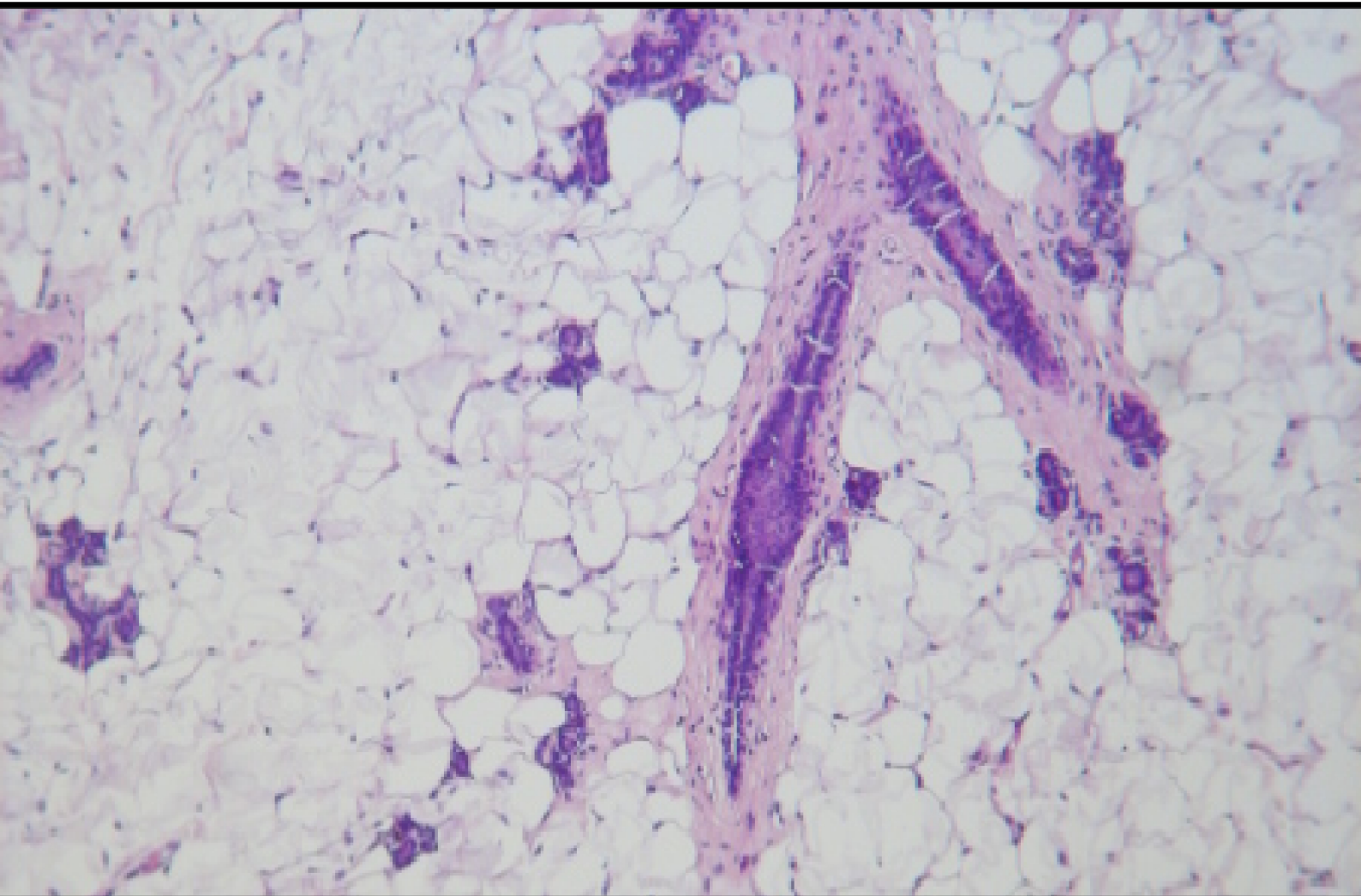


**Universidad de Buenos Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica.
Laboratorio de Radioisótopos**

**ACCIÓN DEL PLAGUICIDA ORGANOFOSFORADO
CLORPIRIFOS SOBRE LA CARCINOGENÉISIS
MAMARIA**



Autora

Lic. Clara Ventura

Directora

Prof. Dra. Claudia M. Cocca

Directora Adjunta

Dra. Mariel Nuñez

Trabajo para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires
2014

Índice

ÍNDICE.....	I
PUBLICACIONES Y PREMIOS	VI
AGRADECIMIENTOS	VIII
INTRODUCCIÓN.....	1
Plaguicidas.....	2
Clorpirifos.....	6
Cáncer.....	10
El proceso carcinogénico	12
Características de las células normales y transformadas	16
Ciclo celular y cáncer	19
Estructura y desarrollo de la glándula mamaria	23
Influencia hormonal sobre el tejido mamario	26
Receptores de hormonas esteroideas	29
Síntesis ovárica de hormonas esteroideas: esteroidogénesis	33
Regulación de la esteroidogénesis	35
Cáncer de mama	37
Epidemiología.....	37
Carcinogénesis mamaria	38
Factores de riesgo para cáncer de mama.....	42
Disruptores endócrinos	42
Estrés oxidativo	45
Vías de señalización moduladas por ERO	49
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	51
MATERIALES Y MÉTODOS	54
ESTUDIOS EN LÍNEAS CELULARES	55
Características de las líneas celulares	55
MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™).....	55
MCF-7 (ATCC® HTB-22™).....	55

Cultivo celular	56
Drogas utilizadas en los experimentos	56
Tratamiento con CPF	56
Tratamiento con E ₂	57
Tratamiento con ICI 182,780	57
Tratamiento con H ₂ O ₂	57
Tratamiento con CAT	57
Tratamiento con PD95059	58
Tratamiento con SB203580	58
Ensayos de proliferación celular.....	58
Viabilidad celular.....	58
Capacidad clonogénica	59
Incorporación de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU).....	60
Análisis del ciclo celular.....	61
Análisis de la expresión proteica	61
Cuantificación de los niveles de expresión proteica mediante western blot....	61
Determinación de la localización intracelular de proteínas mediante inmunofluorescencia	64
Determinación de apoptosis en las líneas celulares.....	65
Ensayo de Anexina-V	65
Determinación de núcleos apoptóticos.	66
Determinación de especies oxidantes	67
Niveles intracelulares de ERO	67
Determinación del anión O ₂ ⁻	68
Niveles intracelulares de ERN	69
Análisis del sistema antioxidante celular.....	69
Análisis de la actividad de catalasa.....	69
Análisis de la actividad SOD	70
Contenido de GSH	71
Análisis del daño oxidativo	72
Peroxidación lipídica.	72
Nitración de proteínas	72
ESTUDIOS EN ANIMALES.....	73
<i>Modelo para el estudio del desarrollo de la glándula mamaria.....</i>	73

Protocolo de intoxicación de los animales	73
Parámetros fisiológicos	74
Análisis de toxicidad.....	74
Determinación de la actividad AChE	74
Determinación de la actividad BChE.....	75
Determinación del peso de los animales.....	75
Evaluación de la funcionalidad hepática.....	75
Estudios histológicos	76
Análisis de expresión proteica.....	77
Western blot a partir de tejido mamario	77
Inmunohistoquímica	77
Determinación de los niveles de hormonas	78
Determinación de hormonas esteroideas	78
Determinación de gonadotrofinas	79
Análisis del sistema antioxidante en el tejido mamario	79
Evaluación de la actividad CAT en el tejido mamario	79
Determinación del contenido de GSH en el tejido mamario	79
Evaluación de la peroxidación lipídica en el tejido mamario.....	80
<i>Modelo para el estudio de la carcinogénesis mamaria</i>	<i>80</i>
Inducción tumoral.....	81
Protocolo de intoxicación de los animales	82
Crecimiento y tiempo de duplicación tumoral	83
Estudios histológicos e inmunohistoquímicos en los tumores	83
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	84
RESULTADOS. PRIMERA PARTE	85
EFFECTOS DEL CPF SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN LÍNEAS DERIVADAS DE	
ADENOCARCINOMAS MAMARIOS.	86
Efectos del CPF sobre la proliferación celular	86
Efecto del CPF sobre la viabilidad celular.....	87
Efecto del CPF sobre la formación de colonias	88
Efecto sobre la incorporación de BrdU.....	90
Efectos del CPF sobre la vía estrogénica	91
Efecto sobre la fosforilación del RE	92

Efecto sobre la proliferación utilizando un inhibidor específico del RE	93
Efectos sobre la vía Wnt/ -catenina	95
Efecto del CPF sobre el ciclo celular.....	98
Efectos sobre la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular.....	99
Efecto sobre la distribución en las diferentes fases del ciclo.....	101
Efecto sobre el citoesqueleto	102
Efecto del CPF sobre la apoptosis y la necrosis celular	103
DISCUSIÓN. PRIMERA PARTE.....	108
RESULTADOS. SEGUNDA PARTE	121
EFECTO DEL CPF SOBRE EL DESARROLLO DE LA GLÁNDULA MAMARIA DE RATA	122
Evaluación de los efectos tóxicos del CPF	122
Efectos del CPF sobre la actividad colinesterasa.....	123
Efectos del CPF sobre el peso corporal y la fisiología hepática	124
Estudios relacionados con el desarrollo de la glándula mamaria	126
Estudio histopatológico.....	126
Expresión de la proteína PCNA en la glándula mamaria	132
Efectos del CPF sobre la expresión de receptores esteroideos en la glándula mamaria	133
Efectos sobre el sistema endócrino.....	136
Efectos del CPF sobre los niveles de hormonas esteroideas.....	136
Efectos del CPF sobre la esteroidogénesis	138
Efecto del CPF sobre los niveles de gonadotrofinas.....	139
EFECTOS DEL CPF SOBRE LA CARCINOGENÉISIS MAMARIA	140
Efectos del CPF sobre los parámetros de evolución tumoral	140
Efecto del CPF sobre la histología tumoral mamaria	143
Efectos sobre la expresión de los receptores de hormonas esteroideas	146
DISCUSIÓN. SEGUNDA PARTE	149
RESULTADOS. TERCERA PARTE.....	166
EFECTO DEL CPF SOBRE EL BALANCE REDOX CELULAR Y LA MODULACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR MEDIADA POR MAPKS. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>	167
Efectos del CPF sobre los niveles de especies oxidantes	168
Efectos del CPF sobre el contenido de ERO	168

Contribución del peróxido de hidrogeno al aumento de ERO.....	169
Efecto del CPF sobre los niveles del anión $O_2^{\cdot-}$	170
Efecto del CPF sobre los niveles de ERN.....	172
Efectos del CPF sobre el sistema antioxidante celular	173
Efecto sobre el contenido de la enzima CAT.....	174
Efecto sobre la actividad CAT	175
Efecto sobre la expresión de SOD	176
Efecto sobre la actividad SOD.....	177
Evaluación de la capacidad antioxidante basal de las líneas celulares	178
Efecto sobre el contenido de GSH.....	179
Efectos sobre el daño oxidativo a macromoléculas.....	180
Efectos del CPF sobre el daño a lípidos	180
Daño oxidativo a proteínas	181
Implicancias del desbalance redox sobre la capacidad clonogénica celular	182
Vías de señalización implicadas en la muerte celular inducida por CPF	184
Efecto sobre la fosforilación de la proteína p38	185
Efecto sobre la fosforilación de la proteína ERK1/2	186
Efecto de la fosforilación de la proteína ERK1/2 y p38 sobre la proliferación celular.....	187
Relación entre el estrés oxidativo y la fosforilación de ERK1/2	190
EFFECTO DEL CPF SOBRE EL BALANCE REDOX EN LA GLÁNDULA MAMARIA. ESTUDIOS <i>EX VIVO</i>	193
Efectos del CPF sobre el sistema antioxidante enzimático	194
Efecto del CPF sobre el sistema antioxidante no enzimático.....	195
Efecto del CPF sobre el daño celular.....	196
DISCUSIÓN. TERCERA PARTE.....	197
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	208
RESUMEN	212
BIBLIOGRAFÍA	216
ABREVIATURAS	246

Publicaciones y premios

Los resultados presentados en esta tesis doctoral, forman parte de las siguientes publicaciones:

Ventura C, Venturino A, Miret N, Randi A, Rivera E, Núñez M, Cocca C. *Chlorpyrifos inhibits cell proliferation through ERK1/2 phosphorylation in breast cancer cell lines*. Chemosphere. ISSN: 0045-6535. En prensa. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.07.088.

Ventura C, Núñez M, Miret N, Martinel Lamas D, Randi A, Venturino A, Rivera E, Cocca C. *Differential mechanisms of action are involved in chlorpyrifos effects in estrogen-dependent or -independent breast cancer cells exposed at low or high doses of the pesticide*. Toxicology Letters 213 (2012), pp. 184-193. ISSN 0378 4274.

Parte de los resultados presentados en esta tesis, recibieron los siguientes premios:

Premio otorgado por la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), sección toxicología, al trabajo titulado “*El Clorpirifos afecta el desarrollo de la glándula mamaria de rata e induce desbalance redox en este tejido*”. **Ventura C**, Martinel Lamas D, Bourguignon N, Lux-Lantos V, Rivera E, Cocca C, Núñez M.

Premio “Juan C. García Fernández”, Área Toxicología, año 2010. Otorgado por la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica al trabajo “*Acción del plaguicida organofosforado clorpirifos sobre el crecimiento celular en líneas mamarias tumorales dependientes e independientes de estrógenos*”. **Ventura C**, Núñez M, Martinel Lamas D, Mohamad N, Randi A, Venturino A, Rivera E, Cocca C.

Agradecimientos

Quisiera expresar mi enorme agradecimiento:

A Claudia, mi directora, por su presencia constante e inigualable en este recorrido que iniciamos en el año 2009 sin conocernos, y que dio origen a este trabajo. Por su tiempo, su paciencia y su generosidad. Por brindarme su confianza y por transmitirme su amor hacia la ciencia y la docencia. Por su responsabilidad y compromiso. Por estar siempre, en todos los detalles. No se cómo agradecerle por tanto Clau!

A Mariel, mi Directora Adjunta, por su inmensa ayuda en los experimentos y por enseñarme a trabajar, especialmente por su paciencia en el trabajo con los animales. Por su enorme disponibilidad, por sus consejos y por acompañarme en todos estos años. Muchas gracias Mari!!

A Diego y a Nora, por tantas horas compartidas en la mesada. Por el trabajo en equipo y la ayuda desinteresada. Por los mates, las risas y los cantos, algunos más afinados que otros.... Muchas gracias a los dos, por hacer del trabajo un espacio alegre y solidario. ¡Son excelentes personas, compañeros y amigos!

A toda la gente de radio: Ele, Gabi, Gra, Vani, Noe, Ali G, Eli, Juli, Maria Rosa, Marce, Cinthia, Jime, Nati, Fiore, Mariano, Gra, Ali K, Pablo, Diego G, y Cristina, por incorporarme a su mundo con tanto cariño, por los momentos compartidos, los mates, las clases, los congresos. Un enorme agradecimiento por su apoyo y colaboración. Estaré eternamente agradecida por su buena predisposición y su cariño.

A Rosita por su interés y compromiso y a Ale por su excelente trabajo y su predisposición.

A Andrés Venturino, de la Universidad del Comahue, por su inmensa enseñanza en relación al sistema redox. Por su colaboración en este trabajo de tesis y por la lectura y corrección de todos los trabajos.

A Andy y todo su grupo de trabajo, especialmente a Noe, Caro y Flopi, por su ayuda y colaboración incondicional. Por su generosidad y compromiso, por los seminarios compartidos, el café, el mate y las facturas. ¡Fue un placer haber compartido esta etapa con ustedes!

A Mónica Galleano, por su ayuda y perseverancia en los experimentos de EPR. Mi agradecimiento también por la lectura y las sugerencias en la escritura.

