilizados ampliamente en la producción agrícola, constituyen una clase importante de químicos contaminantes del medio ambiente. Existe una preocupación creciente sobre los efectos en la salud humana producto de la exposición crónica especialmente sobre grupos vulnerables. Diversos estudios epidemiológicos relacionan la exposición a plaguicidas OFs durante la gestación con el deterioro del crecimiento fetal y del desarrollo (Eskenazi et al. 2010), la disminución del tiempo de gestación (Eskenazi et al. 2004), la disminución de la talla y el peso en el neonato (Perera et al. 2003; Whyatt et al. 2004) y la disminución de la circunferencia de la cabeza del neonato (Berkowitz et al. 2004). Sin embargo, poco se sabe sobre el estrés oxidativo inducido por exposición a OFs en el tejido placentario. Teniendo en cuenta la alta vulnerabilidad del feto a los tóxicos durante el desarrollo intrauterino y considerando que la placenta es una matriz de utilidad para biomonitorizar el efecto de la exposición a xenobióticos (Prouillac and Lecoœur 2010), en este trabajo de tesis se realizaron estudios que permitieron establecer algunos aspectos relevantes relacionados al balance redox de la célula trofoblástica expuesta a plaguicidas.

6.1 Estudio poblacional

La actividad enzimática del biomarcador CaE analizada en homogenatos de placenta de gestantes residentes en áreas rurales durante el período 2009-2011, mostró una disminución significativa indicando que la población objeto de estudio estuvo expuesta a plaguicidas durante el PP. Estos resultados concuerdan con estudios previos realizados en nuestro laboratorio en los que se demostró tanto exposición sistémica a estos tóxicos como exposición en placenta de mujeres embarazadas residentes en el Alto Valle de Río Negro (Vera et al. 2012). Los valores de inhibición hallados en este estudio de tesis representan prácticamente la mitad del nivel de inhibición observado en placentas colectadas en el período 2006-2008 de dicho estudio. Esta discrepancia entre los resultados de diferentes muestreos puede ser explicado por la disminución en el volumen y/o la frecuencia de las aplicaciones en los

últimos años coincidentes con los cambios implementados en el plan de control integrado de plagas (INTA 2006-2007) y sus modificaciones posteriores. Está ampliamente documentado que la medición de CaE es un reconocido blanco secundario y es considerada un indicador sensible de exposición ambiental a plaguicidas OFs, carbamatos y piretroides (Wheelock et al. 2008; Wheelock et al. 2005).

Cabe destacar que la inhibición de CaE puede ser importante como indicador de toxicidad acumulativa a la exposición a múltiples plaguicidas anticolinesterásicos (Cohen 1984; Karanth et al. 2004) como es el caso de la población en estudio. Considerando la acción detoxificante de estas esterasas sobre compuestos exógenos como carbamatos (Sogorb and Vilanova 2002), piretroides (Anand et al. 2006; Nishi et al. 2006) y narcóticos (Redinbo et al. 2003), los resultados obtenidos en este trabajo de tesis en relación a la inhibición de CaE permiten hipotetizar la existencia de un riesgo toxicológico sobre la salud fetal, a corto y/o largo plazo.

La determinación de biomarcadores de estrés oxidativo y del sistema antioxidante como alternativa a la imposibilidad de evaluar las ROS, dada su corta vida media, no mostró diferencias significativas en el contenido de GSH, en las actividades de CAT y GPx placental, como tampoco en la concentración de proteínas carboniladas y en los productos de oxidación lipídica en placentas obtenidas durante el período de pulverización. Sin embargo, un estudio previo de nuestro laboratorio, había informado una mayor actividad de CAT en placentas, asociada a la exposición a OFs en una población rural del valle del Río Negro (Souza et al. 2005). Nuevamente, se puede considerar que la disminución en el volumen y/o la frecuencia de las aplicaciones de OFs en los últimos años, coincidentes con los cambios implementados en el plan de control integrado de plagas (INTA 2006-2007) podría justificar esta discrepancia entre los resultados de diferentes muestreos.

En coincidencia con la ausencia de modificaciones significativas en las actividades de CAT y GPx placental, en el presente estudio no se observaron cambios en los niveles de la proteína Nrf2 en los homogenatos de placentas expuestas.

El crecimiento y el tamaño fetal al nacer son críticos en la determinación de la morbilidad y mortalidad del neonato y su vida posterior. El principal determinante del

crecimiento intrauterino es el suministro de los nutrientes de la placenta al feto; de hecho, en muchas especies, el peso fetal a corto plazo tiene una correlación positiva al peso de la placenta, como una medida aproximada del área de superficie para el transporte materno-fetal de nutrientes. A su vez, la capacidad de transferencia de nutrientes de la placenta depende del tamaño de la misma, la morfología, el flujo de sangre y la expresión de transportadores, además de la síntesis de hormonas y el metabolismo de los nutrientes claves, los cuales influyen en la tasa de crecimiento fetal. Si bien la eficiencia de la placenta está en parte determinada genéticamente y tiene variaciones naturales dependiendo de la especie, raza y número de pariciones, es también sensible a las condiciones ambientales durante el embarazo como disponibilidad de oxígeno, estado de nutrición y características del flujo sanguíneo uterino (Fowden et al. 2009). Los cambios en cualquiera de estos factores, se traducen en disminución de eficiencia placentaria, pudiendo afectar el crecimiento intrauterino. Fowden y col definen eficiencia placentaria como los gramos de feto producidos por gramo de placenta (Fowden et al. 2009). En este trabajo, si bien no se hallaron diferencias significativas entre los parámetros morfométricos de la placenta y el neonato entre los grupos estudiados, se observó una moderada asociación negativa entre la actividad de CAT y el índice placentario en el grupo de gestantes expuestas a OFs (PP) (Fig. 31). En cambio no se encontró asociación entre estas variables en ninguno de los otros grupos estudiados. Dicho índice es una medida de la ineficiencia de la placenta, independiente del sexo fetal (Haeussner et al. 2013). Este resultado sugiere que una menor capacidad para eliminar el H_2O_2 podría producir un desbalance entre la capacidad funcional de la placenta y la demanda fetal. Así, una menor actividad de CAT podría predisponer a la ineficiencia de la placenta, por lo que CAT placentaria podría representar un potencial biomarcador de susceptibilidad a plaguicidas. En este aspecto se requieren estudios adicionales diseñados desde una perspectiva genética-ambiental para examinar los potenciales efectos oxidativos en la placenta de residentes rurales expuestas a OFs. En relación con esto, se ha reportado que las diferencias interindividuales en la expresión de CAT embrionaria y fetal constituyen un determinante de riesgo importante de patologías del desarrollo mediadas por ROS (Abramov and Wells 2011). Resulta además de interés señalar que la

población estudiada estuvo expuesta a OFs en la etapa final del embarazo, un período crítico para el crecimiento intrauterino que se ha asociado con los niveles de estrés oxidativo de la placenta medidos al momento del parto (Min et al. 2009).

En conjunto, los resultados del estudio poblacional indican que si bien la disminución de la actividad de CaE placentaria sugiere exposición medioambiental a plaguicidas en las gestantes de la población rural, no se detectaron cambios en los biomarcadores del sistema antioxidante y de estrés oxidativo, indicando que el balance redox pudo ser sostenido. Adicionalmente sugieren que la actividad de CAT placentaria podría representar un biomarcador de susceptibilidad.

6.2 Limitaciones del estudio

Estos resultados deben ser interpretados considerando algunas limitaciones. Se sabe que el balance oxidativo de la placenta, está sujeto a diversos factores como la dieta, el polimorfismo de las enzimas antioxidantes y detoxificantes, entre otros (Al-Gubory et al. 2010). Como se mencionó la placenta humana es hemocorial y la sangre materna baña directamente el sincitiotrofoblasto del árbol vellosos fetal. Varias evidencias sugieren que es admisible que el flujo de sangre en el espacio intervilloso es intermitente en embarazos normales (Hung and Burton 2006; Hung et al. 2010; Burton and Jauniaux 2004). Esta intermitencia culmina con el parto cuando las contracciones uterinas son más frecuentes y vigorosas (Brar et al. 1988), generando la posibilidad de una lesión de tipo isquemia-reperusión en la placenta. Uno de los muchos efectos nocivos de la reperusión es la producción de ROS que pueden dañar los lípidos de membrana, oxidar el ADN o desnaturalizar proteínas con actividad enzimática, llevando a daño oxidativo celular. Además, la hipoxia-reoxigenación repetitiva causa estrés oxidativo en la placenta humana durante el parto asociado a un aumento oxidativo en la circulación placentofetal y maternal. La asociación entre el modo de trabajo de parto y el estrés oxidativo sigue siendo controversial. Algunos investigadores han observado que el parto vaginal se asocia con aumento de estrés oxidativo en la madre (Fainaru et al. 2002; Inanc et al. 2005; Sridhar et al. 2007), feto y la placenta (Cindrova-Davies et al. 2007), mientras que otros no han podido detectar

relaciones similares (Roberts et al. 2009). La contribución de la placenta al estrés oxidativo durante el parto es confusa. Hung y col. han observado un mayor estrés oxidativo materno antes y después del parto vaginal en comparación con las mujeres que optan por la cesárea (Hung et al. 2011), mientras que otros autores no encontraron diferencias en biomarcadores oxidativo en la placenta humana según el modo de parto (Min et al. 2009; Roberts and Hubel 2009). Un estudio en el cual examinaron el efecto de la duración del trabajo de parto en los marcadores de estrés oxidativo y enzimas antioxidantes encontraron que varios marcadores de estrés oxidativo de la placenta aumentaban como resultado del trabajo de parto de largo plazo (mayor a 15 hs) comparados con aquellos medidos en placentas provenientes de trabajo de parto de corto plazo (menor a 5 hs) (Cindrova-Davies et al. 2007). Con el fin de minimizar estos factores que pueden contribuir a resultados inconsistentes, en el presente estudio se trabajó con muestras de tejido placental provenientes de partos vaginales de gestantes con menos de 10 hs de trabajo de parto. Por otra parte cabe destacar que el factor “horas de trabajo de parto” no fue considerado en otros trabajos (Obolenskaya et al. 2010; Ahamed et al. 2009) quienes hallaron una asociación positiva entre el nivel de contaminantes placentarios y biomarcadores de estrés oxidativo.

6.3 Estudio *in vitro*

Los modelos *in vitro* basados en el uso de líneas celulares establecidas originadas de placenta humana han demostrado ser herramientas útiles para el estudio de expresión y función de proteínas transportadoras, así como en el metabolismo de xenobióticos. Las líneas celulares comúnmente utilizadas en investigación toxicológica son las BeWo, JAR y JEG-3, las cuales están disponibles de hace más de 30 años (Kohler and Bridson 1971; Pattillo and Gey 1968; Pattillo et al. 1971).

En este trabajo se evaluó el impacto de CPF sobre la enzima AChE, blanco principal de acción de los plaguicidas OFs. Se demostró que AChE se expresa en las células JEG-3 y que su actividad fue inhibida por la exposición a CPF. Buratti y col., han reportado que las enzimas citocromos CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19 y CYP3A4 son las

responsables de la formación de derivados oxón de numerosos OFs (Buratti et al. 2003). Además se demostró que CPF oxón es un inhibidor de la enzima AChE tres órdenes de magnitud más potente que el compuesto parental (Forsyth and Chambers 1989). Dado que CYP1A2 y CYP3A4 (Pavek et al. 2007; Storvik et al. 2011) están presentes en las células JEG-3, los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que CPF es convertido a oxón en estas células.

La inhibición de AChE mediada por CPF fue revertida, en parte, por el antioxidante NAC. El agregado previo de NAC al medio de cultivo revirtió de manera significativa la inhibición de la enzima particularmente en bajas dosis de CPF, indicando un potencial efecto protector. NAC es una pro droga capaz de aumentar el contenido de GSH incrementando la tolerancia de las células a los efectos de CPF. Es un conocido antioxidante que puede ser fácilmente desacetilado a L-cisteína, el aminoácido limitante para la síntesis de GSH. Además es reconocido como un importante "scavenger" de ROS. Como se mencionó el H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$ se forman durante el proceso de óxido-reducción llevado a cabo por las enzimas detoxificantes de fase I (Fig. 5). Se ha reportado que el H_2O_2 es, además del O_2 , una molécula utilizada por estas enzimas para realizar las monooxigenaciones, lo cual explicaría en parte, el efecto protector de NAC en la inhibición de AChE ya que se formaría menor cantidad de oxón. Otro mecanismo posible que explicaría la acción protectora del NAC es el referido al efecto del H_2O_2 sobre la expresión de AChE. En este sentido, se demostró en pacientes que presentaban vitiligo acumulación de peróxido de hidrógeno en la epidermis, en el orden milimolar. Este peróxido de manera dependiente de la concentración oxida los residuos metionina y triptófano próximos al sitio catalítico de las enzimas AChE y butirilcolinesterasa epidermal generando su activación/deactivación (Schallreuter et al. 2004; Schallreuter and Elwary 2007).