Al Dr. Gabriel Kao, por su colaboración en este trabajo, por su predisposición y sus explicaciones.

A Nadia y a Victoria, del Laboratorio de Neuroendocrinología del IBYME, por la determinación de las hormonas.

A la Facultad de Ciencia Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, por brindarme la formación profesional. Especialmente a todos los docente que me enseñaron a amar la ciencia y me transmitieron su pasión y dedicación por esta profesión.

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aries, a la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por el apoyo económico a través de las becas recibidas y los subsidios que contribuyeron a la realización de este trabajo.

A mis viejos, por enseñarme siempre el camino de la responsabilidad, la perseverancia y el esfuerzo, sin lo cual este trabajo no hubiese sido posible. Por el esfuerzo que para ellos significó que yo pudiera estudiar en La Plata y por su apoyo incondicional en este y todos mis proyectos.

A mi familia: a mis abuelos, a mis tías, a mis primas y muy especialmente a mis hermanos, Mati, Viole y Tomi, por estar, por apoyarme durante todos estos años, por preocuparse siempre y por todo el resto.

A Cintia, por su hermosa amistad, por tantas horas compartidas y por lo que significa saber que puedo contar con vos siempre.

A mis compañeros de la facu, los viejitos: Mancho, Mari, Boris, Mauri, Iva, Juan, Sabri, Ro y George. Quiero agradecerles por tantos años compartidos, por su enorme acompañamiento en este camino y por compartir los buenos y malos momentos de nuestras vidas. Me llenan de orgullo como amigos y como colegas.

A José, mi compañero, por todo su amor, su alegría y su compromiso. Por enseñarme a luchar por lo que creo, por su apoyo incondicional y por toda su ayuda en este trabajo.

Introducción

Plaguicidas

La agricultura representa una de las principales actividades económicas de los países en vías de desarrollo como la Argentina. En estas regiones, el control fitosanitario y la rentabilidad productiva se sostienen en base al uso intensivo de plaguicidas, lo cual constituye un factor de riesgo tanto para los trabajadores como para las poblaciones cercanas y el medio ambiente.

El uso responsable de los agroquímicos constituye un tema clave para lograr un equilibrio entre la actividad productiva, la salud humana y la protección del medio ambiente. En este sentido, los gobiernos de muchos países están incorporando en su legislación normas cada vez más exigentes respecto del uso y la generación de compuestos potencialmente capaces de generar efectos adversos en la salud y el ambiente.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), define a los plaguicidas como una sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de animales, las especies de plantas o animales indeseables que causan perjuicio o que interfieren de alguna otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. El término también incluye a las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y a las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y el transporte (World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004).

Los plaguicidas pueden clasificarse en función de algunas de sus características principales, como son la toxicidad, la vida media, la estructura química y el uso. En 1978, la OMS estableció una clasificación basada en su peligrosidad o grado de toxicidad aguda, definida como la capacidad del plaguicida de producir un daño agudo a

la salud a través de una o múltiples exposiciones, en un período de tiempo relativamente corto. La toxicidad se mide a través de la dosis letal media (DL_{50}). Este parámetro se define como la dosis de una sustancia que resulta letal para el 50 % de los animales utilizados en un ensayo. En general suele expresarse como la masa de la sustancia en mg por Kg de peso del animal. De acuerdo a esto, los plaguicidas pueden clasificarse en cinco grupos (Tabla 1) (World Health Organization, 2009a).

Clase	Descripción	DL_{50} (mg/Kg) en rata	
		Oral	Dérmica
Ia	Extremadamente tóxico	< 5	< 50
Ib	Altamente tóxico	5 – 50	50 – 200
II	Moderadamente tóxico	50 – 2000	200 – 2000
III	Levemente tóxico	> 2000	> 2000
IV	No presentaría toxicidad aguda	> 5000	> 5000

Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas de acuerdo a su peligrosidad. Adaptada de World Health Organization, 2009a.

Otros criterios de clasificación para los plaguicidas se basan en la especie a la que permiten combatir o en la familia química a la que pertenecen. De esta manera, los plaguicidas pueden clasificarse como insecticidas, herbicidas, fungicidas o rodenticidas, según se utilicen para combatir insectos, vegetales, hongos o roedores respectivamente. La clasificación según la familia química cobra importancia desde el punto de vista toxicológico, ya que los plaguicidas pertenecientes a un mismo grupo producen efectos similares, los cuales suelen revertirse utilizando tratamientos análogos. La clasificación basada en este criterio es sumamente compleja dado que permanentemente se incorporan al mercado nuevos plaguicidas, pertenecientes a diversos grupos químicos. Sin embargo, se han definido algunas familias químicas que engloban a gran parte de los plaguicidas utilizados en la actualidad. Entre ellas, se encuentran los plaguicidas organoclorados, los carbamatos y tiocarbamatos, los piretroides, los organofosforados,

los derivados bupiridilos, compuestos inorgánicos o compuestos de origen vegetal (Gil et al., 2012; World Health Organization, 2009a).

Si bien la Argentina es un país con una importante actividad agrícola y un extensivo uso de plaguicidas, existen pocos estudios que brinden información acerca de los productos utilizados y las cantidades aplicadas. Uno de los pocos estudios publicados sobre esta temática, fue elaborado en el año 2013 por Pórfido. En ese trabajo, el autor realizó un análisis del mercado de productos fitosanitarios en la Argentina y observó una tendencia creciente en el uso de plaguicidas en los últimos 7 años, pasando de 151,3 millones de kilogramos (Kg) o litros (L) de productos comercializados en el año 2002, a 225 millones en 2008 (Pórfido, 2013). Del total de plaguicidas utilizados en nuestro país, el 11,1 % corresponde a la aplicación de insecticidas (25,03 millones de Kg o L). De acuerdo a un relevamiento realizado en el año 2007, el 47 % de la superficie fumigada con insecticidas se debe a la aplicación de piretroides, seguido por los plaguicidas organofosforados (OPs) y los esteroides cíclicos (Bernardos and Zaccagnini, 2011).

Los compuestos OPs constituyen un grupo de sustancias altamente tóxicas, utilizadas en la actividad agrícola para el control de plagas e insectos. Estas sustancias fueron sintetizadas por primera vez en la década de 1820, sin embargo, la actividad insecticida de estos compuestos se evidenció muchos años más tarde cuando, en el año 1932, se describieron por vez primera los efectos nocivos de los OPs sobre los seres vivos (Carod Benedico, 2002; Delfino et al., 2009). Este hecho, próximo al comienzo de la Segunda Guerra Mundial, despertó el interés para el desarrollo de potenciales gases de guerra, lo cual trajo aparejado un incremento en los recursos destinados al diseño de nuevas moléculas. De este modo, en el año 1946 el químico alemán Gerhard Schrader desarrolló un compuesto denominado paratión, uno de los plaguicidas más utilizados en las décadas siguientes. Posteriormente, surgieron el malatión (1952), el diazinón (1953) y el clorpirifos (1965). Desde entonces, cientos de compuestos OPs se han desarrollado y comercializado en todo el mundo (Carod Benedico, 2002).

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) realiza periódicamente un informe sobre la industria y el uso de plaguicidas a nivel mundial. En su última publicación, actualizada hasta el año 2007, se indica que el uso de plaguicidas

OPs en el año 2007, alcanzó las 14.968,4 toneladas, lo cual constituye el 36 % de los insecticidas utilizados a nivel mundial (US Environmental Protection Agency, 2011a).

Los plaguicidas OPs, presentan una serie de características que los hicieron de elección frente a otros compuestos utilizados tradicionalmente, como son los plaguicidas organoclorados. Entre estas características se encuentra la menor persistencia en el ambiente y la baja acumulación en los tejidos biológicos. Sin embargo, una desventaja de estos compuestos es su toxicidad, relativamente alta para los vertebrados y seres humanos. El principal mecanismo de toxicidad de los compuestos OPs es la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), lo que conduce a una acumulación de acetilcolina en las uniones colinérgicas neuroefectoras (efectos muscarínicos), en las uniones mioneurales del esqueleto y los ganglios autónomos (efectos nicotínicos), así como también, a nivel central en los organismos expuestos. Por este motivo, las exposiciones agudas y crónicas a estos compuestos pueden producir una variedad de efectos sobre el sistema nervioso, incluyendo dolores de cabeza, visión borrosa, lagrimeo, excesiva salivación, secreción nasal, mareo, confusión, debilidad o temblores musculares, náuseas, diarrea y cambios bruscos en el ritmo cardíaco (Rush et al., 2010; Tan et al., 2009). Sin embargo, no todos los efectos producidos por los plaguicidas OPs están mediados por el aumento de ese neurotransmisor, sino que también se han reportado efectos independientes de la inhibición de la AChE (Costa, 2006).

Si bien el uso de este grupo de sustancias presentan ventajas frente a otros plaguicidas, su aplicación representa un alto impacto ambiental contaminando aguas superficiales y subterráneas, afectando poblaciones de especies acuáticas y poniendo en riesgo la salud humana (Loewy et al., 1999). En este sentido, estudios recientes han demostrado que los plaguicidas OPs son eficientemente adsorbidos por la materia orgánica presente en el suelo, lo cual origina un incremento de la persistencia de estos compuestos en el ambiente. Entre los plaguicidas OPs más utilizados se encuentra el clorpirifos (CPF). A nivel mundial, en el año 2007, se estima que se aplicaron entre 3.628,7 y 4.989,5 toneladas de este plaguicida (US Environmental Protection Agency, 2011a).

Clorpirifos

El CPF es un plaguicida organofosforado ampliamente utilizado en nuestro país. Su principal uso lo constituye el control de plagas en la producción de frutas, hortalizas, cereales y plantas ornamentales. Adicionalmente, este pesticida es utilizado para el control de termitas y hormigas en productos maderables y para el control de pulgas, garrapatas y piojos en animales domésticos y en la producción ganadera. Finalmente, el CPF se utiliza para combatir a moscas y mosquitos en espacios públicos y para el control de plagas en césped de golf.

El uso residencial del CPF fue prohibido en Estados Unidos en el año 2001, quedando permitida la aplicación en sectores rurales. En la Argentina, el uso de CPF en productos domisanitarios fue prohibido mediante una disposición de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) en el año 2008 (ANMAT, 2008). Adicionalmente, la importación, producción, comercialización y el uso en formulaciones de productos domisanitarios, a excepción de cebos con cierre a prueba de niños con no más de 0,5 % de principio activo, fueron prohibidos por el Ministerio de Salud mediante su resolución 456 en el año 2009 (Ministerio de Salud, 2009).

El CPF es un compuesto sólido blanco cristalino, clasificado dentro del grupo de plaguicidas moderadamente tóxicos (clase II). Si bien presenta una baja solubilidad en agua, este compuesto es relativamente estable en soluciones acuosas de pH neutro o ácido y su estabilidad decrece a medida que se incrementa el pH de la solución (World Health Organization, 2009b). Estas características, junto con su baja volatilidad y su elevada constante de partición con solventes orgánicos, derivan en una concentración del pesticida en sedimentos y partículas orgánicas presentes en los ambientes naturales, lo cual incrementa la persistencia del CPF en el medio ambiente y sugiere una elevada bioacumulación del tóxico (Dzul-Caamal et al., 2014; US Environmental Protection Agency, 2011b). En la figura 1 se detallan las principales propiedades fisicoquímicas de este compuesto.

Peso molecular: 350,6 g/mol

Solubilidad en agua: 0,39 mg/L a 19,5°C

Coefficiente de partición
octanol/agua: $\log K_{oa} = 5,0$ a 24,5°C

Punto de fusión: 42 - 44°C

Fotoestabilidad en agua ($T_{1/2}$): 39,9 días

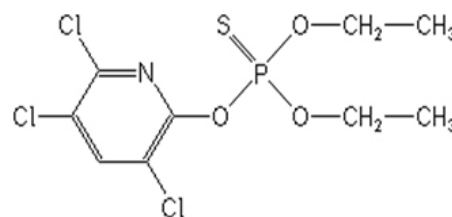


Figura 1. Características fisicoquímicas del plaguicida organofosforado CPF. (European Food Safety Authority, 2005; US Environmental Protection Agency, 2011b; Watts, 2012; World Health Organization, 2009b)

El CPF se absorbe fundamentalmente por vía oral, cutánea y respiratoria. La contaminación de productos alimenticios con trazas de plaguicida constituye la principal fuente de exposición no ocupacional por vía oral. En un estudio realizado en la provincia de Talca, Chile, se detectó la presencia de CPF en frutas consumidas por niños, tanto en las escuelas como en sus hogares. Estos investigadores recolectaron diversos tipos de frutas y evaluaron la presencia de pesticidas, entre ellos, el CPF. Sus resultados señalaron la presencia de CPF en manzana, naranja, mandarina y tomate, en concentraciones desde 0,01 a 0,16 mg/Kg de fruta (Muñoz-Quezada et al., 2014). Asimismo, en un estudio realizado en Minnesota, Estados Unidos, se analizó la presencia de diferentes plaguicidas en alimentos, encontrando residuos de CPF en el 57 % de las muestras analizadas, con una concentración media de 0,532 $\mu\text{g/Kg}$ (Andrew Clayton et al., 2003).

La exposición no ocupacional por vía respiratoria se vio fuertemente reducida en los Estados Unidos a partir del año 2001, luego de la prohibición del uso residencial del CPF. Este hecho condujo a una disminución de la concentración del tóxico en el aire en los ambientes urbanos. Sin embargo, la exposición por inhalación en el entorno rural, contribuye sustancialmente a la exposición de los trabajadores y de los habitantes

cercanos. En un estudio realizado en Tailandia, se encontraron concentraciones de CPF en aire de zonas productivas que alcanzan los $0,55 \text{ mg/m}^3$ (Jaipieam et al., 2009).

La absorción por vía dérmica ha sido corroborada tanto en humanos como en animales de experimentación (Latuszynska et al., 2001), pero la misma es muy limitada.

Luego de la administración oral, tanto el CPF como su metabolito activo, el clorpirifos oxón (CPFO), son detectados en diferentes órganos y tejidos de los individuos expuestos. Entre ellos, podemos mencionar la sangre, el hígado y diferentes tejidos ricos en lípidos, incluyendo el cerebro. Debido a la naturaleza hidrofóbica de este tóxico, el mismo puede acumularse en la leche materna. En un estudio realizado en la India en el año 2003 se detectó la presencia de plaguicidas OPs en la leche de madres durante el período de lactancia. Las mayores concentraciones de plaguicida correspondieron a endosulfan, seguido por el CPF. Este último se encontró en una concentración media de $0,230 \text{ mg/L}$ (Sanghi et al., 2003).

La detoxificación del CPF tiene lugar en el hígado. Este órgano presenta un papel fundamental en los procesos de detoxificación de compuestos nocivos procedentes del medio ambiente. En la figura 2 se esquematizan las principales reacciones metabólicas involucradas en la detoxificación del CPF. La descomposición enzimática de estos productos tiene lugar en dos etapas, denominadas fase I y fase II. En la fase I participan un conjunto de enzimas pertenecientes a la familia del citocromo P450 (CYPs). La reacción de desulfuración del CPF se encuentra mediada por la isoforma CYP2B6 y conduce a la formación de CPFO, el metabolito activo con capacidad de inhibir a la enzima AChE. Otros miembros de la familia del citocromo P450 catalizan la desarilación de CPF generando 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCPY), el cual es inactivo biológicamente.

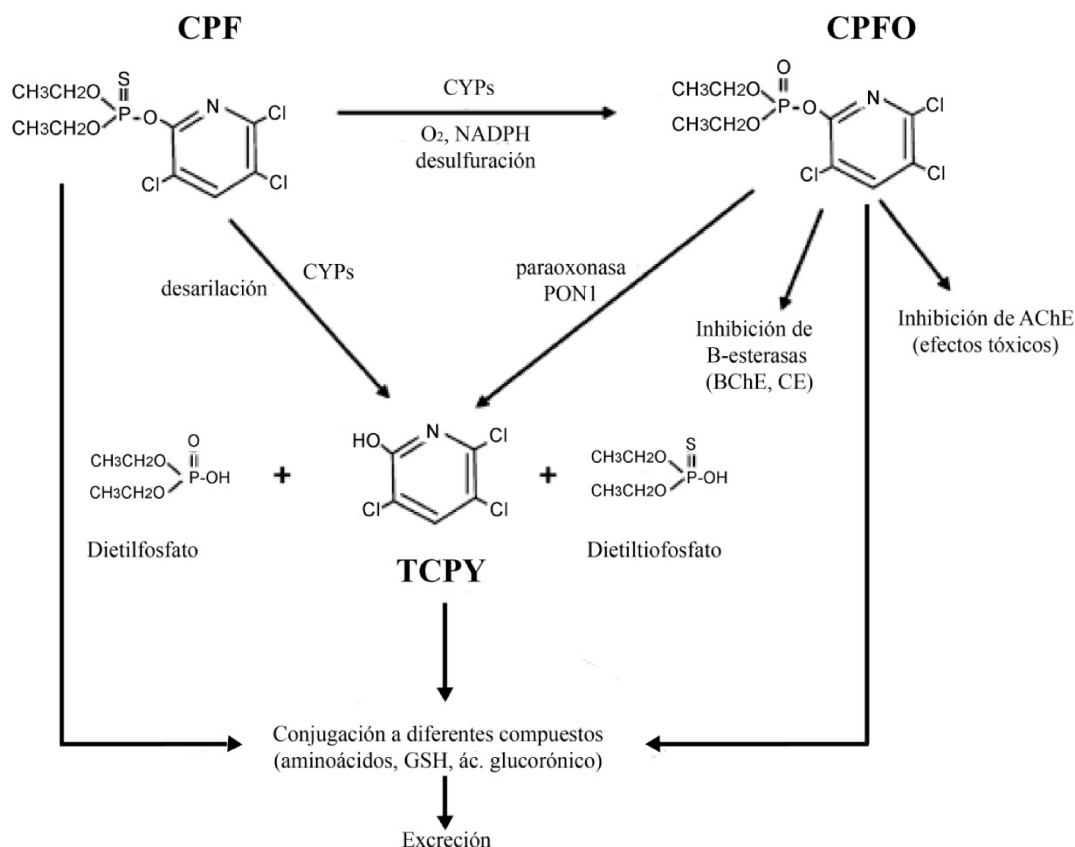


Figura 2. Metabolismo del CPF. Adaptada de Eaton et al., 2008.

Adicionalmente, las esterasas de tipo A juegan un papel importante en la desintoxicación hepática y plasmática de este compuesto. Estas enzimas no son inhibidas por el CPF. Un ejemplo lo constituye la enzima paraoxonasa 1 (PON1), la cual cataliza la hidrólisis del CPFO, liberando el metabolito inactivo TCPY.

En la fase I de detoxificación, los productos tóxicos son metabolizados generando otros metabolitos intermedios hidrofílicos, que son posteriormente procesados por las enzimas de fase II. En esta fase los compuestos tóxicos sufren la conjugación con diferentes moléculas como glutatión reducido (GSH) o aminoácidos, sulfatación, glucuronidación, metilación y acetilación. El CPF, el CPFO y el TCPY son procesados por enzimas de esta fase, específicamente mediante su conjugación con GSH, generando derivados electrofílicos para su posterior eliminación. En este proceso, resulta clave la actividad de la enzima glutatión-S-transferasa (GST), la cual cataliza la

conjugación del CPF con diferentes moléculas facilitando su posterior eliminación (Costa, 2006; Eaton et al., 2008; Fujioka and Casida, 2007). Se han detectado compuestos conjugados de CPF con GSH en diferentes modelos experimentales, lo cual sugiere que esta vía contribuye significativamente a la eliminación del CPF.

Durante las últimas dos décadas, la evaluación de la exposición a CPF en la población se realizó en base a la detección en orina del biomarcador TCPY. Sin embargo, hoy en día se reconoce que este procedimiento no es el adecuado para estimar las exposiciones a CPF en entornos no laborales, debido a que usualmente se encuentran altos niveles de TCPY en frutas y verduras, provenientes de la descomposición del CPF aplicado. De esta manera el TCPY es absorbido y eliminado en la orina de los individuos, sobreestimando los niveles de exposición al CPF (Eaton et al., 2008; Egeghy et al., 2011).

El principal mecanismo de acción del CPF lo constituye su unión irreversible a enzimas colinesterasas, lo cual conlleva a la pérdida de actividad de las mismas. Este efecto es importante en el sistema nervioso, debido al rol de la enzima AChE en el metabolismo del neurotransmisor acetilcolina. Adicionalmente, el CPF interfiere en la síntesis de macromoléculas (Qiao et al., 2001), interacciona con receptores celulares (Howard and Pope, 2002), modula diferentes vías de transducción de señales (Song et al., 1997) y modifica el balance redox celular (Gupta et al., 2010).

En los últimos años, ha cobrado importancia el estudio de los contaminantes ambientales en relación al desarrollo de cáncer. Recientes estudios epidemiológicos han reportado una relación entre la exposición de trabajadores a CPF y el desarrollo de glioma, cáncer de colon y de pulmón (Alavanja et al., 2004; Lee et al., 2007, 2005, 2004).

Cáncer

El cáncer puede definirse como el crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales, que presentan la capacidad de invadir otros tejidos. Puede originarse a partir de cualquier tipo de célula en cualquier tejido corporal.

El cáncer no es considerado una enfermedad única sino un conjunto de enfermedades que aquejan la salud humana, y que se clasifican según el tejido y la célula que le dio origen:

- Derivados del tejido mesenquimal, se denominan habitualmente *sarcomas*.
- Derivados de células epiteliales, provenientes de cualquiera de las tres capas germinales, se denominan *carcinomas*. Los que presentan un patrón microscópico de crecimiento glandular, se denominan *adenocarcinomas*; los que presentan células escamosas epidermoides originados en cualquier epitelio, se denominan *carcinomas escamosos*; los que se originan en la capa más profunda de la epidermis se denominan *carcinomas de células basales*, y los que se originan en los melanocitos se denominan *melanomas*.
- Derivados de células hematopoyéticas se denominan *leucemias* y aquellos de tejido linfoide se llaman *linfomas*.
- Derivados de más de un tipo de células neoplásicas se denominan *tumores mixtos*.

El cáncer constituye un problema sanitario de primer orden siendo una de las principales causas de muerte en todo el mundo. A pesar de los grandes progresos en el diagnóstico y el tratamiento de estas enfermedades, su incidencia se incrementa con el correr de los años. Las estadísticas realizadas por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (*IARC, del Inglés: International Agency of Research on Cancer*) estimaron 14,09 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes como consecuencia del cáncer en el año 2012 (International Agency of Research on Cancer, 2014). Estos datos corresponden a la población mundial, considerando todos los tipos de cáncer, excepto el cáncer de piel no-melanoma. Aunque siempre se lo consideró como un problema de los países desarrollados, el 56 % de los casos de cáncer detectados y el 63 % de las muertes ocurridas por esta patología se registraron en los países menos desarrollados del mundo (Ferlay et al., 2010). El aumento en la incidencia que se observa en los países en vías de desarrollo económico se ha atribuido, en parte, a la mayor edad de la población, así como a la adopción de un estilo de vida más occidental (Jemal et al., 2011).

En la Argentina, en el año 2012, la tasa de incidencia de cáncer excluyendo el cáncer de piel no-melanoma ajustada por edad fue de 282,5 por cada 100.000 personas, lo que arrojó un valor 115.162 nuevos casos diagnosticados y 66.433 muertes por cáncer (International Agency of Research on Cancer, 2014).

La mortalidad por cáncer en los hombres argentinos se debe principalmente a los cánceres de pulmón (21 %), próstata (13 %) y colorrectal (12 %); mientras que en las mujeres, el cáncer de mama presenta la mayor tasa de mortalidad por cáncer (20 %), seguido por el cáncer colorrectal (12 %) y el cáncer de pulmón (9 %) (World Health Organization and Pan American Health Organization, 2013).

El proceso carcinogénico

El proceso por el cual se desarrolla el cáncer se conoce como carcinogénesis y ocurre en múltiples etapas. En la década del 40, Berenblum y Shubik realizaron numerosos estudios en un modelo de cáncer de piel en ratón, e identificaron tres etapas principales en este proceso: *iniciación*, *promoción* y *progresión* (Yuspa, 1994). Estas investigaciones fundaron las bases de lo que hoy conocemos como modelo clásico del desarrollo tumoral (Fig. 3).

De acuerdo a este modelo, el cáncer comienza con una etapa de *iniciación*, durante la cual ocurren daños a nivel del material genético celular. Estas mutaciones podrán expresarse o no dependiendo del entorno celular, de la ocurrencia de nuevos cambios en el genoma y de la eficiencia de los sistemas de reparación. Las mutaciones pueden ser el resultado de la exposición a carcinógenos ambientales como agentes físicos (radiación ionizante), agentes químicos (hidrocarburos policíclicos o nitrosoureas) y/o biológicos (virus). De acuerdo a este modelo, la iniciación tumoral se produce cuando en una célula se expresen múltiples mutaciones que le confieran una ventaja selectiva para el crecimiento frente a las células vecinas. Los últimos avances en la investigación del cáncer, demuestran que tanto las células epiteliales como los componentes estromales, pueden sufrir alteraciones que promuevan la proliferación y la mutación de células epiteliales.

Durante la segunda etapa, denominada *promoción*, las células iniciadas reciben un estímulo para el crecimiento y comienzan a proliferar. Durante esta etapa actúan diferentes factores que promueven la expansión clonal de las células iniciadas. Estos factores, denominados agentes promotores, pueden ser hormonas, factores de crecimiento, factores dietarios o ambientales. Luego de varios ciclos de duplicación, las células dañadas y su descendencia adquieren nuevas alteraciones genómicas y cambios epigenéticos que proporcionan a estas células una ventaja selectiva sobre el resto, desregulando aún más la proliferación y dando como resultado el surgimiento de la hiperplasia.

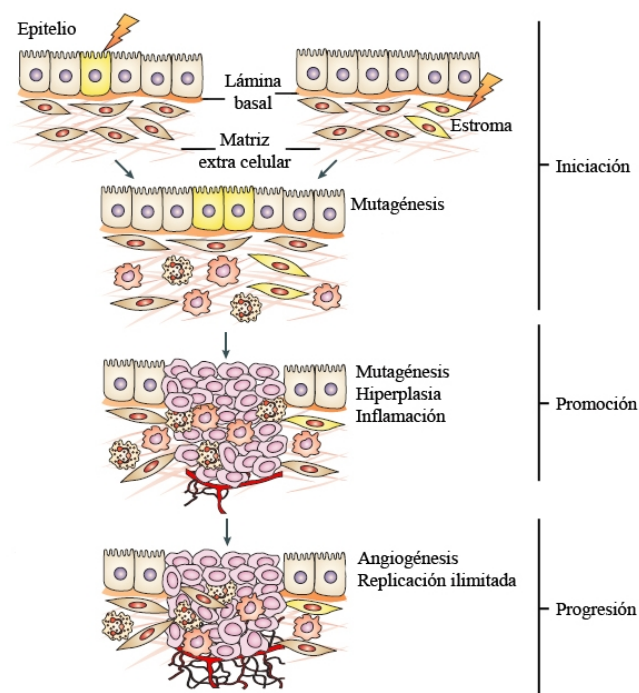


Figura 3. Eventos involucrados en el proceso de la carcinogénesis. Adaptada de Albini and Sporn, 2007.

En la tercera etapa, denominada *progresión*, la célula iniciada adquiere nuevas mutaciones que dan como resultado una célula neoplásica. Estas células se caracterizan por poseer un potencial replicativo ilimitado y por una falta de respuesta a señales promotoras o supresoras del crecimiento lo que resultará en la formación de un tumor primario, llamado carcinoma *in situ*. Este pequeño carcinoma podrá progresar

posteriormente a un tumor invasivo, el cual, en función de la capacidad de invasión adquirida por sus células podrá diseminarse dando origen al desarrollo de metástasis.

La invasividad es por lo tanto, una característica esencial del tumor maligno e incluye varios procesos como la pérdida de la adhesión celular, la movilidad y la degradación de la matriz extracelular. Adicionalmente, el crecimiento de un tumor requiere de vascularización. De esta manera, la angiogénesis (formación de nuevos vasos) es esencial para la progresión tumoral. La adquisición de la capacidad angiogénica, favorece el desarrollo de metástasis, que es la diseminación de las células neoplásicas a sitios distantes del tumor primario, donde proliferan para formar tumores secundarios (Bell and Ryan, 2005; Franks and Knowles, 2005; Hanahan and Weinberg, 2000).

Es importante destacar que, si bien el modelo clásico proporciona un esquema conceptual apropiado para el estudio del cáncer, estas fases no deben considerarse como estadios definidos y aislados durante la carcinogénesis, sino que son parte de una serie de cambios continuos que tienen lugar entre la arquitectura del tejido normal y la del tumor. De esta forma, los diferentes grados de anormalidad estructural y morfológica presentes en un tejido y en las células que lo componen, representan poblaciones que evolucionan progresivamente, adquiriendo un fenotipo más agresivo e invasivo. La presencia de diferentes grados de diferenciación celular, dan cuenta de que la carcinogénesis es un proceso complejo que involucra varias etapas (Boveri, 2014).

Otro aspecto que consideramos oportuno aclarar, concierne al origen clonal de los tumores. Si bien se encuentra ampliamente aceptado el origen clonal de las células tumorales, la mayoría de los tumores contienen poblaciones heterogéneas de células que difieren en su habilidad de repoblar el tumor o formar metástasis (Boveri, 2014). Esta heterogeneidad se ha registrado mediante estudios histopatológicos en diversos tumores, en los que se observan regiones con diferentes grados de diferenciación, proliferación, vascularización, inflamación, y/o invasión.

En los últimos años, se han acumulado evidencias que señalan una nueva dimensión de la heterogeneidad intratumoral: la presencia de células madre del cáncer (CSCs, *del inglés: Cancer Stem Cells*) dentro de los tumores. Las CSCs se caracterizan

por su capacidad para desarrollar tumores de manera eficiente cuando se inoculan en ratones (Cho and Clarke, 2008; Lobo et al., 2007). Esta caracterización se complementa con la expresión de determinados marcadores genéticos que comparten las CSCs y las células madre normales (Al-Hajj et al., 2003). Se han postulado varias teorías acerca del origen de CSCs dentro de un tumor. En algunos casos, las CSCs podrían provenir de células madre normales que fueron transformadas; en otros, células parcialmente diferenciadas podrían transformarse asumiendo características de CSC. Las CSCs, al igual que las células madre normales, poseen la capacidad de auto-renovarse dando origen a nuevas CSCs. Asimismo, estas células pueden diferenciarse dando lugar a los diferentes tipos celulares. En conjunto, estas características conducen al crecimiento tumoral y a la producción de todos los tipos de células de un tumor.

En la actualidad, la hipótesis de las CSCs y el modelo de evolución clonal, constituyen las alternativas más aceptadas para explicar la carcinogénesis y la heterogeneidad tumoral. Cada una de estas ideas ha sido investigada, y se ha acumulado un gran número de evidencias que las apoyan. Si bien estas hipótesis son fundamentalmente desiguales, existen algunos puntos sobre los que ambos modelos están de acuerdo: ambos plantean que los tumores se originan a partir de una sola célula que ha adquirido múltiples mutaciones y ha adquirido un potencial proliferativo ilimitado. Además, en ambos casos, la célula de origen y los factores microambientales puede influir en la composición tumoral, determinar sus características físicas y sus propiedades clínicas.