En coincidencia con el resultado de esta tesis, NAC fue capaz de recuperar la inhibición de AChE del plasma inducida por diazinon en ratas (Shadnia et al. 2007), así como en cerebro de la anguila europea (*Anguilla anguilla*) (Peña-Llopis et al. 2003). Sin embargo su concentración debe ser controlada debido a que puede resultar tóxica para las células. El NAC a altas concentraciones puede actuar como un pro oxidante y comportarse como un catalizador en la formación de radicales libres. La autooxidación

del grupo tiol presente en su estructura se produce en presencia de metales de transición tales como Fe^{+3} , el cual se reduce a su forma catalíticamente activa Fe^{+2} . La autooxidación de este grupo sulfidrilo puede producir $\text{O}_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 . De este modo, factores necesarios para la generación de HO^{\cdot} de acuerdo a la reacción de Fenton tales como H_2O_2 y Fe^{+2} , pueden ser generados durante este proceso (Corinne Sprong et al. 1998). En este trabajo de tesis se utilizó la concentración de 10 mM la cual no produjo reducción en la viabilidad celular.

Es conocida la transferencia placentaria de NAC y la protección que confiere al feto en mujeres embarazadas intoxicadas con paracetamol (Horowitz et al. 1997). En ratas se ha comprobado que el NAC restaura el balance redox fetal y materno producido por infecciones sistémicas e intrauterinas reduciendo la tasa de nacimientos pre término (Buhimschi et al. 2003). También se ha comprobado la capacidad de atenuar la respuesta de citoquinas en la placenta y en el feto, las cuales pueden estar mediadas por el estrés oxidativo en respuesta a una infección materna (Beloosesky et al. 2006).

Por otra parte, Saulsbury y col. han reportado en oligodendrocitos que tanto CPF como CPF oxón, pueden actuar como una fuente de ROS que podría conducir a una injuria celular (Saulsbury et al. 2009). En este trabajo se demuestra la generación de ROS por CPF y el impacto de éstos sobre el sistema antioxidante en las células JEG-3. GSH, el mayor antioxidante no enzimático celular que actúa directa e indirectamente tratando de recuperar el equilibrio redox, se encontró disminuido por acción de CPF y CAT, una de las enzimas de defensa antioxidante más importante destinada a reducir el contenido intracelular de H_2O_2 mostró un aumento en su actividad. El incremento en la actividad de esta enzima en las células expuestas a CPF, puede ser un mecanismo para contrarrestar la generación de ROS. Se ha demostrado modificación del sistema antioxidante en respuesta al estrés oxidativo generado por OFs, en distintos sistemas tales como en linfocitos humanos (Banerjee et al. 1999), en tejido hepático de ratas (Tuzmen et al 2008) y en células neuronales (Giordano et al 2007), entre otros.

Además en respuesta a la exposición a CPF, se demostró la inducción en la expresión de dos de los tres genes detoxificantes de fase II estudiados, HO-1 y GR.

Junto a estas inducciones se comprobó un aumento en la expresión y en la localización nuclear de la proteína Nrf2. Los tres genes antioxidantes estudiados, HO-1, GR y SOD1 tienen en común un elemento de respuesta antioxidante (ARE) en sus promotores y se expresan de manera dependiente de Nrf2. Como se mencionó en la Introducción (ítem 1.2.4.4.1), este factor actuando a través de un elemento de respuesta antioxidante/electrófilo, juega un papel fundamental en la homeostasis redox celular (Kaspar et al. 2009).

El sistema Nrf2/INrf2 detecta principalmente el estrés oxidativo de baja intensidad (Lushchak 2011). En respuesta a esto, Nrf2 se trasloca al núcleo, donde se une a los sitios ARE de los genes blanco para inducir la expresión de múltiples genes de la defensa celular, incluyendo CAT, GR y HO-1 (Alam et al. 1999; Kaspar et al. 2009; Reichard et al. 2007).

Entre los genes estudiados, el que mostró mayor inducción en respuesta al tratamiento con CPF fue el de HO-1. La enzima hemooxigenasa (HO) cataliza la velocidad de la etapa limitante de la oxidación del grupo hemo a biliverdina, monóxido de carbono y hierro libre. Los tres componentes presentan propiedades citoprotectoras. La biliverdina se oxida rápidamente a bilirrubina, un potente antioxidante endógeno, el monóxido de carbono actúa de forma similar al óxido nítrico produciendo vasodilatación y como consecuencia disminuye el tono vascular, inhibe la agregación plaquetaria y las cascadas inflamatorias y apoptóticas. Si bien el hierro libre es capaz de generar ROS mediante la reacción de Fenton, la enzima HO interactúa con las bombas de hierro y además induce la síntesis de ferritina, molécula quelante de hierro. En adición a esto, los niveles de hierro producidos por la acción de esta enzima no tienen un efecto neto en el contenido de hierro libre total intracelular. Se han identificado tres isoenzimas de HO, las isoformas HO-2 y HO-3 son constitutivas y la HO-1 es altamente inducible por diferentes estímulos tales como el grupo hemo, citoquinas, mitógenos, metales, shock térmico, radiaciones UV, hipoxia o hiperoxia y ROS (Maines et al. 1986).

Un creciente número de estudios realizados en varias condiciones experimentales implican a la HO-1 en la regulación del estrés oxidativo (Castilho et al. 2012; Lee et al. 2012; Vicente et al. 2003). En particular, la proteína HO y

específicamente sus derivados participan en la preservación de la quiescencia uterina durante la gestación, la regulación del control hemodinámico en el útero y la placenta, la regulación de las cascadas apoptóticas y antiinflamatorias en células trofoblásticas y lo más importante en el mantenimiento del equilibrio redox del tejido placentario (Bainbridge and Smith 2005). Por otra parte, se ha propuesto que la disminución en la expresión de HO y/o en su actividad durante la gestación, participa en la iniciación de varios procesos patológicos involucrados en la etiología de la preeclampsia (Bainbridge and Smith 2005). En este sentido, en placentas patológicas se demostró mediante análisis inmunohistoquímico una aparente disminución en la expresión de ambas proteínas, HO-1 y HO-2 (Lash et al. 2003) .

Otra de las enzimas antioxidantes analizadas que fue activada transcripcionalmente es la GR, la cual contribuye a mantener el contenido de GSH (Qanungo and Mukherjea 2000). GSH, como se mencionó, es un antioxidante natural de las células que disminuye las ROS. El aumento de la expresión de GR en células JEG-3 tratadas con CPF sugiere que esta molécula está contribuyendo a mejorar la capacidad antioxidante de la célula.

Estos resultados indican que la tolerancia de las células JEG-3 a la exposición a CPF se explica, al menos en parte, por la capacidad de éstas para activar mecanismos de defensa antioxidante. En este sentido las células trofoblásticas tienen la maquinaria intracelular necesaria y la concentración de cofactores para inducir las reacciones metabólicas de fase I y II, el sistema colinérgico, así como la completa variedad de proteínas de transporte y de receptores nucleares implicados en la respuesta de defensa antioxidante (Myatt 2006; Vanderlelie et al. 2008). Si bien los valores de CPF detectados en plasma humano materno en la exposición residencial, están en el rango que va de 0,002 nM hasta 29 nM (Whyatt et al 2003) y difieren ampliamente de las concentraciones utilizadas en este estudio experimental, Buratti y col. propusieron que concentraciones de OFs menores de 10 μ M para estudios in vitro, reflejan condiciones similares a las posibles exposiciones medioambiental en humanos, mientras que, concentraciones superiores a 100 μ M reflejan intoxicación accidental aguda (Buratti et al. 2007).

Como se mencionó, las células JEG-3 son un modelo *in vitro* ampliamente aceptado para evaluar los mecanismos del metabolismo de xenobióticos en la placenta (Myllynen et al. 2005; Prouillac and Lecoeur 2010; Ridano et al. 2012). Si bien no es posible extrapolar directamente los resultados obtenidos con estas células a la respuesta de la placenta *in vivo*, es atractivo proponer que la placenta humana es capaz de controlar el insulto oxidativo generado por la presencia de OFs, como CPF, con el fin de preservar la integridad de las células del trofoblasto y la función placentaria. Cabe considerar que la ausencia de alteraciones significativas en el estado redox de las placentas estudiadas, se asociaría no solo a dicha capacidad sino también, a un bajo nivel de exposición a OFs. La importancia fisiológica de un desequilibrio entre la producción y la eliminación de ROS se ha demostrado durante el embarazo (Agarwal et al. 2005). Está bien documentado que hay una respuesta antioxidante reducida y aumento de la peroxidación de lípidos en pacientes con preeclampsia (Gupta et al. 2005). Ciertamente, ese estrés oxidativo ha sido implicado como un factor clave que contribuye a la patogénesis de una variedad de enfermedades de la placenta que desencadenan la reducción del flujo de sangre de la placenta pudiendo incluso conducir a la muerte fetal (Wruck et al. 2009). Además, un aumento en la producción de hCG por el sincitiotrofoblasto (Barros et al. 2002), así como una correlación positiva entre el nivel sérico de β -hCG y la concentración de H_2O_2 se han reportado en la preeclampsia (Kharfi et al. 2005). Estos hallazgos sugieren que el estrés oxidativo conduce a un aumento en la circulación materna de H_2O_2 que desencadena la secreción de hCG como un citoprotector contra la oxidación. Coincidentemente con estos hallazgos, se ha informado que CPF induce un aumento significativo de β -hCG en células JEG-3 en condiciones en las que no se comprometió la morfología y la viabilidad celular (Ridano et al. 2012).

En resumen, en este trabajo de tesis se demuestra por primera vez que CPF altera el equilibrio redox en células del trofoblasto e induce un aumento de los genes de fase II de detoxificación HO-1 y GR. Además el aumento en los niveles proteicos y traslocación del factor Nrf2, señalan a esta proteína como uno de los factores responsables del aumento transcripcional de dichos genes. Estos resultados sugieren

que la activación de esta vía en placenta podría conferir protección al feto contra las lesiones oxidativas inducidas por xenobióticos.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Los aspectos más relevantes que surgen de este trabajo de tesis en relación al estudio de placentas de mujeres embarazadas del Alto Valle del Río Negro en período de pulverizaciones son los siguientes:

- Se pudo demostrar una inhibición significativa de la actividad de CaE en placentas de gestantes expuestas, sugiriendo que los plaguicidas llegan al tejido placentario.
- No se observaron cambios en los biomarcadores de respuesta antioxidante GSH, CAT y GPx, como tampoco en los biomarcadores de estrés oxidativo, carbonilación de proteínas y lipoperóxidos.
- El contenido proteico de Nrf2 no mostró variaciones significativas en el grupo de población expuesta.
- No se hallaron alteraciones en los parámetros morfométricos de las placentas y los neonatos estudiados.
- Se demostró una moderada asociación negativa entre la actividad de CAT y el índice placentario en el grupo de gestantes expuestas durante el periodo de pulverización.

Los resultados del presente trabajo llevan a concluir que el impacto de la exposición ambiental a plaguicidas, principalmente OFs, en el grupo de mujeres embarazadas residentes en áreas rurales del Alto Valle de Río Negro, no modifica el estado redox de la placenta. Sin embargo el hallazgo de una asociación significativa entre CAT e índice placentario sugiere que CAT podría representar un posible biomarcador de susceptibilidad a plaguicidas. Este hallazgo lleva a proponer un futuro estudio basado en la medición de la actividad de esta enzima, en los que se estratifique a la población expuesta en base a los niveles de CAT placental para evaluar el potencial efecto de dicha exposición en parámetros bioquímicos/moleculares y morfométricos de la placenta.

De los resultados obtenidos del estudio *in vitro* se puede concluir que por exposición de las células JEG3 a concentraciones micromolares de CPF:

- La enzima AChE, blanco primario de OFs, está presente en dichas células y resulta inhibida por CPF.
- La inhibición de AChE por CPF es revertida, en parte, por NAC.
- La exposición a CPF genera ROS.
- La exposición a CPF produjo disminución en el contenido de GSH y aumento en la actividad de CAT.
- Se demostró aumento en la expresión y traslocación de la proteína Nrf2.
- Se demostró inducción en la expresión de los genes detoxificantes de fase II, HO-1 y GR.
- No se observó modificación en la expresión de SOD1 por efecto de CPF.

En resumen, en el modelo celular *in vitro* se demuestra por primera vez que CPF es bioactivado en las células JEG-3 provocando la inhibición de la actividad de AChE, la cual es debida en parte, a la generación de ROS producto de la metabolización de CPF. La disrupción del balance redox, activa mecanismos de defensa antioxidante como el aumento en la actividad de CAT, la inducción de la expresión del factor de transcripción Nrf2 y el aumento de la transcripción de los genes detoxificantes de fase II, HO-1 y GR en células del trofoblasto, sugiriendo una potencial protección al feto contra las lesiones inducidas por xenobióticos. Se propone como futuros trabajos:

- 1) demostrar la participación de la vía Nrf2 / ARE en el aumento de los genes de fase II de detoxificación HO-1 y GR y
- 2) estudiar la participación de vías de señalamiento Akt/GSK3 β / β -catenina en la respuesta celular a CPF para indagar en los mecanismos de supervivencia celular.
- 3) Analizar la respuesta de estrés de retículo endoplásmico a la presencia de CPF.

ANEXOS

ANEXO I

Tabla III. Enzimas metabolizantes de xenobioticos detectadas en placenta humana de acuerdo a la edad gestacional y la metodología aplicada (Myllynen et al. 2005).

Metodología			
CYP	1º trimestre	A término	Observaciones específicas
1A1	Determinación actividad enzimática, RT-PCR, Western blotting	Determinación actividad enzimática, ARNm Northern blotting, RT-PCR, inmunohistoquímica, inmunoinhibición	Única isoforma de CYP metabolizante de xenobioticos cuya expresión e inducibilidad ha sido demostrada en todos los niveles posibles de detección
1A2	RT-PCR	RT-PCR Ensayo de diagnóstico inhibición 7-methoxyresorufin	Inmunoreacción a término
1B1	RT-PCR	+ RT-PCR	Ensayos enzimáticos no relevantes
2C	+ RT-PCR	RT-PCR	Actividad catalítica negativa, inmunodetección negativa
2D6	+ RT-PCR	-, RT-PCR	Actividad catalítica negativa
2E1	+ RT-PCR	+, proteína detectable en Western blotting, ARNm, RT-PCR	Clorzoaxone Glucuronidasa negativo. Resultados contradictorios de acuerdo a datos clínicos. Señal de western blot equívoca
2F1	RT-PCR	RT-PCR	Función no establecida
3A4-7	RT-PCR, positivo en western blot	ARNm Northern blotting RT-PCR, positivo en Western blotting	Varios sustratos marcadores son negativos
4B1	RT-PCR	Western blotting positivo, RT-PCR, ARNm Northern blotting reacción inmunopositiva en Western blotting	Función no establecida
QR	Actividad enzimática +	Actividad enzimática +	No inducción in vivo
NOS	Actividad enzimática +	Actividad enzimática +, inmunodetección +	Efectos de xenobioticos en la NOS placentar no han sido estudiados
GST	Actividad enzimática +	Actividad enzimática +	Sin respuesta o mínima a xenobioticos externos
EH	Actividad enzimática +, detección inmunológica en células trofoblásticas +	Actividad enzimática +	Ninguna correlación definida con el estrés químico y la expresión de EH a término
SULT	Actividad enzimática +	Actividad enzimática +	
NATI	?	Actividad enzimática +	Obviamente polimórfico
UGT1A	Actividad enzimática +	ARNm RT-PCR +, Actividad enzimática +, Western blot +	Correlación positiva con el estado de fumadores
UGT2B, 2B4, 2B7	?	ARNm RT-PCR +, Western blot +, inmunohistoquímica de sincitio de vellosidades placentarias +	
NQO	?	Actividad enzimática +	
ADH	?	Actividad enzimática +	

Tabla IV. Expresión de enzimas metabólicas en función de la edad gestacional y modelos placentarios. (Prouillac and Lecoeur 2010).

	Isoformas P450	Niveles de ARNm	Nivel de proteína	Actividad enzimática	Referencias
1º trimestre de embarazo	CYP1A1	++	-	s/d	(Hakkola et al 1996b)
	CYP1A2	+	s/d	+	(Schutz et al 1993)
	CYP2A	-	-	s/d	(Pasanen et al 1997)
	CYP2B	-	-	s/d	(Bieche et al 2007)
	CYP2D6	+	s/d	s/d	
	CYP3A4	+	+	s/d	
	CYP3A5	+	+	s/d	
	CYP3A7	+	+	s/d	
Placenta a término	CYP1A1	++	+	+	(Hakkola et al 1996a)
	CYP1A2	-	s/d	s/d	
	CYP2A6/7	-	s/d	s/d	
	CYP2B6/7	-	s/d	s/d	
	CYP2C8-19	-	s/d	s/d	
	CYP2D6	-	s/d	s/d	(Hakkola et al 1996a)
	CYP2E1	+	-	-	
	CYP2F1	+	-	-	
	CYP3A4	+	-	-	
	CYP3A5	+	-	-	
	CYP3A7	-	-	-	
	CYP4B1	+	s/d	s/d	(Nishimura et al 2003)
	CYP11A1	++	s/d	+	
CYP19	++	s/d	+		
Células JAR	CYP19	+	+	+	(Nakanishi et al 2002)
	No hay datos de otros citocromos				
Células JEG3	CYP1B1	+	s/d	s/d	(Pelkonen et al 1984)
	CYP2C9	+	s/d	s/d	(Pavek et al 2007)
	CYP3A4	+	s/d	s/d	(Nakanishi et al 2002)
	CYP19	+	+	+	(Samson et al 2009)
	3β-HSD1	+	s/d	+	(Smuc et al 2009)
	17β-HSD1-12	+	s/d	+	
Células BeWo	CYP1A1	+	+	+	(Avery et al 2003)
	CYP1A2	+	+	+	
	CYP2C9	+	s/d	s/d	(Pavek et al 2007)
	CYP3A4	+	s/d	s/d	(Nakanishi et al 2002)
	CYP19	+	+	+	

s/d: sin dato disponible,+ positivo,++ fuertemente positivo,-negativo, HSD hidroxí esteroide deshidrogenasa.

Tabla V. Comparación de la distribución polarizada y expresión relativa del nivel de proteínas/ARNm (inmunohistoquímica, Western blot y la funcionalidad) de los transportadores placentarios relacionados con la disposición de fármacos a través del transportador de interfase materno fetal. s/d: sin dato disponible, + positivo, ++ fuertemente positivo, -negativo, ^a límite de detección (Prouillac and Lecoeur 2010).

Localización	Transportador	Placenta	BeWo	JEG3	JAR	Referencias
Membrana en borde de cepillo (cara materna)	P-gp (MDR1)	++/+	+/+	+/+	++/+	(Evseenko et al 2006; Patel et al 2003; St-Pierre et al 2002) (Pascolo et al 2000; Prouillac et al 2009; Serrano et al 2007; St-Pierre et al 2000)
	MRP2	+/+	++/+	+/sd	++/-	(Evseenko et al 2006; Maliepaard et al 2001; Serrano et al 2007; Yeboah et al 2006)
	MRP8	+/sd	+/sd	++/sd	+/sd	(Patel et al 2003) (Ugele et al 2003) (Serrano et al 2007)
	BCRP	+/+	++/++	+/+	++/+	(Patel et al 2003) (Ugele et al 2003) (Serrano et al 2007)
	OATP1A2(OATP-A)	+/sd	+/sd	+/sd	+/sd	(Sato et al 2003)
	OATP1B1(OATP-C)	+/sd	sd/sd	sd/sd	sd/sd	(Ganapathy et al 2005; Tamai et al 1997)
	OATP3A1(OATP-D)	+/sd	sd/sd	sd/sd	sd/sd	(Lahjouji et al 2004) (Rytting et al 2005; Rytting et al 2007)
	OATP4A1(OATP-E)	sd/+	sd/sd	sd/sd	sd/sd	(Wang et al 2000)
	OCTN1/SLC22A4	+/+	sd/sd	sd/sd	sd/sd	(Barros et al 1995; Yasuda et al 2008)
	OCTN2/SLC22A5	+/+	+/+	sd/sd	sd/sd	(Settle et al 2004)
	NaDC3	sd/+	sd/sd	sd/sd	sd/sd	(Solanky et al 2010; Yasuda et al 2008)
	hENT1/SLC9A1	sd/+	+/+	sd/sd	sd/sd	(Solanky et al 2010; Yasuda et al 2008)
	MCT-4/SLC16A4	+/+	sd/sd	sd/sd	sd/sd	(Solanky et al 2010; Yasuda et al 2008)
	FR α	+/+	+/+	sd/sd	+/sd	(Prasad et al 1996)
PCFT (SLC46A1)	+/+	+/sd	sd/sd	sd/sd	(Bzoskie et al 1997)	
RFC-1 (SLC19A1)	+/+	+/sd	sd/sd	sd/sd		
SERT	+/+	+/+	sd/sd	+/+		
NET	+/+	sd/sd	sd/sd	sd/sd		
Membrana basal (cara fetal)	MDR3	+/>++	+ ^a /+	+ ^a /sd	+ ^a /++	(Evseenko et al 2006; Patel et al 2003)
	MRP5	++/+	+ ^a /sd	sd/sd	sd/sd	(Meyer et al 2005; Pascolo et al 2003)
	OATP2B1(OATP-B)	++/++	+/sd	+/sd	+/sd	(Grube et al 2007; Serrano et al 2007; St-Pierre et al 2002)
	OAT4	++/+	sd/sd	sd/sd	sd/sd	(Cha et al 2001; Ugele et al 2003)
	RFC-1 (SLC19A1)	c	+/+	sd/sd	sd/sd	(Solanky et al 2010; Yasuda et al 2008)
	OCT3	+/+	-/sd	sd/sd	sd/sd	(Sata et al 2005)
	MCT-1/ SLC16A1	+/+	sd/sd	sd/sd	sd/sd	(Settle et al 2004)
Localización controvertida o desconocida	MRP1	+/+	++/++	++/+	+/+	(Evseenko et al 2006; Nagashige et al 2003; St-Pierre et al 2000)

MRP3	+/+	+/sd	+/sd	+/sd	(Serrano et al 2007)
MRP4	+/sd	+/sd	+/sd	+/sd	(Chan et al 2006; Utoguchi et al 1999)
MCT-8	+/+	sd/+	sd/sd	sd/sd	(Price et al 1998; Settle et al 2004)
MCT-3,MCT5,MCT7	+/sd	sd/sd	sd/sd	sd/sd	(Barros et al 1995)
hENT2/SLC29A2	sd/+	sd/sd	sd/sd	sd/sd	

Tabla VI. Secuencias de primers y concentraciones usadas para qRT-PCR.

Nombre	Secuencias (5' - 3')	Concentración nM
SOD1		
Fw	TCA GGA GAC CAT TGC ATC ATT	150
Rv	CGC TTT CCT GTC TTT GTA CTT TCT TC	
GR		
Fw	TCA CGC AGT TAC CAA AAG GAA A	250
Rv	CAC ACC CAA GTC CCC TGC ATA T	
Nrf2		
Fw	AAA CCA GTG GAT CTG CCA AC	200
Rv	GAC CGG GAA TAT CAG GAA CA	
HO-1		
Fw	AGG CCA AGA CTG CGT TCC	150
Rv	GCA GAA TCT TGC ACT TTG TTG CT	
Ciclofilina A		
Fw	GTC AAC CCC ACC GTG TTC TT	100
Rv	CTG CTG TCT TTG GGA CCT TGT	

ANEXO II

NOMBRE PACIENTE:.....		Edad:	
N° MUESTRA:.....		HISTORIA CLINICA N°	
		NIVEL INSTRUCCIÓN: A/P/S/U	
DOMICILIO :.....		FECHA PROBABLE DE PARTO.....	
		FECHA ÚLTIMA MENSTRUACIÓN.....	
• Número de hijos previos.....			
• Duración de los Embarazos de: 6 7 8 9 meses		N° de hijos pevios mamantados.....	
MARCAR LO QUE CORRESPONDA:			
1) Vive o vivió en chacra?		a) Vive desde.....	2) Consume agua de pozo?
SI NO		b) Vivió Desde Hasta	SI NO
3) FUMA estando embarazada?		SI	NO
4) Su marido fuma?		SI	NO
5) En su lugar de trabajo se fuma?		SI	NO
6) Consumo de alcohol:		SI	NO
a) Frecuencia (cuanto día/semana?.....			
b) Qué consume?			
7) Consumo de drogas de adicción		SI	NO
8) Medicación		SI	NO
			Tipo
9) Estado nutricional:		BUENO	MALO
10) Pérdida de peso notable durante el embarazo		SI	NO
11) Se fumiga con insecticidas dentro del hogar, jardín o en su lugar de trabajo?		SI	NO