A pesar de estas similitudes, la hipótesis de las CSCs y el modelo de evolución clonal difieren en varios aspectos. Quizá el más relevante sea el mecanismo que conlleva a la heterogeneidad tumoral, mientras que la teoría de evolución clonal propone la diferenciación celular defectuosa mediante la acumulación de mutaciones, la teoría de las CSCs acude a la capacidad de diferenciación característica de este tipo de células. En segundo lugar, la hipótesis de las CSCs establece que sólo un pequeño grupo de células contribuyen a la progresión tumoral, mientras que el modelo de evolución clonal supone que cualquier célula normal puede sufrir el proceso de transformación (Campbell and Polyak, 2007). Es probable que ambos mecanismos estén involucrados en el proceso carcinogénico, reafirmando la complejidad y heterogeneidad de esta enfermedad.

Con el advenimiento de las técnicas de biología molecular y el desarrollo de organismos genéticamente modificados, se ha generado un amplio y complejo conjunto de conocimientos acerca del cáncer que reafirman la participación de cambios genómicos y no genómicos en el desarrollo de la enfermedad. Esta acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas, ocurren en tres grupos de genes: los *protooncogenes*, que codifican para proteínas involucradas en la regulación de la proliferación celular; los *genes supresores de tumores* que codifican para proteínas que actúan como reguladoras negativas de la proliferación y los *genes de susceptibilidad tumoral*, cuya ausencia o mutación causa un aumento de la probabilidad de aparición de tumores. Entre ellos se pueden incluir a los genes de estabilidad del ADN, encargados de mantener la integridad del genoma y corregir errores en la replicación del ADN.

Las mutaciones y los cambios epigenéticos en estos grupos génicos otorgan a las células una ventaja selectiva que les permite proliferar tanto en el tejido sano como durante el crecimiento tumoral. Esta concepción del cáncer como resultado de alteraciones del ADN, es lo que ha llevado a definirlo como una enfermedad genética del ciclo celular, en la que la aparición de mutaciones hace que se activen genes dominantes (oncogenes) o se inactiven genes recesivos (supresores) que ejercen una función reguladora del ciclo celular normal (Bell and Ryan, 2005; Croce, 2008).

Características de las células normales y transformadas

Para garantizar el correcto funcionamiento del organismo, las células eucariotas cuentan con estrictos sistemas de control sobre la proliferación, la diferenciación y la muerte, ajustándose a las necesidades del organismo (Bell y Ryan, 2005). En algunos tejidos, como el epitelio intestinal, la proliferación celular ocurre continuamente como un mecanismo de renovación constante. En cambio, en la mayoría de los tejidos adultos, las células normalmente no proliferan excepto durante los procesos de reparación (Lodish y col., 2005). Durante el proceso tumoral, las células individuales dejan de responder a las exigencias del tejido u organismo que las acoge.

La pérdida de control del crecimiento celular se origina tras un largo proceso de variación y selección similar al que se produce en la propia evolución. Como mencionamos anteriormente, la iniciación tumoral es el resultado de la acumulación de

mutaciones y de cambios epigenéticos, que otorgan a las células una ventaja selectiva ante las condiciones microambientales del tejido sano y durante el crecimiento tumoral. De esta manera, la progresión tumoral puede entenderse como un proceso regido por los principios Darwinianos de evolución y selección natural (Greaves and Maley, 2012).

Una de las principales características que distingue a las células cancerosas de las células normales es la incapacidad de las primeras para regular los procesos de proliferación, de diferenciación y de muerte, lo que conlleva a una alteración fenotípica y a la transformación maligna. Dentro del amplio y variado conjunto de tumores y alteraciones genotípicas descritas en células tumorales, Hanahan y Weinberg sugirieron, en el año 2000, seis alteraciones esenciales de la fisiología celular, las cuales, colectivamente, derivan en el crecimiento maligno (Hanahan and Weinberg, 2000). Estas características son: el *autocontrol del crecimiento*, la *insensibilidad a factores antiproliferativos*, la *evasión de la apoptosis*, el *potencial replicativo ilimitado*, la *angiogénesis sostenida* y la *invasión tisular y metástasis*. Los avances conceptuales acerca del cáncer que acontecieron en la última década, permitieron a estos autores, en el año 2011, añadir dos características emergentes a esta lista: la *reprogramación del metabolismo energético*, necesaria para sostener un crecimiento indefinido y la *evasión de la respuesta inmune* (Hanahan and Weinberg, 2011) (Fig. 4).

Dos procesos adicionales subyacen a estos cambios en la biología celular: la *inestabilidad genómica*, que acelera la adquisición de mutaciones en las células tumorales, y la *inflamación*, que promueve múltiples sucesos característicos del proceso carcinogénico. Cada una de estas capacidades fisiológicas adquiridas durante el desarrollo tumoral, representa la ruptura de un mecanismo de control presente en las células y tejidos sanos.



Figura 4. Características de las células tumorales. Adaptada de Hanahan and Weinberg, 2011.

Bajo estas circunstancias, ya no podemos pensar a los tumores como simples masas celulares provenientes de una multiplicación descontrolada, sino que los mismos deben ser considerados como tejidos complejos compuestos de múltiples tipos celulares que interaccionan entre sí. En este sentido, los tumores presentan un conjunto de células de apariencia normal, que constituyen el microambiente tumoral. Estas células contribuyen a la adquisición de las alteraciones fisiológicas características de las células tumorales (Hanahan and Weinberg, 2011). El microambiente tumoral es una parte integral de su anatomía y, funcionalmente, no podemos disociarlo de lo que tradicionalmente ha sido llamado "células tumorales" (Albini and Sporn, 2007). En los últimos diez años, esta noción se ha arraigado en nuestra concepción del cáncer, forjando una visión más compleja de la enfermedad. De acuerdo a este modelo, la biología tumoral ya no puede entenderse mediante la enumeración de las características de las células cancerosas, sino que su estudio debe abarcar las contribuciones del entorno tumoral a la carcinogénesis.

Ciclo celular y cáncer

Como mencionamos anteriormente, la iniciación tumoral es el resultado de la acumulación de mutaciones y de cambios epigenéticos, que otorgan a las células, entre otras características, la capacidad de proliferar de forma ilimitada. Paradójicamente la mayoría de los tumores se originan en tejidos adultos, en los que predominan células en estado de quiescencia, por lo tanto, la ventaja proliferativa de las células tumorales proviene de su habilidad para eludir este estado e ingresar al ciclo celular.

El ciclo celular consiste en una secuencia ordenada de eventos que conducen a la división celular y a la producción de dos células hijas. Durante este ciclo, las células transitan por períodos de replicación del material genético y segregación de los cromosomas en forma alternada. El control espacial y temporal preciso de los acontecimientos del ciclo celular, asegura que la replicación de los cromosomas y su segregación a las células hijas se produzca en el orden apropiado y con una fidelidad extraordinariamente alta. La regulación del ciclo celular es fundamental para el desarrollo normal de los organismos multicelulares.

Dentro del ciclo celular podemos distinguir cuatro fases principales (Fig. 5): la fase G1 abarca un período relativamente largo del ciclo celular, en el cual las células sintetizan las proteínas necesarias para la duplicación del material genético. La síntesis de ADN tiene lugar durante la denominada fase S del ciclo, cuya duración varía entre los organismos de diferentes especies. A continuación, las células atraviesan una nueva etapa de síntesis de proteínas, antes de comenzar la segregación de los cromosomas durante la mitosis (fase M). La fase M es la fase más corta del ciclo celular, llegando, a veces, a completarse en apenas una hora. Durante esta etapa, las cromátidas hermanas resultantes de la duplicación del ADN, se distribuyen en cada una de las células hijas. Las células que no proliferan se encuentran en una etapa de quiescencia, denominada G0 (Lodish et al., 2004).

La correcta replicación de los cromosomas y su segregación a las células hijas constituye un evento crítico para el desarrollo normal de los organismos multicelulares. Por esta razón, las células cuentan con una serie de mecanismos que controlan cada paso en la progresión del ciclo celular. Ante una falla en el proceso, estos mecanismos

actúan y las células abortan el proceso de división hasta que se restablezcan las condiciones adecuadas. Adicionalmente, las células controlan que, una vez que se ha completado una etapa particular del ciclo celular, la misma no se repite hasta que la célula pasa a través de un nuevo ciclo. Este hecho asegura una de las características fundamentales de este proceso: la irreversibilidad.

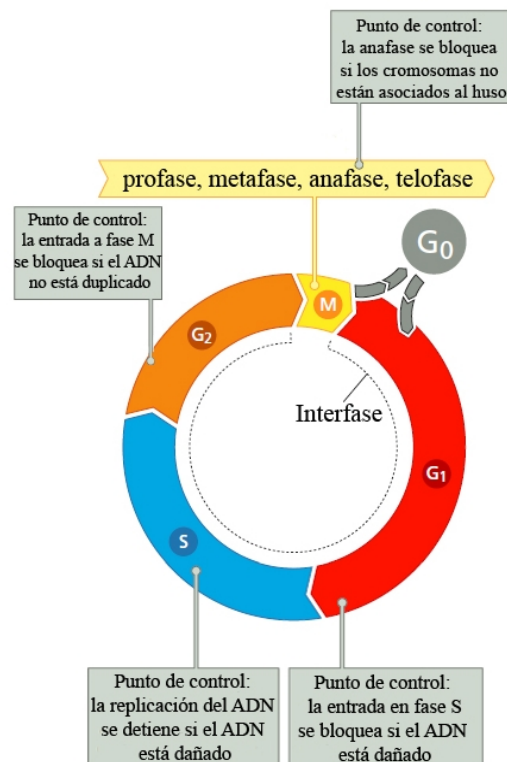


Figura 5. Ciclo celular. Las fases del ciclo celular y los puntos de control. Adaptada de Weinberg, 2014.

En términos generales, los mecanismos de control que actúan para asegurar la marcha correcta a través del ciclo celular se llevan a cabo mediante los denominados “puntos de control”. El primer punto de control se encuentra en la transición desde G₁ a S. En este momento, las células examinan la integridad del genoma, que deberá ser duplicado en la siguiente etapa del ciclo. El segundo punto de control, opera dentro de la fase S. En este caso, la duplicación del ADN se enlentece o se pausa en respuesta al daño sobre esta macromolécula. En células de mamíferos, esto puede causar un incremento en el tiempo requerido para completar la duplicación del ADN. El tercer punto de control, se encuentra en la transición desde la fase G₂ a M. En este punto, se

impide el comienzo de la mitosis hasta que el ADN se encuentre completamente duplicado. Finalmente, durante la fase M, un cuarto punto de control impide el comienzo de la anafase hasta que todos los cromosomas se encuentren correctamente asociados al huso mitótico (Fig 5).

En el control del ciclo celular están implicadas una serie de proteínas con actividad quinasa denominadas quinasas dependientes de ciclinas (Cdks) que fosforilan sustratos y conducen a la replicación del ADN y la mitosis. Las diferentes Cdks presentes en las células comparten el 40 % de la secuencia de aminoácidos, constituyendo una gran familia de proteínas con actividad serina/treonina quinasa. Estas proteínas no presentan actividad de manera individual, sino que dependen de la asociación con proteínas reguladoras para su funcionamiento. Estas proteínas reguladoras se denominan ciclinas. Las ciclinas, por su parte, también constituyen una familia de diferentes proteínas celulares que comparten en común un dominio de aproximadamente 100 aminoácidos, implicado en la unión y activación funcional de las Cdks (Weinberg, 2014).

Durante las diferentes fases del ciclo celular, distintos complejos de ciclinas-Cdks se activan para permitir la fosforilación de los sustratos necesarios para la progresión a través del ciclo celular. En la figura 6, se muestran los múltiples complejos formados por las ciclinas y las Cdks a lo largo del ciclo celular. Las ciclinas de tipo D (D_1 , D_2 , y D_3) se asocian con las Cdk4 o Cdk6 permitiendo a las células transcurrir a través de la fase G1 temprana del ciclo. Al final de esta fase, se incrementan los niveles de ciclinas de tipo E (E_1 y E_2), las cuales se unen a la quinasa Cdk2. Este hecho permite el ingreso de las células a la fase S del ciclo. Durante la fase S, las ciclinas de tipo E son reemplazadas por ciclinas de tipo A (A_1 y A_2) en el complejo con la quinasa Cdk2. Posteriormente, las ciclinas de tipo A se asocian a otro tipo de quinasa, denominada Cdc2 (también llamada Cdk1), permitiendo que las células avancen hacia la fase G2 del ciclo. Finalmente, las ciclinas de tipo B (B_1 y B_2) se unen a la quinasa Cdc2 durante la mitosis (Fig. 6.A).

La actividad de los complejos ciclina-Cdks se regula mediante los niveles y la disponibilidad de las ciclinas en las distintas fases del ciclo celular (Fig 6.B). En contraste, los niveles de la mayoría de las Cdks varían sólo mínimamente.

La actividad de los complejos ciclina-Cdks, es regulada por inhibidores específicos. Existen dos familias de inhibidores: INK4 y WAF/KIP. Los miembros de la familia INK4, actúan específicamente en los complejos formados por Cdk4 y Cdk6. Estos inhibidores son p16^{Ink4a}, p15^{Ink4b}, p18^{Ink4c} y p19^{Ink4d}. Los miembros de la familia WAF/KIP son capaces de inhibir todos los otros complejos de ciclina-Cdk que se forman en las etapas posteriores del ciclo celular. A esta familia pertenecen los inhibidores p21^{Cip1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2}. Cabe mencionar, que estas proteínas son capaces de afectar a otros procesos además de la progresión del ciclo celular, incluyendo la regulación de la transcripción génica, la apoptosis, la migración y la organización del citoesqueleto.

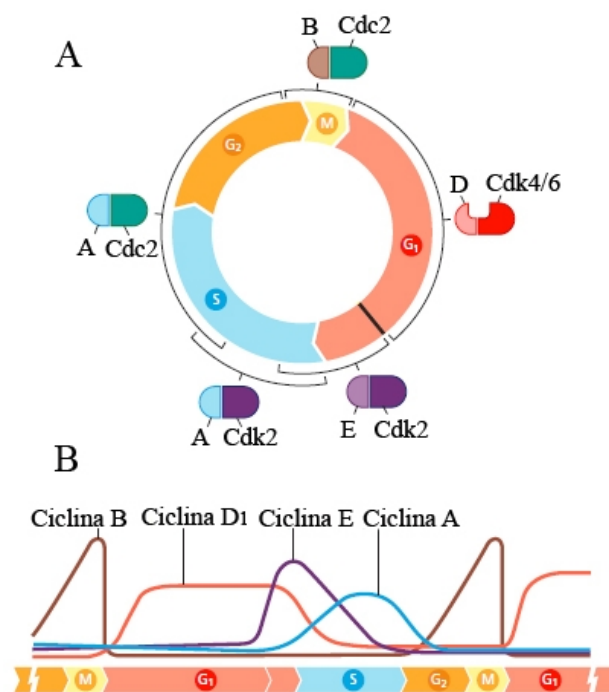


Figura 6. Regulación del ciclo celular. A) Las distintas fases del ciclo celular son reguladas por la activación de diferentes complejos ciclinas-Cdk. B) Variación de los niveles de ciclinas a lo largo del ciclo celular. Adaptada de Weinberg, 2014.

Como mencionamos anteriormente, estos mecanismos regulatorios se encuentran alterados en las células tumorales, tanto por la activación de genes que

promueven el ingreso al ciclo o la inactivación de genes inhibidores del mismo (Bell and Ryan, 2005; Croce, 2008).

Estructura y desarrollo de la glándula mamaria

Para comprender los cambios que llevan a la transformación maligna del tejido mamario es necesario conocer la estructura y el desarrollo de la glándula normal. La mama es una glándula exócrina que produce y secreta leche. Está formada por un parénquima y un estroma. El parénquima es una estructura celular dispuesta como una red arbórea de conductos y alvéolos rodeados por un estroma de tejido conectivo que contiene también vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios.