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abramov JP, Wells PG. Embryoprotective Role of Endogenous Catalase in Acatalasemic and Human Catalase-Expressing Mouse Embryos Exposed in Culture to Developmental and Phenytoin-Enhanced Oxidative Stress. *Toxicol Sci.* 2011;120(2):428-38.
- Abu-Qare AW, Abou-Donia MB. Inhibition and recovery of maternal and fetal cholinesterase enzyme activity following a single cutaneous dose of methyl parathion and diazinon, alone and in combination, in pregnant rats. *J Appl Toxicol.* 2001;21(4):307-16.
- Abu-Qare AW, Brownie CF, Abou-Donia MB. Placental transfer and pharmacokinetics of a single oral dose of [¹⁴C] p-nitrophenol in rats. *Arch Toxicol.* 2000;74(7):388-96.
- Acosta-Maldonado B, Sánchez-Ramírez B, Reza-López S, Levario-Carrillo M. Effects of exposure to pesticides during pregnancy on placental maturity and weight of newborns: a cross-sectional pilot study in women from the Chihuahua State, Mexico. *Hum Exp Toxicol.* 2009;28(8):451-9.
- Adgate JL, Barr DB, Clayton CA, Eberly LE, Freeman N, Liou PJ, et al. Measurement of children's exposure to pesticides: analysis of urinary metabolite levels in a probability-based sample. *Environ Health Perspect.* 2001;109(6):583.
- Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol.* 2012;10(1):49. <http://www.rbej.com/content/10/1/49>
- Agarwal A, Gupta S, Sharma R. Oxidative stress and its implications in female infertility – a clinician's perspective. *Reprod BioMed Online.* 2005;11(5):641-50.
- Ahamed M, Mehrotra PK, Kumar P, Siddiqui MKJ. Placental lead-induced oxidative stress and preterm delivery. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2009;27(1):70-4.
- Alam J, Stewart D, Touchard C, Boinapally S, Choi AMK, Cook JL. Nrf2, a Cap'n'Collar Transcription Factor, Regulates Induction of the Heme Oxygenase-1 Gene. *J Biol Chem* 1999;274(37):26071-8.
- Aldridge WN. Two types of esterases (A and B) hydrolyzing p-nitrophenyl acetate, propionate, butyrate and a method for their determination. *Biochem J.* 1953;53:110-7.
- Al-Gubory KH, Fowler PA, Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(10):1634-50.
- Allen RG, Balin AK. Oxidative influence on development and differentiation: An overview of a free radical theory of development. *Free Rad Biol Med.* 1989;6(6):631-61.
- AM Aboul-Soud M, M. Al-Othman A, E. El-Desoky G, A. Al-Othman Z, Yusuf K, Ahmad J, et al. Hepatoprotective effects of vitamin E/selenium against malathion-induced injuries on the antioxidant status and apoptosis-related gene expression in rats. *J Toxicol Sci.* 2011;36(3):285-96.
- Ames RG, Steenland K, Jenkins B, Chrislip D, Russo J. Chronic neurologic sequelae to cholinesterase inhibition among agricultural pesticide applicators. *Arch Environ Health:* 1995;50(6):440-4.
- Anand SS, Kim K-B, Padilla S, Muralidhara S, Kim HJ, Fisher JW, et al. Ontogeny of hepatic and plasma metabolism of deltamethrin in vitro: role in age-dependent acute neurotoxicity. *Drug Metab Dispos.* 2006;34(3):389-97.
- Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58(5-6):737-47.
- ATSDR. Agency for Toxic Substances and disease registry. 1997.
- Avery et al. The presence of inducible cytochrome P450 types 1A1 and 1A2 in the BeWo cell line. *Placenta.* 2003;24(1):45-52.
- Avery S. Molecular targets of oxidative stress. *Biochem J.* 2011;434:201-10.

- Awasthi YC, Dao D, Lal AK, Srivastava SK. Purification and properties of glutathione peroxidase from human placenta. *Biochem J.* 1979;177:471-6.
- Bainbridge SA, Smith GN. HO in pregnancy. *Free Rad Biol Med.* 2005;38(8):979-88.
- Banerjee B, Seth V, Bhattacharya A, Pasha S, Chakraborty A. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicol Letters.* 1999;107(1):33-47.
- Barata C, Solayan A, Porte C. Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. *Aquat Toxicol.* 2004;66(2):125-39.
- Barr DB, Ananth CV, Yan X, Lashley S, Smulian JC, Ledoux TA, et al. Pesticide concentrations in maternal and umbilical cord sera and their relation to birth outcomes in a population of pregnant women and newborns in New Jersey. *Sci Total Environ.* 2010;408(4):790-5.
- Barros et al. Immunolocalisation of nucleoside transporters in human placental trophoblast and endothelial cells: evidence for multiple transporter isoforms. *Pflügers Archiv.* 1995;429(3):394-9.
- Barros JS, Baptista MG, Bairos VA. Human chorionic gonadotropin in human placentas from normal and preeclamptic pregnancies. *Arch Gynecol Obstet.* 2002;266(2):67-71.
- Barry RC, Lin Y, Wang J, Liu G, Timchalk CA. Nanotechnology-based electrochemical sensors for biomonitoring chemical exposures. *J Expos Sci Environ Epidemiol.* 2008;19(1):1-18.
- Beers RF, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem.* 1952;195(1):133-40.
- Belfroid AC, van Drunen M, Beek MA, Schrap SM, van Gestel CAM, van Hattum B. Relative risks of transformation products of pesticides for aquatic ecosystems. *Sci of Total Environ.* 1998;222(3):167-83.
- Beloosesky R, Gayle DA, Ross MG. Maternal N-acetylcysteine suppresses fetal inflammatory cytokine responses to maternal lipopolysaccharide. *Am J Obst Gynecol* 2006;195(4):1053-7.
- Benirschke K, Burton GJ, Baergen RN. Early development of the human placenta. *Pathology of the human placenta: Springer; 2012.* p. 41-53.
- Berkowitz GS, Wetmur JG, Birman-Deych E, Obel J, Lapinski RH, Godbold JH, et al. In utero pesticide exposure, maternal paraoxonase activity, and head circumference. *Environ Health Perspect.* 2004;112(3):388-91
- Bernirschke P. *Pathology of the human placenta*". Springer 5^o edic. 2006.
- Bhuiyan MB, Murad F, Fant ME. The placental cholinergic system: localization to the cytotrophoblast and modulation of nitric oxide. *Cell Commun Signal.* 2006;4(1):4.
- Bieche et al. Reverse transcriptase-PCR quantification of mRNA levels from cytochrome (CYP) 1, CYP2 and CYP3 families in 22 different human tissues. *Pharmacogenet Genomics.* 2007;17(9):731-42.
- Bischof P, Irminger-Finger I. The human cytotrophoblastic cell, a mononuclear chameleon. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(1):1-16.
- Bode C, Jin H, Rytting E, Silverstein P, Young A, Audus K. In Vitro Models for Studying Trophoblast Transcellular Transport. In: Soares M, Hunt J, editors. *Placenta and Trophoblast: Humana Press; 2006.* p. 225-39.
- Botté ES, Jerry DR, Codi King S, Smith-Keune C, Negri AP. Effects of chlorpyrifos on cholinesterase activity and stress markers in the tropical reef fish *Acanthochromis polyacanthus*. *Mar Pollut Bull.* 2012;65(4-9):384-93.
- Bradman A, Barr DB, Henn BGC, Drumheller T, Curry C, Eskenazi B. Measurement of pesticides and other toxicants in amniotic fluid as a potential biomarker of prenatal exposure: a validation study. *Environ Health Perspect.* 2003;111(14):1779-82.

- Brar HS, Platt LD, DeVore GR, Horenstein J, Medearis AL. Qualitative assessment of maternal uterine and fetal umbilical artery blood flow and resistance in laboring patients by Doppler velocimetry. *Am J Obstet Gynecol*. 1988;158(4):952-6.
- Buhimschi IA, Buhimschi CS, Weiner CP. Protective effect of N-acetylcysteine against fetal death and preterm labor induced by maternal inflammation. *Am J Obst Gynecol*. 2003;188(1):203-8.
- Bulgaroni V, Rovedatti MG, Sabino G, Magnarelli G. Organophosphate pesticide environmental exposure: analysis of salivary cholinesterase and carboxylesterase activities in preschool children and their mothers. *Environ Monit Assess*. 2012;184(5):3307-14.
- Bulgaroni V. Evaluación de la Exposición Residencial a Plaguicidas en población infantil y prevención en salud ambiental. Tesina de Grado Escuela Superior de Salud y medio ambiente UNComahue. 2008.
- Buratti FM, Leoni C, Testai E. Foetal and adult human CYP3A isoforms in the bioactivation of organophosphorothionate insecticides. *Toxicol Letters*. 2006;167(3):245-55.
- Buratti FM, Volpe MT, Meneguz A, Vittozzi L, Testai E. CYP-specific bioactivation of four organophosphorothioate pesticides by human liver microsomes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2003;186(3):143-54.
- Buratti M, Campo L, Fustinoni S, Cirila P, Martinotti I, Cavallo D, et al. Urinary hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons as biomarkers of exposure in asphalt workers. *Biomarkers*. 2007;12(3):221-39.
- Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obst Gynaecol*. 2011a;25(3):287-99.
- Burton GJ, Jauniaux E. Placental Oxidative Stress: From Miscarriage to Preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig*, 2004;11(6):342-52.
- Burton GJ, Yung HW, Cindrova-Davies T, Charnock-Jones DS. Placental Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress in the Pathophysiology of Unexplained Intrauterine Growth Restriction and Early Onset Preeclampsia. *Placenta*. 2009;30, Supplement(0):43-8.
- Bzoskie et al. Human placental norepinephrine transporter mRNA: expression and correlation with fetal condition at birth. *Placenta*. 1997;18(2):205-10.
- Cáceres T, He W, Naidu R, Megharaj M. Toxicity of chlorpyrifos and TCP alone and in combination to *Daphnia carinata*: The influence of microbial degradation in natural water. *Water Res*. 2007;41(19):4497-503.
- Caniggia I, Winter J, Lye SJ, Post M. Oxygen and Placental Development During the First Trimester: Implications for the Pathophysiology of Pre-eclampsia. *Placenta*. 2000;21, Supp A(0):S25-S30.
- Carney Almroth B. Oxidative Damage in Fish Used as Biomarkers in Field and Laboratory Studies. Faculty of Science / Naturvetenskapliga fakulteten. Doctoral Theses / Doktorsavhandlingar Zoologiska institutionen 2008.
- Carter A. Placental oxygen consumption. Part I: in vivo studies—a review. *Placenta*. 2000;21:S31-S7.
- Casanueva E, Viteri FE. Iron and oxidative stress in pregnancy. *J Nutr*. 2003;133(5):1700S-8S.
- Casida J, Quistad G. Organophosphate toxicology: safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. *Chem Res Toxicol*. 2004;17(8):983-98.
- Casida JE, Quistad GB. Serine hydrolase targets of organophosphorus toxicants. *Chem Biol Interact*. 2005;157–158(0):277-83.
- Castilho ÁF, Aveleira CA, Leal EC, Simões NF, Fernandes CR, Meirinhos RI, et al. Heme oxygenase-1 protects retinal endothelial cells against high glucose-and oxidative/nitrosative stress-induced toxicity. *PloS One*. 2012;7(8):e42428.
- Castro JA. Biotransformación de sustancias extrañas al organismo: reacciones y enzimas involucradas; Biotransformation of foreign substances to the organism: involved reactions and enzymes. *Acta Bioquím Clín Latinoam*. 1985;19(2):201-13.