Esta glándula no se encuentra totalmente desarrollada al nacimiento, entrando en un proceso progresivo de elongación y ramificación durante la pubertad. El proceso es complejo e involucra la diferenciación específica de poblaciones de células progenitoras mamarias en ductos y alvéolos. Se puede identificar un paralelismo entre la estructura y el desarrollo de la glándula mamaria humana con la evolución de la glándula mamaria murina (Chan et al., 2005; I. H. Russo and Russo, 1996). Por este motivo, la rata representa uno de los principales modelos animales para el estudio del cáncer de mama.

El desarrollo de la glándula mamaria puede dividirse en dos etapas estructural y funcionalmente diferentes. En primer lugar, la mama atraviesa una fase de desarrollo ductal en la cual se genera un complejo sistema ramificado de ductos. Esta etapa comienza en la pubertad y se extiende hasta el embarazo. En segundo lugar, la mama ingresa en la etapa secretora, en la cual se generan las estructuras alveolares responsables de la síntesis y secreción de la leche a través de los conductos formados previamente (Hinck and Silberstein, 2005).

En las ratas, el proceso de ramificación del sistema ductal se inicia en el feto, observándose un incremento en la proliferación de las células epiteliales mamarias y su penetración hacia el tejido adyacente durante los últimos días de la gestación (Hens and Wysolmerski, 2005). Posteriormente, comienza un proceso de morfogénesis y

ramificación que culmina con la formación de un árbol ductal rudimentario presente en las crías en su nacimiento. El período peripuberal, se caracteriza por la presencia de un número variable de estructuras epiteliales bulbares conocidas como brotes terminales (TEBs, *del inglés: Terminal End Bud*), las cuales presentan una alta actividad proliferativa permitiendo la elongación de los ductos entre el tejido graso. El número de TEBs es máximo luego de 21 días de vida de los animales. Entre los 35 y 50 días de vida, dependiendo de la cepa estudiada, las ratas ingresan a la pubertad. A partir de ese momento, los TEBs comienzan a dividirse formando los denominados brotes alveolares. Esta diferenciación se acentúa con cada ciclo ovárico (Sternlicht, 2006; Sternlicht et al., 2006). La etapa adulta de estos animales se establece con la consolidación de los ciclos estrales. Cada ciclo estral queda constituido por las etapas proestro, estro, metaestro y diestro. Una característica sobresaliente de este período es la disminución de los niveles de proliferación. La duplicación celular tiene lugar predominantemente en las células de los brotes alveolares siendo este proceso más frecuente durante la fase diestro del ciclo. A pesar de este hecho, la glándula se encuentra morfológicamente más desarrollada durante la fase estro.

Luego del coito, se observa una proliferación masiva de las células epiteliales de los TEBs, las cuales se dividen rápidamente incrementando el número de brotes alveolares (Oakes et al., 2006). Los espacios interductales, abundantes en las hembras vírgenes, son ocupados por nuevas ramificaciones de los ductos y el desarrollo de nuevos brotes alveolares. La condición de diferenciación total sólo se alcanza luego de un embarazo a término, donde la influencia hormonal induce abundantes ramificaciones del parénquima mamario que llevan a la formación de estructuras lobulares totalmente secretoras (Anderson et al., 2007; Russo et al., 2000) (Fig. 7).

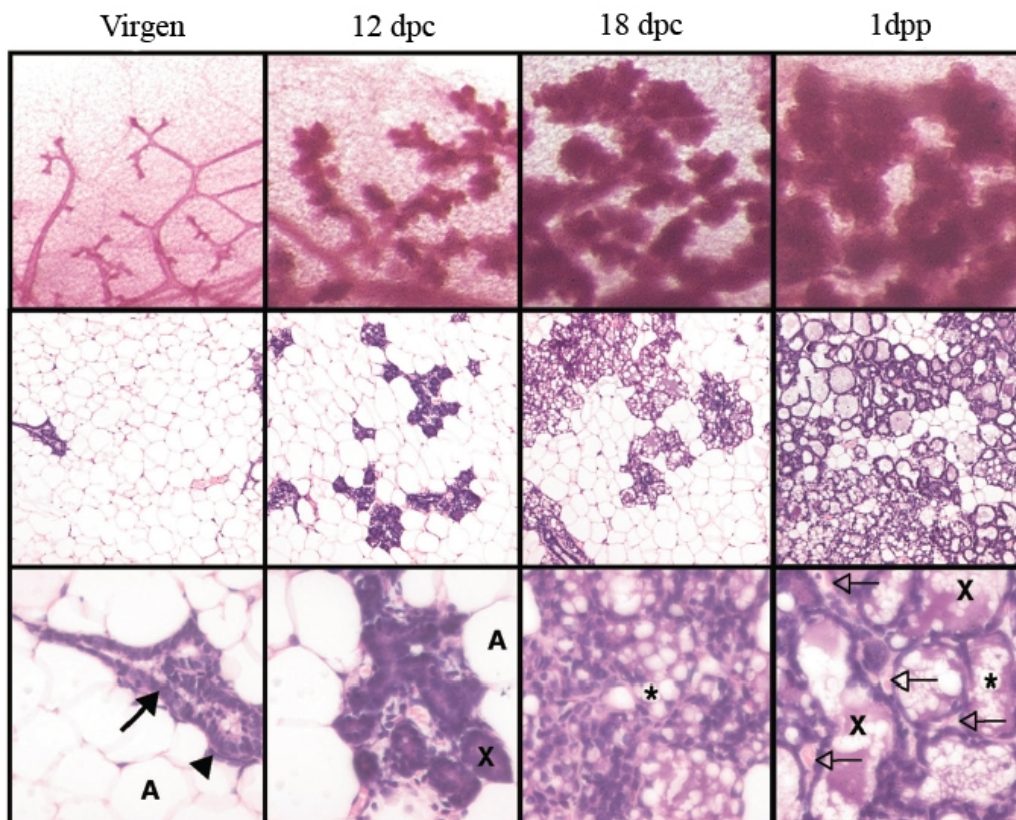


Figura 7. Estadios en el desarrollo de la mama normal. Fotografías del tejido mamario completo (motaje de la mama entera) (fila 1) y cortes histológicos teñidos con Hematoxilina-Eosina en aumentos crecientes (fila 2 y 3). Dentro de cada fila, de izquierda a derecha, las fotografías corresponden a la glándula de ratas en diferentes estadios de crecimiento: vírgenes, 12 días post coito (dpc), 18 dpc y 1 día post parto (dpp). La flecha negra señala a las células epiteliales ductales. La punta de flecha señala células mioepiteliales. Al inicio del embarazo se produce la proliferación masiva de células epiteliales, lo cual es estimulado predominantemente por la prolactina y progesterona. Durante el embarazo, los alvéolos continúan proliferando y forman una esfera de células epiteliales que envuelven un lumen circular (X). Esto es seguido por un incremento de la proliferación y la diferenciación celular. La diferenciación se caracteriza por la presencia de gotitas de lípidos citoplásmicos (*). A los 18 dpc, los alvéolos tienen grandes cantidades de lípidos. Luego del parto, las proteínas y lípidos de la leche son secretados en la luz alveolar (X). En este momento, se evidencia una expansión de la vasculatura (flechas abiertas) y la reducción en el área ocupada por tejido adiposo (A) en el estroma glandular. Modificada de Oakes et al., 2006.

Influencia hormonal sobre el tejido mamario

Como mencionamos anteriormente, las funciones de la glándula mamaria requieren de la formación de un complejo sistema de conductos ramificados, que se forman mediante un proceso intensamente regulado por estímulos hormonales. En relación a la influencia hormonal durante el desarrollo de la glándula mamaria, podemos distinguir dos fases principales.

La primera fase del desarrollo glandular es independiente de los estímulos hormonales. Esta etapa tiene lugar desde la embriogénesis y hasta la pubertad. En este período, la glándula mamaria crece isométricamente con el resto del cuerpo. Si bien existe un amplio consenso acerca de la independencia hormonal de esta fase, muchos investigadores han reportado la presencia de receptores hormonales en estadios tempranos del desarrollo glandular (Heuberger et al., 1982; Hovey et al., 2001; Stumpf et al., 1980). En este sentido, la exposición durante este período a hormonas exógenas u otros factores, podría resultar en el desarrollo defectuoso de la glándula.

La segunda fase comienza en la pubertad, y depende de una compleja regulación hormonal. En esta etapa, los niveles de estradiol (E_2) y progesterona (Pg) se incrementan, promoviendo el desarrollo de la glándula mamaria a un ritmo cíclico. Este proceso comienza con el alargamiento ductal seguido por la iniciación de las ramificaciones laterales inducidas por los repetidos ciclos ováricos durante la adultez. La elongación ductal es regulada por el E_2 , mientras que la ramificación lateral tiene lugar gracias a la acción de la Pg. En esta etapa también se incluye la formación de los alveolos inducida por la gestación, la diferenciación producida durante la lactancia y la involución que ocurre luego del destete (Briskin, 2002).

En el desarrollo de la glándula mamaria participan numerosas hormonas. Entre ellas, encontramos hormonas ováricas como E_2 y Pg, hormonas hipofisarias como la prolactina y la hormona de crecimiento (GH), y aquellas que se sintetizan en las glándulas adrenales como el cortisol (Briskin and O'Malley, 2010). La participación de cada una de ellas se resume brevemente a continuación. Los niveles circulantes de muchas de estas hormonas varían con el ciclo estral, al cual nos referiremos más adelante en este trabajo.

El *estradiol* es el principal regulador del desarrollo mamario siendo fundamental en la elongación ductal. Adicionalmente, en combinación con otras hormonas, el E₂ interviene en el desarrollo de los brotes alveolares (Cheng et al., 2004). El E₂ actúa sobre la glándula mamaria estimulando la síntesis de ADN y promoviendo la formación de nuevos brotes (Ruan et al., 2005; Russo et al., 2000).

La *progesterona* es un regulador clave de las funciones reproductivas como la ovulación, el desarrollo del útero y de la glándula mamaria. Durante el desarrollo mamario, esta hormona es fundamental en la ramificación lateral y el desarrollo lobuloalveolar de ratas y ratones (Atwood et al., 2000; Sternlicht, 2006). Durante el embarazo, los niveles séricos de Pg se encuentran elevados promoviendo una intensa proliferación epitelial que conduce a la ramificación lateral y a la diferenciación alveolar. Una vez transcurrido el parto, los niveles séricos de esta hormona descienden abruptamente.

La *prolactina* es una hormona polipeptídica producida principalmente por la glándula hipofisaria. Las acciones de esta hormona sobre el desarrollo de la glándula mamaria ocurren por interacción directa con su receptor específico (RPrI) (Camarillo et al., 2001). Este receptor es una proteína de transmembrana que se expresa en las células epiteliales mamarias. Estudios realizados con animales carentes del RPrI, demostraron que el mismo no es necesario para el crecimiento y la ramificación lateral ductal, sin embargo, se observó que su presencia es necesaria para la alveologénesis y la diferenciación de células epiteliales mamarias a células productoras de leche durante el embarazo avanzado (Briskin et al., 1999; Mulac-Jericevic and Conneely, 2004).

El eje hormonal constituido por la *hormona de crecimiento* y el *factor de crecimiento insulínico tipo I* (GH/IGF-I), presenta un importante papel en el control del crecimiento y desarrollo de las estructuras glandulares mamarias. La GH, estimula la liberación del IGF-I, el cual es responsable del desarrollo de los TEBs y de la morfogénesis ductal a lo largo de la vida (Lann and LeRoith, 2008; Ruan et al., 2005). Se sabe que en ausencia de IGF-I el desarrollo mamario no ocurre, aún en presencia de estrógenos (Laban et al., 2003). Tanto el E₂ como la Pg actúan promoviendo la acción del IGF-I durante el desarrollo mamario (Ruan et al., 2005). El IGF-I también participa

en el mantenimiento de la glándula mamaria adulta durante la lactancia. Ratones transgénicos que sobreexpresan el gen *igfl* durante la etapa de la lactancia entran en hipertrofia ductal y fallan en la involución de la glándula mamaria seguida al destete (Laban et al., 2003).

En resumen, el E₂, la Pg y la prolactina actúan secuencialmente sobre el epitelio mamario regulando su desarrollo. Durante la pubertad, los niveles de estrógeno se incrementan e inducen la expresión del receptor de progesterona (RPg) en la glándula mamaria y en la mayoría de los tejidos blanco de la Pg (Clarke, 2006; Haslam and Shyamala, 1979; Micevych et al., 2009). Cuando se alcanza la madurez sexual, comienza un patrón de secreción cíclica de Pg, coincidiendo con la ramificación dicotómica del sistema de ductos mamarios. Una vez que se establece el árbol ductal, durante el embarazo, el incremento en los niveles de prolactina induce la formación de los alvéolos (Briskin, 2002). Esta acción secuencial de las hormonas resulta crucial para el desarrollo de la glándula mamaria (Fig. 8).

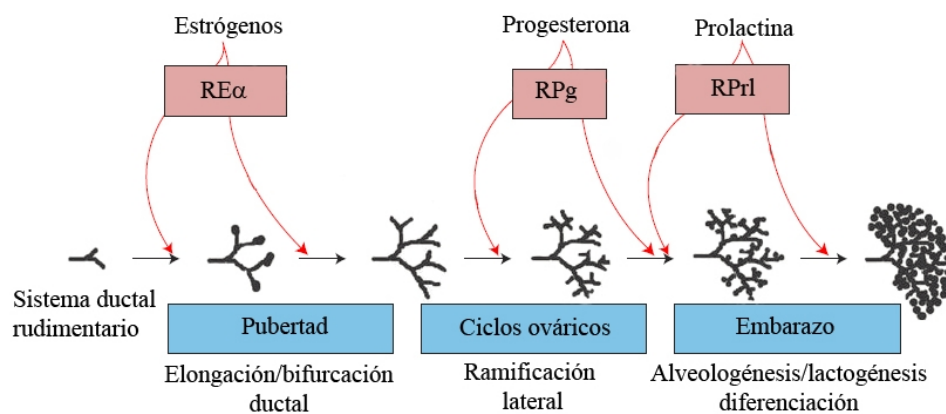


Figura. 8. Influencia hormonal en el desarrollo de la glándula mamaria. Adaptada de Briskin and O'Malley, 2010.

Si bien este modelo de acción secuencial describe correctamente la influencia hormonal sobre el tejido mamario, no debemos perder de vista la complejidad del sistema. En la actualidad, es reconocido el hecho de que las hormonas actúan sobre diferentes órganos y, a su vez, afectan la síntesis y secreción de otras hormonas. Los estrógenos por ejemplo, no solo afectan al sistema reproductivo sino que pueden actuar sobre el sistema cardiovascular y los huesos. Además, estas hormonas actúan sobre la glándula pituitaria estimulando la síntesis y secreción de prolactina (Scully et al., 1997). La prolactina, a su vez, controla la formación del cuerpo lúteo en los ovarios y, por tanto, la síntesis de Pg. Finalmente, estas hormonas inducen la transcripción del receptor de estrógeno alfa (RE α) en diferentes tejidos (Clarke, 2006; Frasor and Gibori, 2003; Micevych et al., 2009). Debido a esta compleja red de interacciones, resulta imposible de discriminar si el efecto producido por un estímulo hormonal determinado sobre la glándula mamaria es el resultado de la acción hormonal directa sobre este tejido o de la acción secundaria mediante la estimulación de otros órganos.

Las mismas hormonas que controlan el desarrollo de la glándula mamaria son las que están involucradas en la carcinogénesis mamaria (Brisken and O'Malley, 2010). Numerosos estudios en animales han demostrado que los estrógenos pueden inducir y promover el cáncer mamario, mientras que la remoción de los ovarios o la administración de sustancias antiestrogénicas tienen el efecto opuesto (Palmieri et al., 2002).