- Cavoski I, Caboni P, Sarais G, Miano T. Degradation and Persistence of Rotenone in Soils and Influence of Temperature Variations. *J Agr Food Chem*. 2008;56(17):8066-73.
- Cecchi A, Rovedatti MG, Sabino G, Magnarelli GG. Environmental exposure to organophosphate pesticides: Assessment of endocrine disruption and hepatotoxicity in pregnant women. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2012;80(0):280-7.
- Cha et al. Identification and characterization of human organic anion transporter 3 expressing predominantly in the kidney. *Mol Pharmacol*. 2001;59(5):1277-86.
- Chambers H, Brown B, Chambers JE. Noncatalytic detoxication of six organophosphorus compounds by rat liver homogenates. *Pesticide biochemistry and physiology*. 1990;36(3):308-15.
- Chambers JE, Boone JS, Carr RL, Chambers HW, Straus DL. Biomarkers as predictors in health and ecological risk assessment. *Hum Ecol Risk Assess*. 2002;8(1):165-76.
- Chan et al. Monocarboxylate transporter 8 expression in the human placenta: the effects of severe intrauterine growth restriction. *J Endocrinol*. 2006;189(3):465-71.
- Chanda SM, Mortensen SR, Moser VC, Padilla S. Tissue-Specific Effects of Chlorpyrifos on Carboxylesterase and Cholinesterase Activity in Adult Rats: An in Vitro and in Vivo Comparison. *Toxicol Sci*. 1997;38(2):148-57.
- Charnock-Jones DS, Burton GJ. Placental vascular morphogenesis. *Best Practice & Res Clin Obst Gynaecol*. 2000;14(6):953-68.
- Chen D, Hu Y, Chen C, Yang F, Fang Z, Wang L, et al. Polymorphisms of the paraoxonase gene and risk of preterm delivery. *Epidemiology*. 2004;15(4):466-70.
- Christopherson SW, Glass RL. Preparation of Milk Fat Methyl Esters by Alcoholysis in an Essentially Nonalcoholic Solution. *J Dairy Sci*. 1969;52(8):1289-90.
- Cindrova-Davies T, Yung H-W, Johns J, Spasic-Boskovic O, Korolchuk S, Jauniaux E, et al. Oxidative Stress, Gene Expression, and Protein Changes Induced in the Human Placenta during Labor. *Am J Pathol*. 2007;171(4):1168-79.
- Classics Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265.
- Cohen SD. Mechanisms of toxicological interactions involving organophosphate insecticides. *Fundam Appl Toxicol*. 1984;4(3, Part 1):315-24.
- Cole T, Jansen K, Park S, Li W-F, Furlong C, Costa L. The Toxicity of Mixtures of Specific Organophosphate Compounds is Modulated by Paraoxonase 1 Status. In: Reddy ST, editor. *Paraoxonases in Inflammation, Infection, and Toxicology*: Humana Press; 2010. p. 47-60.
- Cometa MF, Buratti FM, Fortuna S, Lorenzini P, Volpe MT, Parisi L, et al. Cholinesterase inhibition and alterations of hepatic metabolism by oral acute and repeated chlorpyrifos administration to mice. *Toxicology*. 2007;234(1-2):90-102.
- Copes WJ. Evaluación de barreras vegetales para mitigar la deriva de pulverizaciones. Tesis para obtener el título de Magíster en Intervención Ambiental con orientación en Ingeniería Ambiental. Universidad Nacional del Comahue. 2012.
- Corinne Sprong R, Winkelhuyzen-Janssen AML, Aarsman CJ, van OIRSCHOT JF, van der BRUGGEN T, Sweder van Asbeck B. Low-dose N-acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high-dose increases mortality. *Am Journal Res Crit Care Med*. 1998;157(4):1283-93.
- Correia Carreira S, Cartwright L, Mathiesen L, Knudsen LE, Saunders M. Studying placental transfer of highly purified non-dioxin-like PCBs in two models of the placental barrier. *Placenta*. 2011;32(3):283-91.
- Costa LG. Current issues in organophosphate toxicology. *Clin Chim Acta*. 2006;366(1-2):1-13.
- Crow JA, Borazjani A, Potter PM, Ross MK. Hydrolysis of pyrethroids by human and rat tissues: Examination of intestinal, liver and serum carboxylesterases. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007;221(1):1-12.

- Curl CL, Fenske RA, Elgethun K. Organophosphorus pesticide exposure of urban and suburban preschool children with organic and conventional diets. *Environ Health Perspect.* 2003;111(3):377.
- Davies PE, Cook LSJ. Catastrophic macroinvertebrate drift and sublethal effects on brown trout, *Salmo trutta*, caused by cypermethrin spraying on a Tasmanian stream. *Aquat Toxicol.* 1993;27(3-4):201-24.
- Di Ilio C, Polidoro G, Arduini A, Muccini A, Federici G. Glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione S-transferase, and γ -glutamyltranspeptidase activities in the human early pregnancy placenta. *Biochem Med.* 1983;29(2):143-8.
- Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):47-95.
- Eaton DL, Daroff RB, Autrup H, Bridges J, Buffler P, Costa LG, et al. Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. *Crit Rev Toxicol.* 2008;38(S2):1-125.
- Ecobichon DJ. Pesticide use in developing countries. *Toxicology.* 2001;160(1-3):27-33.
- Egglar AL, Gay KA, Mesecar AD. Molecular mechanisms of natural products in chemoprevention: induction of cytoprotective enzymes by Nrf2. *Mol Nutr Food Res.* 2008;52(S1):S84-S94.
- Eleršek, T; Filipič, M. Organophosphorus Pesticides: Mechanisms of their toxicity. National Institute of Biology Slovenia Pesticides - The Impacts of Pesticides Exposure, Cap. 12 (Ed) ISBN: 978-953-307-531-0, InTech (2011).
- Ellman GL, Courtney KD, Andres jr V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961;7(2):88-95.
- Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959;82(1):70-7.
- Enders AC, Blankenship TN. Comparative placental structure. *Adv Drug Deliv Rev.* 1999;38(1):3-15.
- Enriquez A. Evaluación del riesgo ambiental a la liberación de plaguicidas. Laboratorio de Ecotoxicidad. Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), Chile. Sinexis S.A. Fuente: www.Monografias.com. 2000.
- Eskenazi B, Harley K, Bradman A, Weltzien E, Jewell NP, Barr DB, et al. Association of in utero organophosphate pesticide exposure and fetal growth and length of gestation in an agricultural population. *Environ Health Perspect.* 2004;112(10):1116.
- Eskenazi B, Huen K, Marks A, Harley KG, Bradman A, Barr DB, et al. PON1 and neurodevelopment in children from the CHAMACOS study exposed to organophosphate pesticides in utero. *Environ Health Perspect.* 2010;118(12):1775.
- Evangelista IM, Candela L. Plaguicidas/Pesticide: Aspectos Ambientales, Analíticos Y Toxicológicos. Universidad Jaime I Servicio De; 1998.
- Evseenko DA, Paxton JW, Keelan JA. ABC drug transporter expression and functional activity in trophoblast-like cell lines and differentiating primary trophoblast. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006;290(5):R1357-65
- Evseenko et al. ABC drug transporter expression and functional activity in trophoblast-like cell lines and differentiating primary trophoblast. *Am J Physiol-Regul, Integr Comp Physiol.* 2006;290(5):R1357-R65.
- Fainaru O, Almog B, Pinchuk I, Kupferminc MJ, Lichtenberg D, Many A. Active labour is associated with increased oxidisibility of serum lipids ex vivo. *BJOG: An International J Obst Gynaecol.* 2002;109(8):938-41.
- Fainstein MK. Nrf2: la Historia de un Nuevo Factor de Transcripción que Responde a Estrés Oxidativo. *Revista de Educación Bioquímica.* 2007;26(001):18-25.
- Fant ME, Harbison RD. Syncytiotrophoblast membrane vesicles: A model for examining the human placental cholinergic system. *Teratology.* 1981;24(2):187-99.

- Fitzgerald JS, Germeyer A, Huppertz B, Jeschke U, Knöfler M, Moser G, et al. REVIEW ARTICLE: Governing the Invasive Trophoblast: Current Aspects on Intra-and Extracellular Regulation. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63(6):492-505.
- Forsyth CS, Chambers JE. Activation and degradation of the phosphorothionate insecticides parathion and EPN by rat brain. *Biochem Pharmacol*. 1989;38(10):1597-603.
- Fowden AL, Sferruzzi-Perri AN, Coan PM, Constanca M, Burton GJ. Placental efficiency and adaptation: endocrine regulation. *J Physiol*. 2009;587(14):3459-72.
- Frasco MF, Colletier JP, Weik M, Carvalho F, Guilhermino L, Stojan J, et al. Mechanisms of cholinesterase inhibition by inorganic mercury. *Febs J*. 2007;274(7):1849-61.
- Frasco MF, Fournier D, Carvalho F, Guilhermino L. Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers*. 2005;10(5):360-75.
- Freed VH, Schmedding D, Kohnert R, Haque R. Physical chemical properties of several organophosphates: Some implication in environmental and biological behavior. *Pestic Biochem Physiol*. 1979;10(2):203-11.
- Furlong CE. Paraoxonases: An Historical Perspective. In: Mackness B, Mackness M, Aviram M, Paragh G, editors. *The Paraoxonases: Their Role in Disease Development and Xenobiotic Metabolism*: Springer Netherlands; 2008. p. 3-31.
- Gaetani GF, Ferraris A, Rolfo M, Mangerini R, Arena S, Kirkman H. Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood*. 1996;87(4):1595-9.
- Ganapathy et al, editor. Expression of OCTN1 in placental brush border membrane and its interaction with antidepressants. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*; 2005. ELSEVIER SCIENCE INC 360 PARK AVE SOUTH, NEW YORK, NY 10010-1710 USA.
- Garabrant DH, Aylward LL, Berent S, Chen Q, Timchalk C, Burns CJ, et al. Cholinesterase inhibition in chlorpyrifos workers: Characterization of biomarkers of exposure and response in relation to urinary TCPy. *J Expos Sci Environ Epidemiol*. 2008;19(7):634-42.
- Gauster M, Moser G, Orendi K, Huppertz B. Factors Involved in Regulating Trophoblast Fusion: Potential Role in the Development of Preeclampsia. *Placenta*. 2009;30, Supplement(0):49-54.
- Gavrilescu M. Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. *Eng Life Sci*. 2005;5(6):497-526.
- Genbacev O, Schubach SA, Miller RK. Villous culture of first trimester human placenta-model to study extravillous trophoblast (EVT) differentiation. *Placenta*. 1992;13(5):439-61.
- Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of Human Placental Development by Oxygen Tension. *Science*. 1997;277(5332):1669-72.
- Ghabour MS, Eis ALW, Brockman DE, Pollock JS, Myatt L. Immunohistochemical characterization of placental nitric oxide synthase expression in preeclampsia. *Am J Obst Gynecol*. 1995;173(3, Part 1):687-94.
- Gil F, Pla A. Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure. *J Appl Toxicol*. 2001;21(4):245-55.
- Gil Moya E. Pérdidas de productos fitosanitarios por deriva. *Máquinas y tractores*. 1993;3:76-84.
- Gil Y, Sinfort C. Emission of pesticides to the air during sprayer application: A bibliographic review. *Atmos Environ*. 2005;39(28):5183-93.
- Giordano G, Afsharinejad Z, Guizzetti M, Vitalone A, Kavanagh TJ, Costa LG. Organophosphorus insecticides chlorpyrifos and diazinon and oxidative stress in neuronal cells in a genetic model of glutathione deficiency. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;219(2):181-9.
- Glazier JD, Sibley CP. *In Vitro Methods for Studying Human Placental Amino Acid Transport. Placenta and Trophoblast*: Springer; 2006. p. 241-52.

- González-García B, Olave M, Ramos-Martínez E, González-Horta C, Levario-Carrillo M, Sanchez-Ramirez B. Decrease of muscarinic cholinergic receptors expression in placenta from rats exposed to methyl parathion. *Hum Exp Toxicol*. 2008;27(3):241-6.
- Grisaru D, Sternfeld M, Eldor A, Glick D, Soreq H. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur J Biochem*. 1999;264(3):672-86.
- Grube et al. Organic anion transporting polypeptide 2B1 and breast cancer resistance protein interact in the transepithelial transport of steroid sulfates in human placenta. *Drug Metab Dis*. 2007;35(1):30-5.
- Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Reprod Update*. 2001;7(2):175-89.
- Gupta A, Agarwal R, Shukla GS. Functional impairment of blood-brain barrier following pesticide exposure during early development in rats. *Hum Exp Toxicol*. 1999;18(3):174-9.
- Gupta R, Goad J, Milatovic D, Dettbarn W. Cholinergic and noncholinergic brain biomarkers of insecticide exposure and effects. *Hum Exp Toxicol*. 2000;19(5):297-308.
- Gupta RC. Classification and uses of organophosphates and carbamates. *Toxicology of organophosphate and carbamate compounds* Elsevier Academic Press, Amsterdam. 2006:5-24.
- Gupta S, Agarwal A, Sharma RK. The role of placental oxidative stress and lipid peroxidation in preeclampsia. *Obst Gynecol Surv*. 2005;60(12):807-16.
- Haeussner E, Schmitz C, von Koch F, Frank HG. Birth weight correlates with size but not shape of the normal human placenta. *Placenta*. 2013;34(7):574-82.
- Hakkola et al. Detection of cytochrome P450 gene expression in human placenta in first trimester of pregnancy. *Biochem Pharmacol*. 1996b;52(2):379-83.
- Hakkola et al. Expression of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 Forms in human full-term placenta. *Biochem Pharmacol*. 1996a;51(4):403-11.
- Halliwell B, Gutteridge J. *Free radicals in biology and medicine*. Ref Type: Generic Fourth edition Biosciences OXFORD. 2007.
- Harnly M, McLaughlin R, Bradman A, Anderson M, Gunier R. Correlating agricultural use of organophosphates with outdoor air concentrations: a particular concern for children. *Environ Health Perspect*. 2005;113(9):1184.
- He F. Biological monitoring of exposure to pesticides: current issues. *Toxicology Letters*. 1999;108(2-3):277-83.
- Hernández AF, López O, Rodrigo L, Gil F, Pena G, Serrano JL, et al. Changes in erythrocyte enzymes in humans long-term exposed to pesticides: Influence of several markers of individual susceptibility. *Toxicology Letters*. 2005;159(1):13-21.
- Hilz E, Vermeer AWP. Spray drift review: The extent to which a formulation can contribute to spray drift reduction. *Crop Protection*. 2013;44(0):75-83.
- Horowitz RS, Dart RC, Jarvie DR, Bearer CF, Gupta U. Placental transfer of N-acetylcysteine following human maternal acetaminophen toxicity. *Clin Toxicol*. 1997;35(5):447-51.
- Huang H-C, Nguyen T, Pickett CB. Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proc Nat Acad Sci* 2000;97(23):12475-80.
- Huen K, Bradman A, Harley K, Yousefi P, Boyd Barr D, Eskenazi B, et al. Organophosphate pesticide levels in blood and urine of women and newborns living in an agricultural community. *Environ Res*. 2012;117(0):8-16.
- Huen K, Harley K, Brooks J, Hubbard A, Bradman A, Eskenazi B, et al. Developmental changes in PON1 enzyme activity in young children and effects of PON1 polymorphisms. *Environ Health Perspect*. 2009;117(10):1632-8.
- Hung T-H, Burton GJ. Hypoxia and Reoxygenation: a Possible Mechanism for Placental Oxidative Stress in Preeclampsia. *Taiwan J Obst Gynecol*. 2006;45(3):189-200.