Receptores de hormonas esteroideas

Como describimos anteriormente, los esteroides ováricos E₂ y Pg, regulan el crecimiento y la diferenciación celular en la glándula mamaria. Estas hormonas ejercen su acción a través de sus receptores específicos: el receptor de estrógenos (RE) y el RPg.

Los RE pertenecen a una familia de receptores nucleares, que actúan como factores de transcripción regulando la expresión de diferentes genes. Hasta el momento, se han identificado dos receptores de estrógenos nucleares, conocidos como RE α y RE β (Harrington et al., 2003). Existe un tercer receptor de estrógenos que se ubica en la membrana plasmática, conocido como GPR30 y ejerce sus efectos mediante la

activación de diferentes proteínas G, lo cual conlleva al incremento de AMPc y la consecuente activación o inactivación de diferentes cascadas de fosforilaciones intracelulares (Speirs and Walker, 2007).

El RE es el principal encargado de recibir los estímulos estrogénicos y convertirlos en una respuesta biológica. Este receptor se encuentra presente tanto en las células epiteliales como en el estroma mamario. Estudios realizados con ratones carentes de este receptor, indicaron que el RE presente en las células epiteliales es el principal responsable de los efectos inducidos por el E₂, mientras que el RE estromal no es requerido en estos procesos (Cheng et al., 2004). La activación de este receptor presenta una gran importancia en el desarrollo de las funciones normales del tracto reproductor femenino, las características sexuales secundarias y el comportamiento reproductivo. La función del RE en el desarrollo mamario permanece en discusión. Estudios realizados en ratones carentes de este receptor, indican que el mismo actuaría modulando los efectos producidos por el RE (Ascenzi et al., 2006; M.-M. Liu et al., 2002; Murphy and Leygue, 2012; Speirs and Walker, 2007; Speirs et al., 2002).

El mecanismo clásico mediante el cual estos receptores modulan la transcripción génica incluye su interacción con E₂, lo cual activa al receptor promoviendo una serie de eventos que incluyen dimerización, localización nuclear y la interacción con co-activadores transcripcionales formando complejos multiproteicos. Estos complejos se unen a secuencias específicas del ADN denominados elementos de respuesta a estrógenos (ERE) y desencadenan una serie de eventos que promueven la iniciación de la transcripción. En su mayoría, los genes regulados positivamente están involucrados en la proliferación y la progresión del ciclo celular, mientras que aquellos que son regulados negativamente tienen que ver con la apoptosis y la regulación antiproliferativa.

Por otra parte, el RE puede activarse de forma independiente de la unión del ligando. En este caso, se han identificado varias quinasas pertenecientes a diferentes vías de transducción de señales capaces de activar al RE y sus proteínas co-reguladoras en ausencia de E₂. En particular, la vía de los Wnt/ -catenina se encuentra ampliamente vinculada con la activación del RE. Esta vía de señalización juega un papel decisivo en los procesos de diferenciación, proliferación y muerte celular. Las proteínas Wnt son

glucoproteínas de secreción que estimulan vías de transducción de señales mediante la unión a receptores específicos. Actualmente se conocen cuatro vías de señalización de Wnt: 1) la vía canónica o Wnt- β -catenina; 2) la vía Wnt/Ca²⁺, que involucra a la proteína quinasa A; 3) la vía de polaridad celular planar y 4) la vía que involucra a la proteína quinasa C (Ochoa Hernandez et al., 2012).

La actividad de la vía de señalización Wnt- β -catenina depende de la concentración citoplasmática de β -catenina. La proteína β -catenina se encuentra normalmente formando parte de las uniones adherentes. Lo normal es que esta proteína se mantenga en bajas concentraciones en el citoplasma, gracias a un proceso de degradación dependiente de ubiquitina-proteosoma (Aberle et al., 1997; C. Liu et al., 2002). La proteólisis de β -catenina es regulada mediante su fosforilación por medio de la quinasa Gsk-3. Cuando esta quinasa se encuentra inactiva, la degradación de β -catenina no se produce. El incremento de β -catenina citoplasmática permite su entrada al núcleo en donde activa la transcripción de genes involucrados en diferentes procesos como la proliferación y la invasión celular (Fig. 9) (Ikeda et al., 1998; Yost et al., 1996). La vinculación entre estos procesos y la respuesta estrogénica ha sido ampliamente documentada. De esta forma, los estímulos estrogénicos incrementan la fosforilación de la Gsk-3 en la serina 9, lo cual deriva en la inactivación de esta quinasa (Cardona-Gomez et al., 2004; Grisouard and Mayer, 2009; Medunjanin et al., 2005). Adicionalmente, la quinasa Gsk-3 regula la actividad del RE mediante la formación de un complejo citosólico y su fosforilación en varios residuos de serinas.

Se ha descrito la formación de un complejo entre el RE y la Gsk-3 tanto en el núcleo como en el citosol celular (Medunjanin et al., 2005), así como también la interacción de β -catenina con el RE, formando un complejo capaz de regular la transcripción génica en células de hipocampo (Varea et al., 2010).

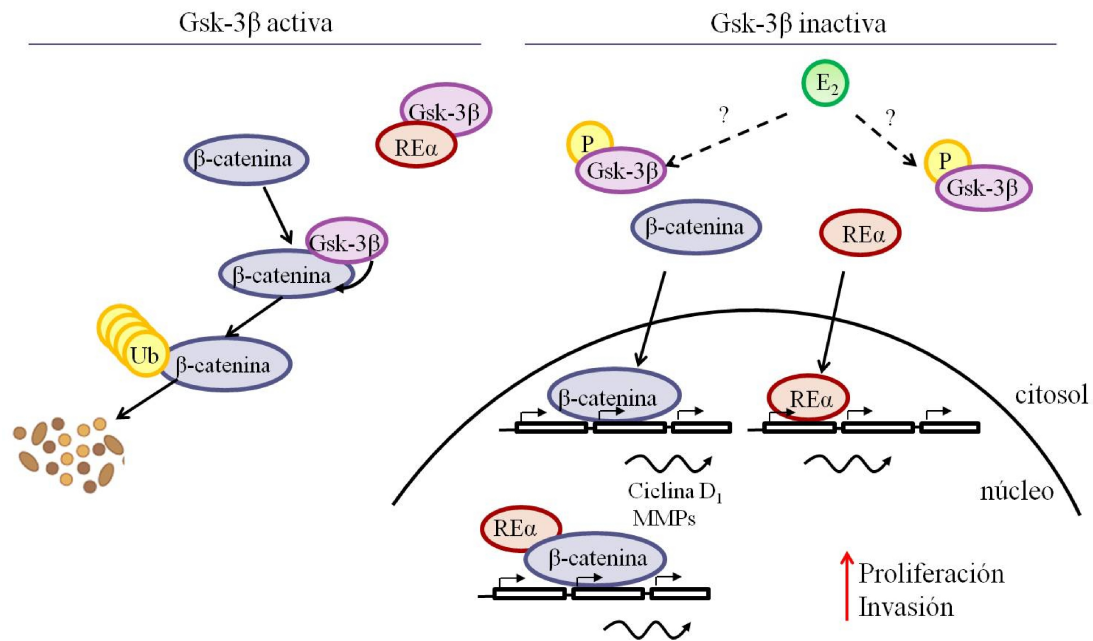


Figura 9. Estímulo estrogénico en la vía Wnt/ β -catenina. A la izquierda, Wnt/ β -catenina inactiva. La quinasa Gsk-3 fosforila a β -catenina lo cual conduce a su degradación proteosómica. A su vez, esta quinasa se encuentra formando un complejo con el RE. A la derecha, vía Wnt/ β -catenina activada por un estímulo estrogénico. En este caso, la quinasa Gsk-3 se encuentra fosforilada en su serina 9 en su estado inactivo, permitiendo la acumulación y translocación nuclear de β -catenina. Adicionalmente, la inactivación de Gsk-3 permite la translocación nuclear del RE. En el núcleo celular, tanto β -catenina como el receptor o incluso ambas proteínas en forma conjunta, inducen la transcripción de genes involucrados en la proliferación y la invasión celular. Elaboración propia.

Además de los clásicos receptores RE y RE, en los últimos años se han descrito efectos extranucleares del E₂, mediados por un receptor de siete dominios transmembrana que se encuentra acoplado a una proteína G (Björnström and Sjöberg, 2005; Hammes and Levin, 2007). La unión del E₂ a estos receptores dispara señales rápidas, modulando diferentes vías de señalización como la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK, *del inglés: Mitogen Activated Protein Kinases*), la vía de la fosfoinositol-3 quinasa (PI3K), p21^{ras}, Raf-1, proteína quinasa C (PKC), el incremento en los niveles intracelulares de Ca⁺², la liberación de NO y la estimulación de la secreción de prolactina (Shupnik, 2004; Zheng et al., 2007).

Los efectos fisiológicos de la Pg están mediados por la interacción de la hormona con sus receptores específicos intracelulares, de los cuales se conocen dos isoformas, RPg-A y RPg-B (Lydon et al., 1999; Orb and Edwards, 2013). Ambos receptores se expresan tanto en células epiteliales como estromales. Estudios realizados utilizando ratones con silenciamiento en la expresión de cada uno de estos receptores demostraron que el RPg-B de las células epiteliales es necesario para que la Pg promueva el desarrollo y diferenciación del tejido mamario (Mulac-Jericevic and Conneely, 2004). El mecanismo de acción de los RPg es similar al descrito tradicionalmente para el RE. La unión de la hormona al receptor induce una serie de cambios que incluyen la disociación de complejos formados por el receptor y proteínas chaperonas, la dimerización, la fosforilación y la traslocación nuclear del receptor. Estos eventos, posibilitan su unión a secuencias específicas del ADN denominadas elementos de respuesta a Pg (ERP) presentes en las regiones reguladoras de genes específicos. La unión del RPg a los ERP es seguida por el reclutamiento de co-activadores y de la maquinaria de transcripción basal, lo cual conduce a un incremento de la transcripción de dichos genes.

Síntesis ovárica de hormonas esteroideas: esteroidogénesis

Como describimos anteriormente, las hormonas esteroideas poseen un rol fundamental en el desarrollo de la glándula mamaria. Además, los esteroides producidos en el ovario poseen efectos locales, los cuales son esenciales para que el ovario funcione correctamente. Debido a esto, cualquier variación en los niveles de esteroides puede llevar a situaciones patológicas.

Como se observa en la figura 10, la totalidad de las hormonas esteroideas ováricas se sintetizan a partir del *colesterol*, el cual es transportado al interior de las células por un proceso de endocitosis mediado por receptores asociados a la membrana plasmática. La primera reacción de la esteroidogénesis tiene lugar en las células de la teca, dentro de las mitocondrias. El ingreso del colesterol a estas organelas es mediado por una proteína transportadora denominada StAR. Una vez dentro de la mitocondria, el colesterol es transformado en un compuesto de 21 carbonos denominado *pregnenolona*.

Este proceso es mediado por la enzima CYP11A, la cual cataliza la ruptura del enlace entre los carbonos 20 y 22 del colesterol. Esta reacción tiene lugar en la membrana interna de la mitocondria y, junto con el ingreso del colesterol a esta organela, constituyen los pasos limitantes en la velocidad de síntesis de los esteroides. La pregnenolona es un intermediario común en la biosíntesis de todas las hormonas esteroideas producidas por el ovario. Una vez sintetizada, abandona la mitocondria e ingresa al retículo endoplasmático liso (REL), donde es rápidamente convertida en *Pg*, debido a la presencia de una gran cantidad de enzima 3-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3-HSD). La *Pg* es el primer compuesto con actividad biológica producido durante la esteroidogénesis y es secretada por células ováricas durante la fase lútea del ciclo estral (Stocco et al., 2007).

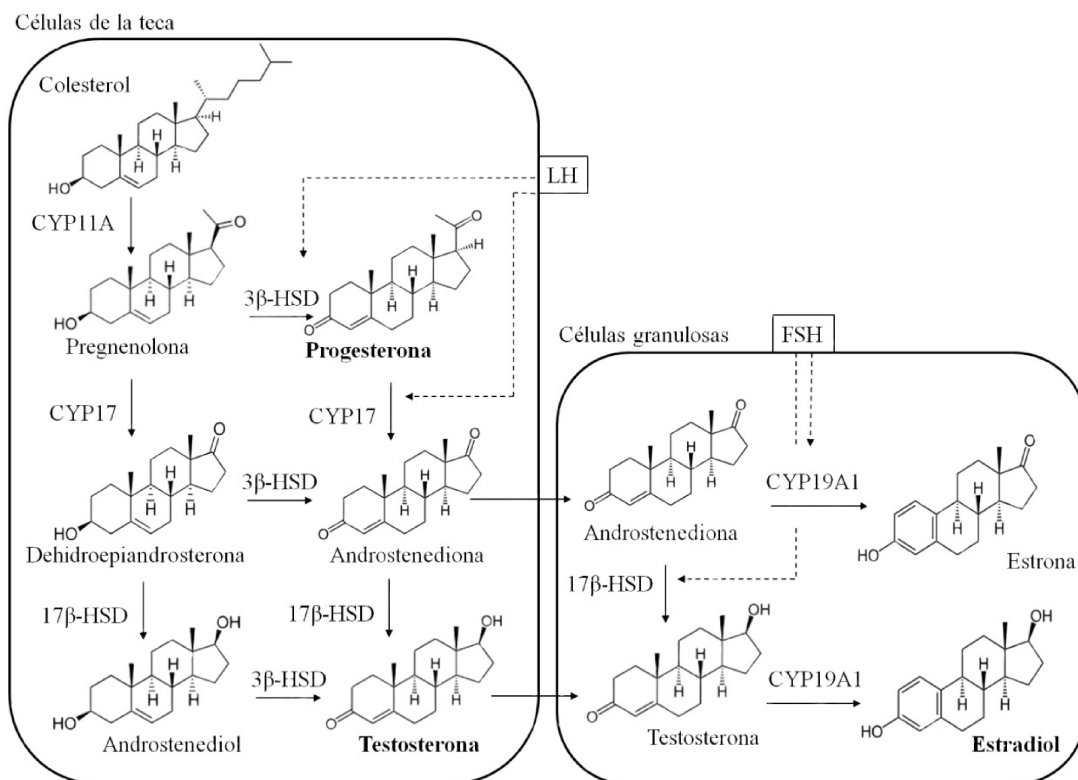


Figura. 10. Síntesis ovárica de hormonas esteroideas. Elaboración propia.

Durante la fase folicular del ciclo, tanto la Pg como la pregnenolona son sustratos de otro complejo enzimático que da lugar a la síntesis de *androstenediona* y *dehidroepiandrosterona (DHEA)*, respectivamente. Este complejo, denominado CYP17, se encuentra ubicado en la membrana interna del REL. La androstenediona y la DHEA son sustratos de una enzima denominada 17 - hidroxisteroide deshidrogenasa (17 - HSD), la cual cataliza su transformación a *testosterona (T)* o *androstenediol*, respectivamente. A su vez, el androstenediol es convertido a T por la enzima 3 -HSD.

Los pasos siguientes en la síntesis de los esteroides, ocurren en las células de la granulosa. Ambas moléculas, androstenediona y T, acceden a estas células donde se convierten en los precursores inmediatos de los estrógenos. La conversión de androstenediona a *estrona* y la de T a *17 -estradiol* son catalizadas por un complejo enzimático denominado Aromatasa (CYP19A1).

Regulación de la esteroidogénesis

Los mecanismos neuroendócrinos desempeñan un papel importante en la regulación del ciclo sexual y reproductivo. Las complejas interacciones entre las gonadotrofinas y las hormonas esteroideas proporcionan la base de la ciclicidad presente en la hembra de los mamíferos. Durante el ciclo ovárico pueden observarse dos etapas bien definidas: la fase folicular, en la cual se generan y maduran los folículos conteniendo a los ovocitos y, en ausencia de fecundación, la fase lútea.

En los roedores el ciclo se repite cada 4 o 5 días y, como ya mencionamos, consisten en las fases metaestro, diestro, proestro y estro. Las fases metaestro y diestro se relacionan con la formación y maduración de los cuerpos lúteos. Específicamente, la formación de los cuerpos lúteos ocurre durante la fase metaestro y su maduración se observa en la fase diestro del ciclo, con la consecuente producción de Pg. La etapa folicular comienza con la fase proestro, donde se produce un crecimiento rápido de los folículos y la degeneración de los cuerpos lúteos del ciclo anterior. Esta fase se caracteriza por un incremento en los niveles circulantes de E₂. Durante la fase estro tiene lugar la maduración de los folículos, con el consecuente incremento de los niveles de E₂ y la ovulación (Chaffin and Vandervoort, 2013; Stocco et al., 2007).

El control de la función ovárica es realizado por la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH). Estas hormonas son liberadas por la adenohipófisis en respuesta a la hormona hipotalámica liberadora de gonadotrofinas (GnRH, *del inglés: Gonadotropin Releasing Hormone*). A su vez, la secreción de las gonadotrofinas hipofisarias está modulada por la retroalimentación de las hormonas gonadales (Plant, 2012).

La FSH actúa sobre los folículos estimulando su desarrollo, con el consecuente incremento de la secreción de la hormona sexual femenina, el E₂. Niveles elevados de E₂ regulan negativamente la secreción de FSH, provocando la disminución de su concentración en plasma. El receptor de la FSH se encuentra exclusivamente en las células de la granulosa (Chaffin and Vandervoort, 2013). La LH actúa sobre el folículo maduro desencadenando la ovulación. Esta hormona también es responsable de la luteinización del folículo y la síntesis de Pg. La LH presenta un patrón de ciclicidad similar a la FSH, con un pico preovulatorio y una disminución sobre la fase lútea (metaestro y diestro). El receptor de la LH se encuentra presente en las células del cuerpo lúteo y en las células de la teca.

Como mencionamos anteriormente, la secreción de gonatotrofinas es regulada por la hormona peptídica GnRH, sin embargo, la respuesta hipofisaria obedece también al ambiente estrogénico (Fig. 11). Durante la fase folicular (proestro), se observa un incremento preovulatorio en los niveles de E₂ y prolactina. El aumento de E₂ induce la secreción hipotalámica de GnRH, la cual induce la secreción hipofisaria de LH y FSH. El incremento de los niveles de FSH constituye la señal que dispara la maduración folicular y la entrada en fase estro. El ingreso en la etapa lútea, denominado metaestro, coincide con un aumento de los niveles de Pg sintetizada por los cuerpos lúteos (Walmer et al., 1992). Por último, los animales ingresan a la fase diestro, donde la regresión del cuerpo lúteo conduce a una disminución en los niveles de Pg (Fig. 11) (Rudolph et al., 2012; Stocco et al., 2007).

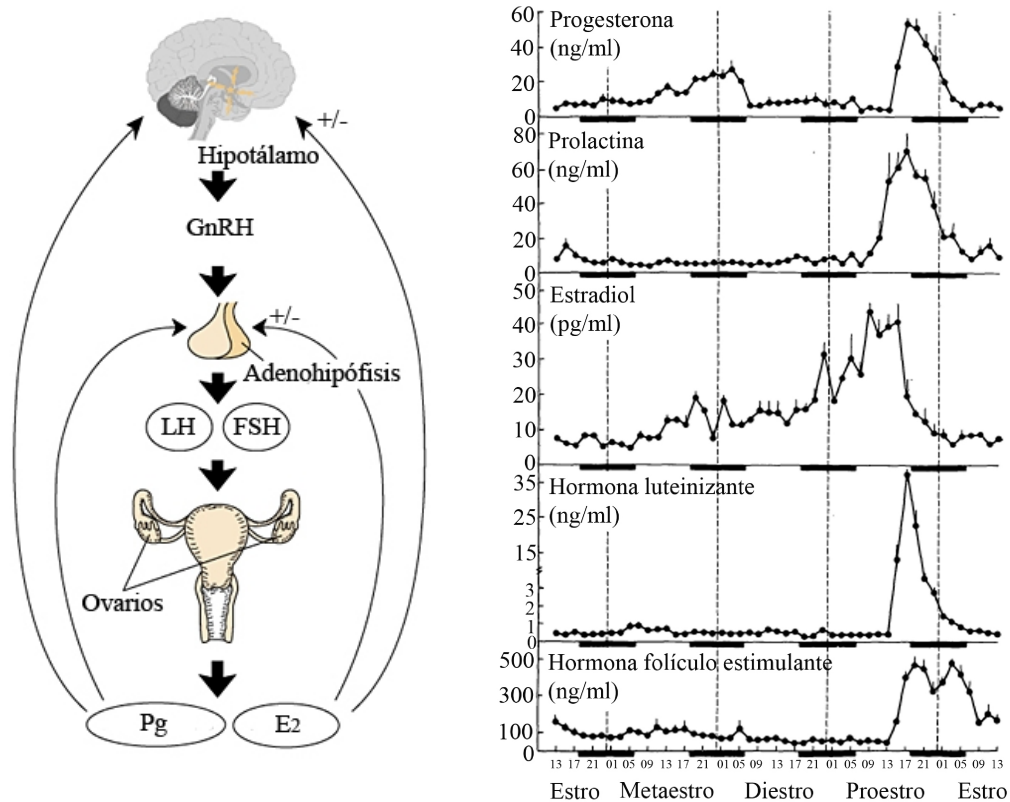


Figura 11. Regulación de la esteroidogénesis y niveles hormonales durante el ciclo estral de la ratona. A la izquierda, se esquematizan los diferentes niveles de regulación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. A la derecha, se muestran los niveles de progesterona, prolactina, estradiol, hormona luteinizante y hormona foliculoestimulante en las diferentes fases del ciclo estral. Los números sobre el eje x representan distintos momentos del día, considerando 24 horas de reloj. Las barras en negro sobre el mismo eje representan el período de oscuridad cada 24 horas. Las líneas verticales punteadas señalan la medianoche. Adaptada de Smith et al., 1975.

Cáncer de mama

Epidemiología

Como mencionamos anteriormente, el cáncer constituye un problema de primer orden en la salud a nivel mundial. El cáncer de mama es el cáncer más frecuentemente

diagnosticado y la principal causa de muerte por cáncer entre las mujeres. En el año 2008, el cáncer de mama representó el 23 % (1,38 millones) del total de casos de cáncer y el 14 % de las muertes por cáncer en mujeres (Jemal et al., 2011). De acuerdo al último informe de la IARC, la incidencia por cáncer de mama se elevó respecto a los datos obtenidos en 2008, llegando a representar el 25,1 % de los casos de cáncer en mujeres en el año 2012 (International Agency of Research on Cancer, 2014).

En la Argentina, en el año 2010, murieron 5.446 mujeres por cáncer de mama, lo cual representa el 20 % de las muertes ocurridas por cáncer en mujeres (World Health Organization and Pan American Health Organization, 2013). La mortalidad por cáncer de mama varía ampliamente según la región. Para los países del continente americano oscila entre un 9,7 por 100.000 para Ecuador y un 24,1 por 100.000 para Uruguay. La Argentina tiene la segunda tasa de mortalidad en el continente (21,8 por 100.000) (Viniegra et al., 2010).

Carcinogénesis mamaria

Más del 95 % de los cáncer de mama son de origen epitelial. En la figura 12 se esquematiza la evolución del cáncer de mama. Este proceso involucra la progresión a través de distintos estadios patológicos y clínicos bien definidos, comenzando con la hiperplasia ductal atípica (HDA), seguida por el carcinoma *in situ* (CIS), el carcinoma invasivo (CI), llegando finalmente al desarrollo de la enfermedad metastásica (MET) (Vargo-Gogola and Rosen, 2007). Como detallamos en la sección anterior, un ducto mamario normal está compuesto por el estroma, la membrana basal, una monocapa de células mioepiteliales y otra de células epiteliales luminales en contacto con la luz del ducto mamario (Fig. 12). Dentro del estroma se encuentran diferentes tipos celulares, incluyendo macrófagos, fibroblastos, miofibroblastos y células endoteliales. Durante la carcinogénesis, el estroma mamario sufre una serie de cambios que conllevan a su activación. En este proceso, se incrementa el número de fibroblastos, miofibroblastos y macrófagos del estroma glandular.

El CI se da como resultado de la pérdida de la membrana basal y de la monocapa de células mioepiteliales, que permite que las células tumorales de origen epitelial

invadan el estroma adyacente. Potencialmente estas células podrán migrar a órganos distantes, generando eventualmente metástasis.

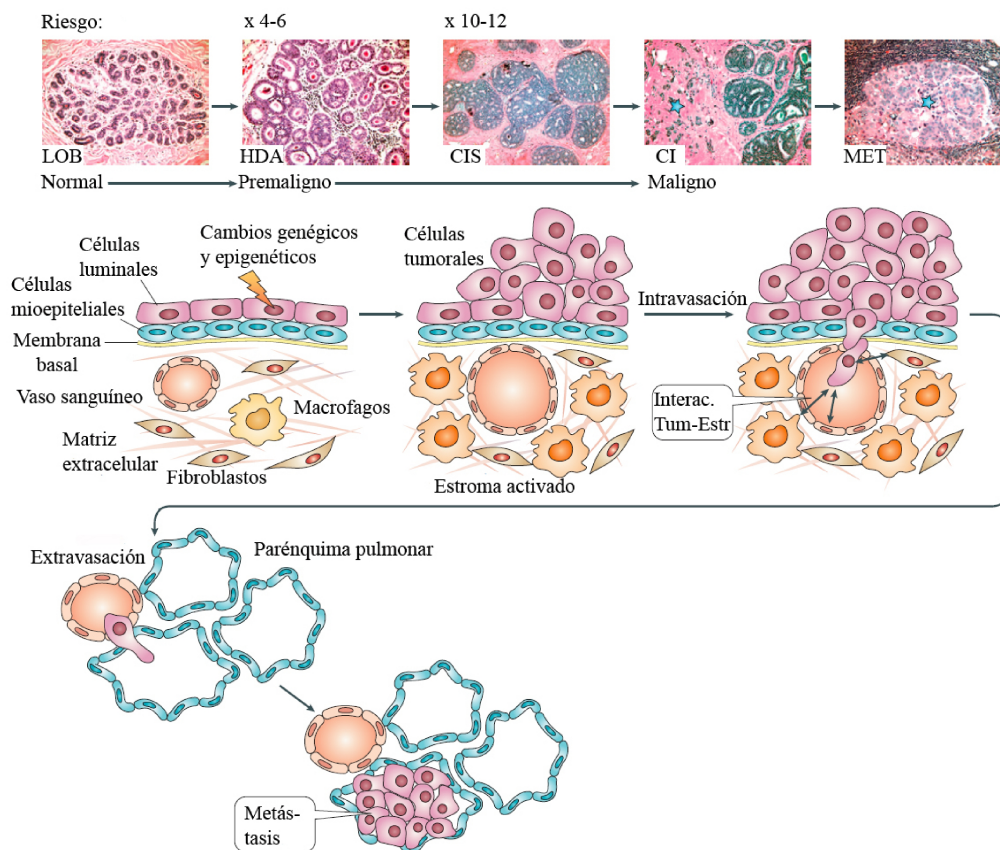


Figura 12. Modificaciones histológicas a lo largo del desarrollo de un carcinoma mamario invasivo. En la parte superior de la figura se muestran fotografías representativas de los diferentes estadios de evolución tumoral mamaria LOB: estructuras alveolares presentes en la mama normal. HDA: hiperplasia ductal atípica. CIS: carcinoma *in situ*. CI: carcinoma invasivo. MET: metástasis. Debajo, se esquematizan la evolución tumoral desde el tejido normal hasta una metástasis pulmonar, detallando los diferentes tipos celulares involucrados en el proceso. Adaptado de: Vargo-Gogola and Rosen, 2007.

La clasificación de los carcinomas mamarios se realiza en base a un conjunto de análisis que incluyen estudios histopatológicos, moleculares, genéticos, la patología clínica y los perfiles de expresión génica. Si bien los carcinomas mamarios se caracterizan por una histología heterogénea, la mayoría presentan un fenotipo dominante permitiendo su clasificación. En la clasificación histológica y molecular del

cáncer de mama se han descrito al menos cuatro fenotipos diferentes: 1) fenotipo luminal A en los cuales se incluyen tumores que expresan el RE , el RPg y el receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2); 2) fenotipo luminal B, en los cuales la expresión del RPg se encuentra disminuída respecto al fenotipo luminal A, presentando un mayor potencial metastásico; 3) el fenotipo HER2 incluye tumores que, sobreexpresan los receptores HER2; y 4) el fenotipo basal, que incluye a los tumores denominados triple negativos, los cuales no expresan ninguno de los receptores mencionados previamente (RE , RPg, HER2) (Braun et al., 2013).

Las diferencias moleculares entre estos 4 fenotipos son responsables, en parte, de las distintas respuestas clínicas frente a los tratamientos: en general los tumores del tipo basal tienen los peores pronósticos, mientras que los de tipo luminal presentan una mejor respuesta a la terapia (Sørli et al., 2001).

Los modelos animales son una herramienta fundamental en la investigación del cáncer. En los estudios sobre cáncer de mama, los roedores son ampliamente utilizados (Vargo-Gogola and Rosen, 2007). Adicionalmente, la alta susceptibilidad al desarrollo de neoplasias que presenta la glándula mamaria de estos animales, los convierte en un modelo único para el estudio del potencial carcinogénico de diferentes agentes genotóxicos y ambientales (I. H. Russo and Russo, 1996).

Los modelos de carcinogénesis mamaria inducidos químicamente son de particular interés ya que, en general, producen adenocarcinomas dependientes de hormonas. Uno de los carcinógenos químicos más utilizado en el desarrollo de cáncer de mama, es la N-nitroso-N-metilurea (NMU) (Ashrafi et al., 2012; Peña et al., 2012; J. Russo and Russo, 1996; Vargo-Gogola and Rosen, 2007). La NMU es un compuesto alquilante, sumamente inestable *in vivo*, que se descompone dando especies reactivas metilantes que actúan sobre los centros nucleofílicos del ADN, causando daño en el genoma celular (Gullino et al., 1975). Las características de los tumores inducidos en rata por este agente dependen de la dosis, la vía y el esquema de administración, la edad de los animales, la etapa del ciclo estral al momento de la inyección y la cepa de la rata utilizada (Ariazi et al., 2005; Rivera et al., 1994; Terracjini and Testa, 1970). La NMU puede ser administrada por vía endovenosa, subcutánea, intraperitoneal o directamente en la mama (Ashrafi et al., 2012; J. Russo and Russo, 1996).

La dosis de NMU más frecuentemente utilizada es de 50 mg/kg de peso corporal. Ésta puede ser administrada como una única dosis, dos dosis con intervalo de una semana o tres dosis separadas por un mes (Rivera et al., 1994; Terracjini and Testa, 1970). La susceptibilidad de la glándula mamaria de rata a la carcinogénesis por NMU es máxima cuando el agente químico es administrado entre los 50 y 55 días de vida, coincidentemente con el período en el cual la mama exhibe una alta densidad de estructuras proliferativas como los TEBs (I. H. Russo and Russo, 1996).

En nuestro laboratorio se desarrolló y caracterizó un modelo particular de tumor mamario inducido en ratas hembra de la cepa Sprague Dawley. La inducción tumoral se realizó por inyección intraperitoneal de tres dosis de 50 mg/kg de NMU a los 50, 80, y 110 días de vida de los animales (Rivera et al., 1994). Rivera y sus colaboradores demostraron que, cuando la primera dosis de NMU es inyectada durante la fase estro del ciclo reproductivo de las ratas, el 95 % de los animales desarrolla tumores mamarios de los cuales el 100 % presenta un patrón maligno (Rivera et al., 1994). Los tumores desarrollados fueron carcinomas ductales, la mayoría con apariencia adenomatosa. De acuerdo al patrón de crecimiento predominante, estos tumores se clasificaron como cribiformes (52,8 %), sólidos (30,6 %) o tipo comedogénicos o comedonianos (4,3 %).