- Hung T-H, Chen S-F, Hsieh Ts-Ta, Lo L-M, Li M-J, Yeh Y-L. The associations between labor and delivery mode and maternal and placental oxidative stress. *Reprod Toxicol*. 2011;31(2):144-50.
- Hung T-H, Lo L-M, Chiu T-H, Li M-J, Yeh Y-L, Chen S-F. A longitudinal study of oxidative stress and antioxidant status in women with uncomplicated pregnancies throughout gestation. *Reproduc Sci*. 2010;17(4):401-9.
- Hung T-H, Skepper JN, Burton GJ. In Vitro Ischemia-Reperfusion Injury in Term Human Placenta as a Model for Oxidative Stress in Pathological Pregnancies. *Am J Pathol*. 2001;159(3):1031-43.
- Hutson JR, Garcia-Bournissen F, Davis A, Koren G. The Human Placental Perfusion Model: A Systematic Review and Development of a Model to Predict In Vivo Transfer of Therapeutic Drugs. *Clin Pharmacol Ther*. 2011;90(1):67-76.
- Imai T. Human carboxylesterase isozymes: catalytic properties and rational drug design. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2006;21(3):173-85.
- Inanc F, Kilinc M, Kiran G, Guven A, Kurutas E, Cikim IG, et al. Relationship between oxidative stress in cord blood and route of delivery. *Fetal Diag Ther*. 2005;20(5):450-3.
- INTA. GUIA DE PULVERIZACIONES para los cultivos de manzana, peral, frutales de carozo y vid. Estación Experimental Alto Valle Centro Regional Patagonia Norte. 2006-2007.
- Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, O'Connor T, Yamamoto M. Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells*. 2003;8(4):379-91.
- Jaiswal AK. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radl Biol Med*. 2004;36(10):1199-207.
- James J, Stone P, Chamley L. The regulation of trophoblast differentiation by oxygen in the first trimester of pregnancy. *Human Reprod Update*. 2006;12(2):137-44.
- Jauniaux E, Gulbis B, Burton GJ. The Human First Trimester Gestational Sac Limits Rather than Facilitates Oxygen Transfer to the Foetus—A Review. *Placenta*. 2003a;24:S86-S93.
- Jauniaux E, Hempstock J, Greenwold N, Burton GJ. Trophoblastic oxidative stress in relation to temporal and regional differences in maternal placental blood flow in normal and abnormal early pregnancies. *Am J Pathol*. 2003b;162(1):115-25.
- Jauniaux E, Poston L, Burton GJ. Placental-related diseases of pregnancy: involvement of oxidative stress and implications in human evolution. *Hum Reprod Update*. 2006;12(6):747-55.
- Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao Y-P, Skepper JN, Burton GJ. Onset of Maternal Arterial Blood Flow and Placental Oxidative Stress: A Possible Factor in Human Early Pregnancy Failure. *Am J Pathol*. 2000;157(6):2111-22.
- Jekel M, Reemtsma T. Organic pollutants in the water cycle. Wiley-VCH; 2006.
- Jeyaratnam J. Acute pesticide poisoning: a major global health problem. *World Health Stat Q*. 1990;43(3):139-44.
- Ji L, Brkić J, Liu M, Fu G, Peng C, Wang Y-L. Placental trophoblast cell differentiation: Physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia. *Mol Aspects Med*. 2013;34(5):981-1023.
- Jokanović M. Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology*. 2001;166(3):139-60.
- Kalyanaraman B. Teaching the Basics of Redox Biology to Medical and Graduate Students: Oxidants, Antioxidants and Disease Mechanisms. *Redox Biol*. 2013;1(1):244-257
- Kappers WA, Edwards RJ, Murray S, Boobis AR. Diazinon Is Activated by CYP2C19 in Human Liver. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2001;177(1):68-76.
- Karalliedde LD, Edwards P, Marrs TC. Variables influencing the toxic response to organophosphates in humans. *Food Chem Toxicol*. 2003;41(1):1-13.

- Karanth S, Liu J, Olivier Jr K, Pope C. Interactive toxicity of the organophosphorus insecticides chlorpyrifos and methyl parathion in adult rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004;196(2):183-90.
- Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Rad Biol Med*. 2009;47(9):1304-9.
- Kavitha P, Rao JV. Toxic effects of chlorpyrifos on antioxidant enzymes and target enzyme acetylcholinesterase interaction in mosquito fish, *Gambusia affinis*. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2008;26(2):192-8.
- Kavvalakis MP, Tsatsakis AM. The atlas of dialkylphosphates; assessment of cumulative human organophosphorus pesticides' exposure. *Forensic Sci Int*. 2012;218(1-3):111-22.
- Kawashima K, Fujii T. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: overview of non-neuronal cholinergic systems and their biological significance. *J Pharmacol Sci*. 2008;106(2):167-73.
- Keller M, Robitzki A, Layer PG. Anticholinesterase treatment of chicken retinal cells increases acetylcholinesterase protein independently of protein kinase C. *Neurosci Letters*. 2001;309(1):21-4.
- Keppler D. Export pumps for glutathione S-conjugates. *Free Rad Biol Med*. 1999;27(9):985-91.
- Kharfi A, Giguère Y, De Grandpré P, Moutquin J-M, Forest J-C. Human chorionic gonadotropin (hCG) may be a marker of systemic oxidative stress in normotensive and preeclamptic term pregnancies. *Clin Biochem*. 2005;38(8):717-21.
- Kirkman HN, Gaetani GF. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends Biochem Sci*. 2007;32(1):44-50.
- Kliman H, Nestler J, SERMASI E, SANGER JM, STRAUSS JF. Purification, Characterization, and in vitro Differentiation of Cytotrophoblasts from Human Term Placentae. *Endocrinology*. 1986;118(4):1567-82.
- Knöfler M. Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. *Int J Dev Biol*. 2010;54(2-3):269.
- Kobayashi A, Kang M-I, Okawa H, Ohtsuji M, Zenke Y, Chiba T, et al. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol*. 2004;24(16):7130-9.
- Kohler P, Bridson W. Isolation of Hormone-Producing Clonal Lines of Human Choriocarcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.*, 1971;32(5):683-7.
- Kritharides L, Upston J, Jessup W, Dean RT. Accumulation and metabolism of low density lipoprotein-derived cholesteryl linoleate hydroperoxide and hydroxide by macrophages. *J Lipid Res*. 1998;39(12):2394-405.
- Kumar S, Mukerji K, Lai R. Molecular aspects of pesticide degradation by microorganisms. *Crit Rev Microbiol*. 1996;22(1):1-26.
- Lahjouji et al. L-Carnitine transport in human placental brush-border membranes is mediated by the sodium-dependent organic cation transporter OCTN2. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;287(2):C263-C9.
- Lash GE, McLaughlin BE, MacDonald-Goodfellow SK, Smith GN, Brien JF, Marks GS, et al. Relationship between tissue damage and heme oxygenase expression in chorionic villi of term human placenta. *Am J Physiol Heart Cir Physiol*. 2003;284(1):H160-H7.
- Lassiter T, Barone S, Moser V, Padilla S. Gestational exposure to chlorpyrifos: dose response profiles for cholinesterase and carboxylesterase activity. *Toxicol Sci* 1999;52(1):92-100.
- Latini G, Knipp G, Mantovani A, Marcovecchio M, Chiarelli F, Soder O. Endocrine disruptors and human health. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2010;10(9):846-55.
- Lee JE, Park JH, Shin IC, Koh HC. Reactive oxygen species regulated mitochondria-mediated apoptosis in PC12 cells exposed to chlorpyrifos. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012;263(2):148-62.

- Levario-Carrillo M, Amato D, Ostrosky-Wegman P, González-Horta C, Corona Y, Sanin LH. Relation between pesticide exposure and intrauterine growth retardation. *Chemosphere*. 2004;55(10):1421-7.
- Levario-Carrillo M, Feria-Velasco A, De Celis R, Ramos-Martínez E, Córdova-Fierro L, Solís FJ. Parathion, a cholinesterase-inhibiting plaguicide induces changes in tertiary villi of placenta of women exposed: a scanning electron microscopy study. *Gynecol Obst Invest*. 2001;52(4):269-75.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz A-G, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1990;186:464.
- Lionetto MG, Caricato R, Calisi A, Giordano ME, Schettino T. Acetylcholinesterase as a Biomarker in Environmental and Occupational Medicine: New Insights and Future Perspectives. *BioMed research international*. 2013;.Article ID 321213, 8 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/321213>.
- Lips KS, Brüggmann D, Pfeil U, Vollerthun R, Grando SA, Kummer W. Nicotinic acetylcholine receptors in rat and human placenta. *Placenta*. 2005;26(10):735-46.
- Little C, O'Brien PJ. An intracellular GSH-peroxidase with a lipid peroxide substrate. *Biochem Biophys Res Comm*. 1968;31(2):145-50.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
- Loewy R, Carvajal L, Novelli M, Pechén de D'Angelo A. Effect of pesticide use in fruit production orchards on shallow ground water. *J Environ Sci Health, Part B*. 2003;38(3):317-25.
- Loewy RM, Monza LB, Kirs VE, Savini MC. Pesticide distribution in an agricultural environment in Argentina. *J Environ Sci Health, Part B*. 2011;46(8):662-70.
- Longtine MS, Chen B, Odibo AO, Zhong Y, Nelson DM. Caspase-mediated apoptosis of trophoblasts in term human placental villi is restricted to cytotrophoblasts and absent from the multinucleated syncytiotrophoblast. *Reproduction*. 2012;143(1):107-21.
- López O, Hernández AF, Rodrigo L, Gil F, Pena G, Serrano JL, et al. Changes in antioxidant enzymes in humans with long-term exposure to pesticides. *Toxicology Letters*. 2007;171(3):146-53.
- Lotti M, Moretto A. Organophosphate-Induced Delayed Polyneuropathy. *Toxicol Rev*. 2005;24(1):37-49.
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265.
- Lu J, Holmgren A. Selenoproteins. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(2):723-7.
- Lu J, Wu L, Newman J, Faber B, Merhaut DJ, Gan J. Sorption and Degradation of Pesticides in Nursery Recycling Ponds. *J Environ Qual*. 2006;35(5):1795-802.
- Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F. Control of human trophoblast function. *Reprod Biol Endocrinol*. 2007;5(6).
- Luo ZC, Fraser WD, Julien P, Deal CL, Audibert F, Smith GN, et al. Tracing the origins of "fetal origins" of adult diseases: Programming by oxidative stress? *Med Hypotheses*. 2006;66(1):38-44.
- Lushchak V. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2011;153(2):175-90.
- Ma Q. Transcriptional responses to oxidative stress: pathological and toxicological implications. *Pharmacol Ther*. 2010;125(3):376-93.
- Magnarelli G, Fonovich T. Protein phosphorylation pathways disruption by pesticides. *Adv Biol Chem*. 2013;3:460-74.
- Maines MD, Trakshel GM, Kutty RK. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem*. 1986;261(1):411-9.

- Majewski MS, Capel PD. Pesticides in the atmosphere: distribution, trends, and governing factors. CRC Press; 2010.
- Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell*. 2010;40(2):294-309.
- Maliepaard et al. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res*. 2001;61(8):3458-64.
- Manno M, Viau C, Cocker J, Colosio C, Lowry L, Mutti A, et al. Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA). *Toxicol Letters*. 2010;192(1):3-16.
- Marin JGG, Briz O, Serrano MA. A Review on the Molecular Mechanisms Involved in the Placental Barrier for Drugs. *Curr Drug Deliv*. 2004;1(3):275-89.
- Martínez Vidal J, Plaza-Bolanos P, Romero-González R, Garrido Frenich A. Determination of pesticide transformation products: A review of extraction and detection methods. *J Chromatog A*. 2009;1216(40):6767-88.
- Matsumura F. Toxicology of insecticides. Plenum Press New York; 1985.
- McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Chanas SA, Henderson CJ, McLellan LI, et al. The Cap 'n' Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. *Cancer Res*. 2001;61(8):3299-307.
- Mendelson CR, Jiang B, Shelton JM, Richardson JA, Hinshelwood MM. Transcriptional regulation of aromatase in placenta and ovary. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2005;95(1-5):25-33.
- Merlot E, Couret D, Otten W. Prenatal stress, fetal imprinting and immunity. *Brain, Behav Immun*. 2008;22(1):42-51.
- Meyer et al. Expression, localization, and function of MRP5 (ABCC5), a transporter for cyclic nucleotides, in human placenta and cultured human trophoblasts: effects of gestational age and cellular differentiation. *Am J Pathol*. 2005;166(1):39-48.
- Min J, Park B, Kim YJ, Lee H, Ha E, Park H. Effect of Oxidative Stress on Birth Sizes: Consideration of Window from Mid Pregnancy to Delivery. *Placenta*. 2009;30(5):418-23.
- Morgan EW, Yan BF, Greenway D, Petersen DR, Parkinson A. Purification and Characterization of Two Rat-Liver Microsomal Carboxylesterases (Hydrolase A and B). *Arch Biochem Biophys*. 1994;315(2):495-512.
- Moser G, Gauster M, Orendi K, Glasner A, Theuerkauf R, Huppertz B. Endoglandular trophoblast, an alternative route of trophoblast invasion? Analysis with novel confrontation co-culture models. *Hum Reprod*. 2010;25(5):1127-36.
- Motohashi H, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med*. 2004;10(11):549-57.
- Mutch E, Daly A, Leathart JS, Blain P, Williams F. Do multiple cytochrome P450 isoforms contribute to parathion metabolism in man? *Arch Toxicol*. 2003;77(6):313-20.
- Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol*. 2004;122(4):369-82.
- Myatt L, Eis ALW, Brockman DE, Kossenjans W, Greer I, Lyall F. Inducible (type II) nitric oxide synthase in human placental villous tissue of normotensive, pre-eclamptic and intrauterine growth-restricted pregnancies. *Placenta*. 1997;18(4):261-8.
- Myatt L. Placental adaptive responses and fetal programming. *J Physiol*. 2006;572(1):25-30.
- Myllynen P, Pasanen M, Pelkonen O. Human placenta: a human organ for developmental toxicology research and biomonitoring. *Placenta*. 2005;26(5):361-71.
- Myllynen P, Pasanen M, Vähäkangas K. The fate and effects of xenobiotics in human placenta. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2007;3(3):331-46
- Nagashige et al. Basal membrane localization of MRP1 in human placental trophoblast. *Placenta*. 2003;24(10):951-8.

- Nakamura O. Children's Immunology, what can we learn from animal studies (1): Decidual cells induce specific immune system of feto-maternal interface. *J Toxicol Sci.* 2009;34(Special Issue 2):SP331-SP9.
- Nakanishi et al. Trialkyltin compounds enhance human CG secretion and aromatase activity in human placental choriocarcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(6):2830-7.
- Ni Z, Mao Q. ATP-binding cassette efflux transporters in human placenta. *Curr Pharm Biotechnol.* 2011;12(4):674-85.
- Nishi K, Huang H, Kamita SG, Kim I-H, Morisseau C, Hammock BD. Characterization of pyrethroid hydrolysis by the human liver carboxylesterases hCE-1 and hCE-2. *Arch Biochem Biophys.* 2006;445(1):115-23.
- Nishimura et al. Tissue distribution of mRNA expression of human cytochrome P450 isoforms assessed by high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku zasshi: J Pharm Soc Japan.* 2003;123(5):369-5.
- Niture SK, Jain AK, Jaiswal AK. Antioxidant-induced modification of Nrf2 cysteine 151 and PKC- δ -mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance. *J Cell Sci.* 2009;122(24):4452-64.
- Niture SK, Jain AK, Shelton PM, Jaiswal AK. Src subfamily kinases regulate nuclear export and degradation of transcription factor Nrf2 to switch off Nrf2-mediated antioxidant activation of cytoprotective gene expression. *J Biol Chemistry.* 2011;286(33):28821-32.
- Niture SK, Khatri R, Jaiswal AK. Regulation of Nrf2—An update. *Free Rad Biol Med.* 2013;66:36-44.
- Obolenskaya MY, Teplyuk NM, Divi RL, Poirier MC, Filimonova NB, Zadrozna M, et al. Human placental glutathione S-transferase activity and polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts as biomarkers for environmental oxidative stress in placentas from pregnant women living in radioactivity-and chemically-polluted regions. *Toxicol Letters.* 2010;196(2):80-6.
- Ohayo-Mitoko GJ, Kromhout H, Simwa JM, Boleij JS, Heederik D. Self reported symptoms and inhibition of acetylcholinesterase activity among Kenyan agricultural workers. *Occup Environ Med.* 2000;57(3):195-200.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95(2):351-8.
- OMS. Comité de expertos de la oms en especificaciones para las preparaciones farmacéuticas. 1992.
- Orellana B, Guajardo T. Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Revista médica de Chile.* 2004;132(1):85-94.
- Orendi K, Kivity V, Sammar M, Grimpel Y, Gonen R, Meiri H, et al. Placental and trophoblastic in vitro models to study preventive and therapeutic agents for preeclampsia. *Placenta.* 2011;32, Supp 1(0):S49-S54.
- Osburn WO, Kensler TW. Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. *Mut Res.* 2008;659(1):31-9.
- Ostrea Jr EM, Bielawski DM, Posecion Jr NC, Corrion M, Villanueva-Uy E, Bernardo RC, et al. Combined analysis of prenatal (maternal hair and blood) and neonatal (infant hair, cord blood and meconium) matrices to detect fetal exposure to environmental pesticides. *Environ Res.* 2009;109(1):116-22.
- Ostrea Jr EM, Morales V, Ngoumgn E, Prescilla R, Tan E, Hernandez E, et al. Prevalence of Fetal Exposure to Environmental Toxins as Determined by Meconium Analysis. *Neurotoxicology.* 2002;23(3):329-39.
- Panigel M. The human placenta. Anatomy and morphology. *Clin Obst Gynaecol.* 1986;13(3):421.

- Partanen HA, El-Nezami HS, Leppänen JM, Myllynen PK, Woodhouse HJ, Vähäkangas KH. Aflatoxin B1 Transfer and Metabolism in Human Placenta. *Toxicol Sci.* 2010;113(1):216-25.
- Pasanen et al. Intrahepatic cholestasis of pregnancy impairs the activities of human placental xenobiotic and steroid metabolizing enzymes in vitro. *Placenta.* 1997;18(1):37-41.
- Pasanen M. The expression and regulation of drug metabolism in human placenta. *Adv Drug Deliv Rev.* 1999;38(1):81-97.
- Pascolo et al. Detection of MRP1mRNA in Human Tumors and Tumor Cell Lines by in Situ RT-PCR. *Biochem Biophys Res Comm.* 2000;275(2):466-71.
- Pascolo et al. Effects of maturation on RNA transcription and protein expression of four MRP genes in human placenta and in BeWo cells. *Biochem Biophys Res Comm.* 2003;303(1):259-65.
- Patel et al. Semi Quantitative Expression Analysis of MDR3, FIC1, BSEP, OATP-A, OATP-C, OATP-D, OATP-E and NTCP Gene Transcripts in 1st and 3rd Trimester Human Placenta. *Placenta.* 2003;24(1):39-44.
- Pattillo RA, Gey GO, Delfs E, Huang WY, Hause L, Garancis J, et al. THE HORMONE-SYNTHESIZING TROPHOBLASTIC CELL IN VITRO: A MODEL FOR CANCER RESEARCH AND PLACENTAL HORMONE SYNTHESIS. *Ann N Y Acad Sci.* 1971;172(10):288-98.
- Pattillo RA, Gey GO. The Establishment of a Cell Line of Human Hormone-synthesizing Trophoblastic Cells in Vitro. *Cancer Res.* 1968;28(7):1231-6.
- Pavek P, Cerveny L, Svecova L, Brysch M, Libra A, Vrzal R, et al. Examination of Glucocorticoid Receptor α -Mediated Transcriptional Regulation of P-glycoprotein, CYP3A4, and CYP2C9 Genes in Placental Trophoblast Cell Lines. *Placenta.* 2007;28(10):1004-11.
- Pelkonen et al. Genetic and environmental regulation of aryl hydrocarbon hydroxylase in man: studies with liver, lung, placenta, and lymphocytes. *Toxicol Pathol* 1984;12:256–260.
- Peña-Llopis S, Ferrando Rodrigo D, Peña JB. Increased recovery of brain acetylcholinesterase activity in dichlorvos-intoxicated European eels *Anguilla anguilla* by bath treatment with N-acetylcysteine, *Dis Aquat Organ.* 2003 55(3):237-45.
- Perera FP, Rauh V, Tsai W-Y, Kinney P, Camann D, Barr D, et al. Effects of transplacental exposure to environmental pollutants on birth outcomes in a multiethnic population. *Environ Health Perspect.* 2003;111(2):201-5.
- Poston L, Rajmakers MTM. Trophoblast Oxidative Stress, Antioxidants and Pregnancy Outcome—A Review. *Placenta.* 2004;25, Supp (0):S72-S8.
- Prasad et al. Functional expression of the plasma membrane serotonin transporter but not the vesicular monoamine transporter in human placental trophoblasts and choriocarcinoma cells. *Placenta.* 1996;17(4):201-7.
- Price et al. Cloning and sequencing of four new mammalian monocarboxylate transporter (MCT) homologues confirms the existence of a transporter family with an ancient past. *Biochem J.* 1998;329:321-8.
- Prouillac C, Lecoer S. The role of the placenta in fetal exposure to xenobiotics: importance of membrane transporters and human models for transfer studies. *Drug Metab Dis.* 2010;38(10):1623-35.
- Prouillac et al. Induction of cells differentiation and ABC transporters expression by a myco-estrogen, zearalenone, in human choriocarcinoma cell line (BeWo). *Toxicology.* 2009;263(2):100-7.
- Qanungo S, Mukherjea M. Ontogenic profile of some antioxidants and lipid peroxidation in human placental and fetal tissues. *Mol Cell Biochem.* 2000 2000/12/01;215(1-2):11-9.
- Rama Sastry B. Placental toxicology. *Principles of Medical Biology.* 1998;12:257-78.
- Ramírez-Bergeron DL, Runge A, Dahl KDC, Fehling HJ, Keller G, Simon MC. Hypoxia affects mesoderm and enhances hemangioblast specification during early development. *Development.* 2004;131(18):4623-34.

- Rana T, Bera AK, Bhattacharya D, Das S, Pan D, Das SK. Subclinical arsenicosis in cattle in arsenic endemic area of West Bengal, India. *Toxicol Ind Health*. 2012;doi:10.1177/0748233712456061
- Recena MCP, Caldas ED, Pires DX, Pontes ERJC. Pesticides exposure in Culturama, Brazil— Knowledge, attitudes, and practices. *Environ Res*. 2006;102(2):230-6.
- Reddy PM, Philip GH. In vivo inhibition of AChE and ATPase activities in the tissues of freshwater fish, *Cyprinus carpio* exposed to technical grade cypermethrin. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1994;52(4):619-26.
- Redinbo M, Bencharit S, Potter P. Human carboxylesterase 1: from drug metabolism to drug discovery. *Biochem Soc Trans*. 2003;31(3):620-4.
- Reichard JF, Motz GT, Puga A. Heme oxygenase-1 induction by NRF2 requires inactivation of the transcriptional repressor BACH1. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(21):7074-86.
- Reid GA, Chilukuri N, Darvesh S. Butyrylcholinesterase and the cholinergic system. *Neuroscience*. 2013;234(0):53-68.
- Ridano ME, Racca AC, Flores-Martín J, Camolotto SA, de Potas GM, Genti-Raimondi S, et al. Chlorpyrifos modifies the expression of genes involved in human placental function. *Reprod Toxicol*. 2012;33(3):331-8.
- Roberts JM, Hubel CA. The Two Stage Model of Preeclampsia: Variations on the Theme. *Placenta*. 2009;30, Supp (0):32-7.
- Roberts VHJ, Smith J, McLea SA, Heizer AB, Richardson JL, Myatt L. Effect of Increasing Maternal Body Mass Index on Oxidative and Nitrate Stress in The Human Placenta. *Placenta*. 2009;30(2):169-75.
- Rovedatti MG, Chiapella G, Vera B, Magnarelli GG. Environmental exposure to pesticides: biomarkers in non-invasively collected matrices in prenatal development and childhood. *Int J Environ Health*. 2012;6(1):63-83.
- Rytting et al. Effects of low oxygen levels on the expression and function of transporter OCTN2 in BeWo cells. *J Pharm Pharmacol*. 2007;59(8):1095-102.
- Rytting et al. Novel organic cation transporter 2-mediated carnitine uptake in placental choriocarcinoma (BeWo) cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;312(1):192-8.
- Samson et al. Specific estradiol biosynthetic pathway in choriocarcinoma (JEG-3) cell line. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2009;116(3):154-9.
- Santagni A. Contaminación con Plaguicidas del Agua Subterránea para Consumo Humano en campo Grande y Cinco Saltos (Río Negro). Tesis de grado Escuela de Salud y Ambiente, Universidad Nacional del Comahue 67 pp. 2006.
- Sata et al. Functional analysis of organic cation transporter 3 expressed in human placenta. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;315(2):888-95.
- Sato et al. Identification of maspin and S100P as novel hypomethylation targets in pancreatic cancer using global gene expression profiling. *Oncogene*. 2003;23(8):1531-8.
- Saulsbury MD, Heyliger SO, Wang K, Johnson DJ. Chlorpyrifos induces oxidative stress in oligodendrocyte progenitor cells. *Toxicology*. 2009;259(1-2):1-9.
- Schallreuter KU, Elwary S, Gibbons NC, Rokos H, Wood JM. Activation/deactivation of acetylcholinesterase by H₂O₂: more evidence for oxidative stress in vitiligo. *Biochem Biophys Res Comm*. 2004;315(2):502-8.
- Schallreuter KU, Elwary S. Hydrogen peroxide regulates the cholinergic signal in a concentration dependent manner. *Life Sci*. 2007;80(24-25):2221-6.
- Schreiber E, Matthias P, Müller MM, Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res*. 1989;17(15):6419.
- Schutz et al. Identification of the fetal liver cytochrome CYP3A7 in human endometrium and placenta. *J Clin Invest*. 1993;92(2):1018-24.

- Serrano et al. Expression in human trophoblast and choriocarcinoma cell lines, BeWo, Jeg-3 and JAR of genes involved in the hepatobiliary-like excretory function of the placenta. *Placenta*. 2007;28(2):107-17.
- Settle et al. Polarized lactate transporter activity and expression in the syncytiotrophoblast of the term human placenta. *Placenta*. 2004;25(6):496-504.
- Shadnia S, Dasgar M, Taghikhani S, Mohammadirad A, Khorasani R, Abdollahi M. Protective Effects of α -Tocopherol and N-Acetyl-Cysteine on Diazinon-Induced Oxidative Stress and Acetylcholinesterase Inhibition in Rats. *Toxicol Mech Methods*. 2007;17(2):109-15.
- Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*. 1997;82(2):291-5.
- Slater TF. Free Radical Mechanisms in Tissue Injury. In: Cañedo LE, Todd LE, Packer L, Jaz J, editors. *Cell Function and Disease*: Springer US; 1988. p. 209-18.
- Smuc et al. Expression of 17β -hydroxysteroid dehydrogenases and other estrogen-metabolizing enzymes in different cancer cell lines. *Chem Biol Int*. 2009;178(1):228-33.
- Sogorb MA, Vilanova E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicol Letters*. 2002;128(1):215-28.
- Solanky et al. Expression of folate transporters in human placenta and implications for homocysteine metabolism. *Placenta*. 2010;31(2):134-43.
- Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase—new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(4):294-302.
- Souza MS, Magnarelli GG, Rovedatti MG, Cruz SS, D'Angelo AMPD. Prenatal exposure to pesticides: analysis of human placental acetylcholinesterase, glutathione S-transferase and catalase as biomarkers of effect. *Biomarkers*. 2005;10(5):376-89.
- Souza MS, Rovedatti MG, Sánchez S, Santa Cruz S, Pechén de D'Angelo AM, Magnarelli G. Biomarcadores para el monitoreo de la exposición intrauterina a plaguicidas en comunidades rurales; Biomarkers for monitoring in utero exposure to pesticides in a rural community. *Acta Toxicol Argent*. 2006;14(supl):69-72.
- Souza MS. Identificación de Biomarcadores de Exposición a Plaguicidas en Placenta Humana. Tesis para obtener el título de doctor en Biología Centro Regional Universitario Bariloche Universidad Nacional del Comahue. 2005.
- Sridhar MG, Setia S, John M, Bhat V, Nandeesh H, Sathiyapriya V. Oxidative stress varies with the mode of delivery in intrauterine growth retardation: Association with Apgar score. *Clin Biochem*. 2007;40(9–10):688-91.
- Steenland K, Dick RB, Howell RJ, Chrislip DW, Hines CJ, Reid TM, et al. Neurologic function among termiticide applicators exposed to chlorpyrifos. *Environ Health Perspect*. 2000;108(4):293.
- Storvik M, Huuskonen P, Kyllönen T, Lehtonen S, El-Nezami H, Auriola S, et al. Aflatoxin B1 – a potential endocrine disruptor – up-regulates CYP19A1 in JEG-3 cells. *Toxicol Letters*. 2011;202(3):161-7.
- St-Pierre et al. Characterization of an organic anion-transporting polypeptide (OATP-B) in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(4):1856-63.
- St-Pierre et al. Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. *Am J Physiol-Regul, Integr Comp Physiol*. 2000;279(4):R1495-R503.
- Szabó A, Nemcsók J, Asztalos B, Rakonczay Z, Kása P, Hieu LH. The effect of pesticides on carp (*Cyprinus carpio* L). Acetylcholinesterase and its biochemical characterization. *Ecotoxicol Environ Saf*. 1992;23(1):39-45.
- Szpyrka M, Jasiul B, Wrona K, Dziedzic F. Telecommunications Networks Risk Assessment with Bayesian Networks. *Computer Information Systems and Industrial Management*: Springer; 2013. p. 277-88.
- Tamai et al. Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1. *FEBS letters*. 1997;419(1):107-11.

- Tang J, Chambers JE. Detoxication of paraoxon by rat liver homogenate and serum carboxylesterases and A-esterases*. *J Biochem Mol Toxicol.* 1999;13(5):261-8.
- Tang J, Rose R, Chambers J. Metabolism of organophosphorus and carbamate pesticides. *Toxicology of Organophosphate and Carbamate compounds.* 2006:127-43.
- Terry Jr AV. Functional consequences of repeated organophosphate exposure: Potential non-cholinergic mechanisms. *Pharmacol Ther.* 2012;134(3):355-65.
- Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem.* 1969;27(3):502-22.
- Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Valle NR-D, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(8):1343-74.
- Tsim K, Soreq H. Acetylcholinesterase: old questions and new developments. *Acetylcholinesterase: Old Questions and New Developments. Front Mol Neurosci.* 2013;5:101. doi: 103389/fnmol.2012.00101.
- Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003;552(2):335-44.
- Tuzmen N, Candan N, Kaya E, Demiryas N. Biochemical effects of chlorpyrifos and deltamethrin on altered antioxidative defense mechanisms and lipid peroxidation in rat liver. *Cell Biochem Funct.* 2008;26(1):119-24.
- Ugele et al. Characterization and identification of steroid sulfate transporters of human placenta. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;284(2):E390-E8.
- Utoguchi et al. Carrier-mediated transport of monocarboxylic acids in BeWo cell monolayers as a model of the human trophoblast. *J Pharm Sci.* 1999;88(12):1288-92.
- Vähäkangas K, Myllynen P. Drug transporters in the human blood-placental barrier. *Br J Pharmacol.* 2009;158(3):665-78.
- Vähäkangas K, Raunio H, Pasamen M, Sivonen P, Park S-S, Gelboin HV, et al. Comparison of the formation of benzo[a]pyrene diol-epoxide-dna adducts in vitro by rat and human microsomes: Evidence for the involvement of p-450IA1 and p-450IA2. *J Biochem Toxicol.* 1989;4(2):79-86.
- van der Aa EM, Peereboom-Stegeman JHC, Noordhoek J, Gribnau FW, Russel FG. Mechanisms of drug transfer across the human placenta. *Pharm World Sci.* 1998;20(4):139-48.
- van der Linden AMA, Tiktak A, Boesten JJTI, Leijnse A. Influence of pH-dependent sorption and transformation on simulated pesticide leaching. *Sci Total Environ.* 2009;407(10):3415-20.
- Vanderlelie J, Gude N, Perkins AV. Antioxidant Gene Expression in Preeclamptic Placentae: A Preliminary Investigation. *Placenta.* 2008;29(6):519-22.
- Vera B. Esterasas y composición lipídica de la placenta humana en la exposición ambiental a plaguicidas organofosforados. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas Universidad Nacional del Comahue. 2010.
- Vera et al. Plasma cholinesterase and carboxylesterase activities and nuclear and mitochondrial lipid composition of human placenta associated with maternal exposure to pesticides. *Reprod Toxicol.* 2012;34(3):402-7.
- Vicente AM, Guillén MI, Habib A, Alcaraz MJ. Beneficial Effects of Heme Oxygenase-1 Up-Regulation in the Development of Experimental Inflammation Induced by Zymosan. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;307(3):1030-7.
- Viswanathan S. Unusual complications of quinalphos poisoning. Case reports in emergency medicine. 2013 Article ID 809174, 3 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/809174>
- Vittozzi L, Fabrizi L, Di Consiglio E, Testai E. Mechanistic aspects of organophosphorothionate toxicity in fish and humans. *Environ Int.* 2001;26(3):125-9.
- Wallace TJ, Ghosh S, McLean Grogan W. Molecular cloning and expression of rat lung carboxylesterase and its potential role in the detoxification of organophosphorus compounds. *Am J Res Cell Mol Biol.* 1999;20(6):1201-8.

- Wang et al. Structure, function, and genomic organization of human Na⁺-dependent high-affinity dicarboxylate transporter. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;278(5):C1019-C30.
- Wang Y, editor. *Vascular biology of the placenta. Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: from Molecule to Function*; 2010. Morgan & Claypool Life Sciences.
- Wang Y, Walsh SW. Antioxidant Activities and mRNA Expression of Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione Peroxidase in Normal and Preeclamptic Placentas. *J Soc Gynecol Inv*. 1996;3(4):179-84.
- Wessler I, Kirkpatrick C. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol*. 2008;154(8):1558-71.
- Wheelock C, Phillips B, Anderson B, Miller J, Miller M, Hammock B. Applications of Carboxylesterase Activity in Environmental Monitoring and Toxicity Identification Evaluations (TIEs). In: Whitacre D, editor. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*: Springer New York; 2008. p. 117-78.
- Wheelock CE, Shan G, Ottea J. Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. *J Pestic Sci*. 2005;30(2):75-83.
- Whyatt RM, Barr DB, Camann DE, Kinney PL, Barr JR, Andrews HF, et al. Contemporary-use pesticides in personal air samples during pregnancy and blood samples at delivery among urban minority mothers and newborns. *Environ Health Perspect*. 2003;111(5):749.
- Whyatt RM, Camann DE, Kinney PL, Reyes A, Ramirez J, Dietrich J, et al. Residential pesticide use during pregnancy among a cohort of urban minority women. *Environ Health Perspect*. 2002;110(5):507.
- Whyatt RM, Rauh V, Barr DB, Camann DE, Andrews HF, Garfinkel R, et al. Prenatal insecticide exposures and birth weight and length among an urban minority cohort. *Environ Health Perspect*. 2004;112(10):1125.
- Wruck CJ, Huppertz B, Bose P, Brandenburg L-O, Pufe T, Kadyrov M. Role of a fetal defence mechanism against oxidative stress in the aetiology of preeclampsia. *Histopathology*. 2009;55(1):102-6.
- Wu H, Zhang R, Liu J, Guo Y, Ma E. Effects of malathion and chlorpyrifos on acetylcholinesterase and antioxidant defense system in *Oxya chinensis* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae). *Chemosphere*. 2011;83(4):599-604.
- Yan B, Matoney L, Yang D. Human Carboxylesterases in Term Placentae: Enzymatic Characterization, Molecular Cloning and Evidence for the Existence of Multiple Forms. *Placenta*. 1999;20(7):599-607.
- Yasuda et al. The mechanism of carrier-mediated transport of folates in BeWo cells: the involvement of heme carrier protein 1 in placental folate transport. *Biosci, Biotechnol Biochem*. 2008;72(0): 329–34
- Yeboah et al. Expression of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in human placenta throughout gestation and at term before and after labor. *Can J Physiol Pharmacol*. 2006;84(12):1251-8.
- Zamudio S, Kovalenko O, Vanderlelie J, Illsley NP, Heller D, Belliappa S, et al. Chronic Hypoxia In Vivo Reduces Placental Oxidative Stress. *Placenta*. 2007;28(8–9):846-53.