Estudios realizados en este modelo experimental indicaron que el desarrollo y el crecimiento de los tumores se encuentran fuertemente regulados por hormonas y factores de crecimiento (Martín et al., 1998, 1997, 1996a). Entre las hormonas, el E₂ y la prolactina cumplen un papel esencial durante las etapas de iniciación y de promoción de la carcinogénesis (Martín et al., 1997). También se ha estudiado extensamente la importancia de diferentes factores de crecimiento y sus receptores específicos, como el factor de crecimiento epidérmico, el IGF-I y su receptor, la histamina y sus receptores, así como la expresión de receptores a estrógeno y prolactina (Actis et al., 2004; Cocca et al., 2005, 1998; Martín et al., 1998, 1997, 1996a; Núñez et al., 2006).

Factores de riesgo para cáncer de mama

A pesar de la gran incertidumbre que aún rodea al origen del cáncer, intensivos estudios epidemiológicos, clínicos y genéticos identifican ciertos rasgos biológicos y sociales como factores de riesgo asociados a esta enfermedad. Entre los principales factores de riesgo se encuentran: la historia familiar de cáncer de mama, ovario, o endometrio, la mayor susceptibilidad de sufrir mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2, la historia individual relacionada con patologías mamarias, la edad, el tabaquismo, el alcoholismo, la obesidad y diversos factores nutricionales. Adicionalmente, ciertas características endocrinológicas femeninas forman parte de los factores de riesgo para esta patología. Entre ellas se incluyen: la menarca temprana, la nuliparidad o el retraso en el nacimiento del primer hijo, la corta duración de la lactancia, la entrada tardía a la menopausia, el uso prolongado de anticonceptivos orales o de terapia de reemplazo hormonal (Emburch et al., 2008; Russo and Russo, 2008; Russo et al., 2000).

En los últimos 50 años, ha cobrado importancia el estudio de los contaminantes ambientales como factor de riesgo para el cáncer de mama. Durante las últimas dos décadas en particular, fuimos testigos de una creciente preocupación científica, del debate público y de la atención de diferentes medios de comunicación sobre los posibles efectos perjudiciales que la exposición a contaminantes ambientales podría tener sobre la salud humana.

Actualmente existen evidencias consistentes que involucran la exposición a los contaminantes ambientales como factores de riesgo para muchos tipos de cáncer, incluyendo al cáncer de mama, debido a sus propiedades mutagénicas y/o promotoras del crecimiento, a sus efectos co-carcinogénicos o a su acción como disruptores endócrinos (DEs) (Irigaray et al., 2007; Rich et al., 2012).

Disruptores endócrinos

Los DEs son compuestos que interfieren con la normal regulación del sistema endócrino. Si bien estos compuestos presentan múltiples efectos y mecanismos de

acción, pueden definirse de manera general como cualquier agente exógeno que interfiera con la síntesis, secreción, transporte, unión, acción o eliminación hormonal, modificando la homeostasis, la reproducción, el desarrollo y/o el comportamiento de los individuos expuestos (Vandenberg, 2014).

La Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) publicó una lista con más de 1.000 productos químicos comerciales que presentan o podrían presentar efectos sobre el sistema endócrino (FDA, 2010a). Este grupo de compuestos incluye sustancias naturales, como los fitoestrógenos presentes en muchos alimentos, y compuestos químicos sintéticos entre los que se encuentran solventes, lubricantes y sus subproductos, compuestos plásticos, productos farmacéuticos, metales pesados como el cadmio y el plomo, así como diferentes plaguicidas utilizados en la agricultura (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

Si bien existe una gran diversidad química entre los compuestos pertenecientes a esta familia, en términos generales los DEs a menudo contienen elementos halógenos, como cloro o bromo, y la presencia de un grupo fenólico, el cual se postula necesario para imitar los efectos de las hormonas esteroideas. Sin embargo, se han descrito moléculas muy sencillas, incluso metales simples como el cadmio, que presentan actividad estrogénica (Amutha and Subramanian, 2013; Ohtani et al., 2013)

Muchos de los trabajos que vinculan las exposiciones a DEs con efectos nocivos sobre la salud, provienen del estudio de exposiciones agudas accidentales en personas ocupacionalmente expuestas (Eskenazi, 2002; Eskenazi et al., 2003, 2002; Herbst et al., 1971; Kumar, 2011; Li et al., 2010; McLachlan, 2006, 2001; Palmer et al., 2006; Pesatori et al., 2003; Petrelli et al., 2003; Snijder et al., 2012; Warner et al., 2002). Estos estudios sugieren que la exposición ocupacional a los DEs es elevada y debe considerarse un motivo de preocupación para la salud de los trabajadores.

En contraste con esos resultados, en los últimos 20 años se han realizado una serie de investigaciones que demuestran que la mayoría de las exposiciones a DEs se producen a dosis bajas, debido a la presencia de residuos en los alimentos, en productos de cuidado personal, productos para el jardín y el envasado de alimentos. A menudo se argumenta que la presencia de una sustancia química en bajos niveles en el cuerpo no es

necesariamente motivo de preocupación. Los estudios realizados sobre la población general, revelan que los niveles de DEs en sangre y orina de los individuos son del orden de las partes por billón o incluso partes por trillón (Barr et al., 2010; Calafat et al., 2010, 2008; Lee et al., 2011; Woodruff et al., 2011).

Al analizar los datos epidemiológicos de los últimos años, se observa un incremento en la incidencia y prevalencia de diferentes enfermedades como el de cáncer de mama, próstata y testículo, la diabetes, la obesidad, el síndrome metabólico y la disminución de la fecundidad, las cuales se asocian a la exposición a DEs. Si bien este incremento podría deberse, en parte, a los avances en materia de diagnóstico, estudios realizados sobre individuos migrantes y sobre las diferentes incidencias en función del área geográfica, dan cuenta de la importancia de los DEs en el desarrollo de estas enfermedades (Boulogne et al., 2012; Fernandez et al., 2011; John et al., 2005; Nasser and Moulton, 2011; Stirbu et al., 2006; Yavari et al., 2006).

En el año 2009, la Sociedad Científica de Endocrinología publicó una extensa revisión que evidencia la contribución de los DEs al riesgo de desarrollar cáncer de mama (Diamanti-Kandarakis et al., 2009). Tradicionalmente, los efectos de los DEs sobre la carcinogénesis mamaria han sido relacionados con su acción como agonistas o antagonistas de los receptores de hormonas esteroideas, sin embargo, los mecanismos de acción de estos compuestos abarcan un espectro mucho más amplio (De Coster and van Larebeke, 2012).

Los DEs pueden interferir con la biosíntesis y el metabolismo de las hormonas esteroideas mediante la modificación de la actividad o la expresión de las enzimas involucradas en este proceso. Entre las enzimas más estudiadas se encuentran la aromatasas, la 5 α -reductasa, la 3 β -HSD y la StAR (Bonfeld-Jørgensen et al., 2007; Kim et al., 2011; Ye et al., 2014). Como mencionamos anteriormente, estas enzimas son responsables de la esteroidogénesis ovárica por lo cual, alteraciones en su actividad, podrían derivar en cambios de los niveles hormonales.

Las hormonas esteroideas son transportadas en los vasos sanguíneos unidas a diferentes proteínas. El E₂ y la T se encuentran en plasma unidos a la albúmina o a la proteína transportadora de hormonas sexuales denominada SHBG en un 70 %. Por su

parte, la Pg, circula adherida a la globulina transportadora de cortisol (CBG). Numerosos estudios demuestran que los DEs pueden afectar la unión de las hormonas a estas proteínas (Tollefsen, 2007; Waring et al., 2008).

Como mencionamos previamente, la hipófisis y el hipotálamo regulan la función ovárica mediante la secreción de hormonas específicas. Actualmente se ha demostrado que el sistema neuroendócrino también resulta afectado por los DEs (Foradori et al., 2011; Gore, 2010).

Debido a la gran influencia hormonal que sufre la glándula mamaria en su desarrollo, la exposición a DEs constituye uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de cáncer en este órgano.

Estrés oxidativo

Las células aeróbicas requieren la presencia de oxígeno (O_2) para llevar a cabo sus funciones metabólicas. El crecimiento acelerado de los tumores requiere un alto grado de irrigación sanguínea, necesario para proveer O_2 y nutrientes a las células proliferativas. Sin embargo, se encuentra ampliamente documentada la existencia de regiones con diferentes grados de hipoxia dentro de los tumores sólidos. Se denomina hipoxia a una reducción en los niveles de O_2 presentes en un determinado tejido. Numerosos estudios demuestran como la insuficiencia de O_2 conduce a un desbalance en el conjunto de reacciones de oxidación y reducción presentes en la célula, incrementando los niveles de especies reactivas del oxígeno (ERO) (Clanton, 2007; Desireddi et al., 2010; Liu et al., 2008).

Las ERO son compuestos generados por reducción parcial del O_2 . Dentro de este grupo se incluyen, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo (HO^{\cdot}) y los radicales alcoxilos (LO^{\cdot}), entre otros. El radical HO^{\cdot} es particularmente inestable, reaccionando rápida e inespecíficamente con la mayoría de las moléculas biológicas. El H_2O_2 , en cambio, presenta una reactividad menor y es capaz de difundir hacia células vecinas. Algunos de estos compuestos son especies

radicalarias, mientras que otras poseen todos sus electrones apareados. En este trabajo, utilizaremos el término ERO para referirnos de manera general a todas ellas.

La mayor producción de ERO se produce a través de la cadena respiratoria mitocondrial, en la cual se genera el radical superóxido a razón de un 2 % de la velocidad de consumo de O_2 . Este radical es disociado a pH fisiológico y por lo tanto, se encuentra cargado negativamente (anión superóxido: $O_2^{\cdot-}$). Los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones mitocondrial son los principales responsables de la producción de $O_2^{\cdot-}$ en esta organela (St-Pierre et al., 2002). Otra fuente endógena de producción de ERO son los peroxisomas. En estas organelas, la producción de ERO implica la participación de diferentes enzimas, como la Acil-CoA oxidasa y la xantina oxidasa que generan H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$ (Schrader and Fahimi, 2006). Adicionalmente, las ERO pueden producirse mediante la acción de la NAD(P)H oxidasa asociada a membrana, la citocromo c oxidasa y la xantina oxidasa citosólicas. Finalmente, en el retículo endoplasmático, se produce $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 mediante autooxidación de la flavoproteína NADPH-cit-P450 reductasa y el citocromo P450 (Boveris, 1998; Trachootham et al., 2008). Las ERO también pueden producirse como consecuencia de la exposición ambiental a ciertos compuestos químicos (Reuter et al., 2010). Entre los factores exógenos capaces de inducir la formación de ERO se incluyen los contaminantes ambientales, los productos farmacéuticos y las radiaciones ionizantes (Klaunig et al., 2010).

Además de las ERO, las células contienen otras especies químicas radicalarias provenientes del metabolismo del nitrógeno. El óxido nítrico (NO) es producido en diferentes compartimentos celulares a partir del aminoácido L-Arginina en una reacción catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) en la cual se consume NADPH. El NO participa en numerosos procesos fisiológicos como en la neurotransmisión, en la regulación de la presión arterial, la relajación de la musculatura lisa y la regulación inmunitaria. Si bien no se conocen reacciones en cadena iniciadas por el radical NO, este compuesto reacciona con el anión $O_2^{\cdot-}$ dando lugar a la formación de peroxinitrito ($ONOO^-$), un potente agente oxidante. La sobreproducción de especies reactivas del nitrógeno (ERN) se denomina estrés nitrosativo y es capaz de inducir la peroxidación lipídica, interferir con la señalización celular por nitración de tirosinas, oxidar grupos

tioles y guanosinas, degradar carbohidratos y de fragmentar el ADN (White et al., 2010).

La regulación del balance redox constituye un evento clave para la homeostasis celular. Para ello, las células presentan complejos sistemas antioxidantes constituidos por enzimas y compuestos no enzimáticos. Dentro del sistema antioxidante no enzimático se encuentra el glutatión, un péptido cuya capacidad antioxidante se debe a la presencia de un grupo tiol (-SH), el cual puede ser oxidado y reducido reversiblemente. En las células, el glutatión es mantenido en forma reducida por la enzima glutatión reductasa (GR). El GSH es considerado uno de los antioxidantes celulares más importantes, debido a su presencia en altas concentraciones (Cadenas, 1997). El sistema antioxidante enzimático está constituido por varias enzimas presentes en la célula. La enzima superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 y O_2 . En las células humanas, se encuentran tres isoformas diferentes de esta enzima: una isoforma mitocondrial (Mn SOD), una citosólica (CuZn SOD) y una isoforma extracelular (EC SOD) (Reuter et al., 2010). Una enzima importante para el metabolismo redox es la catalasa (CAT). Esta enzima se localiza a nivel de los peroxisomas en la mayoría de las células humanas, donde cataliza la conversión de H_2O_2 en agua y O_2 . Otra enzima involucrada en la eliminación del H_2O_2 es la glutatión peroxidasa (GPX). Estas enzimas, junto con los antioxidantes no enzimáticos, mantienen el balance redox necesario para el correcto funcionamiento de las células (Irshad and Chaudhuri, 2002). Adicionalmente, las enzimas antioxidantes y los antioxidantes no enzimáticos, juegan un papel central en la protección de las células frente a los incrementos de ERO producidos por los factores exógenos mencionados previamente (Fig. 13).

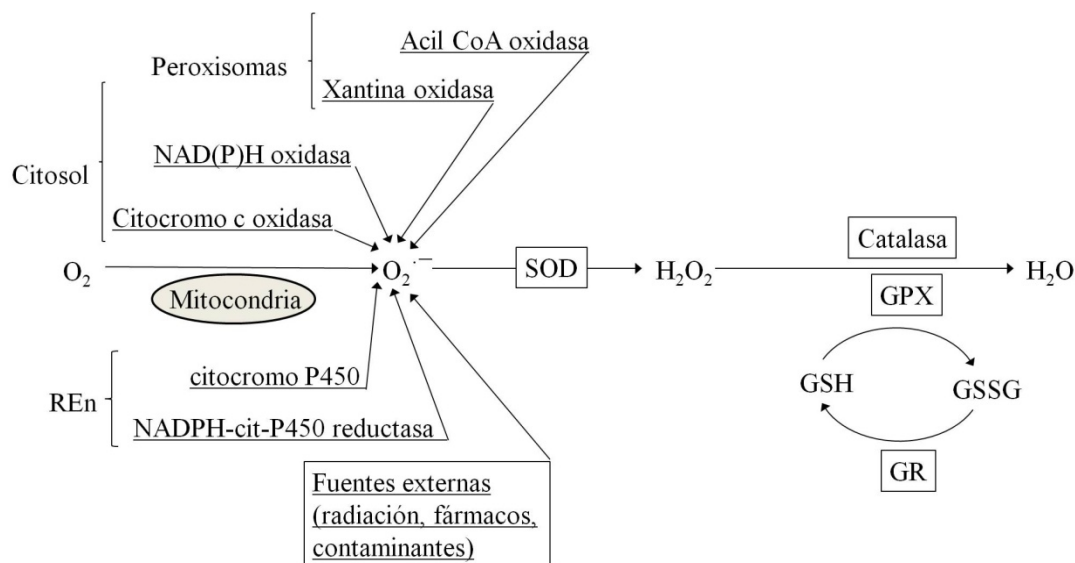


Figura 13. Principales vías de generación y metabolismo de ERO. SOD: superóxido dismutasa; GPX: glutatión peroxidasa; GR: glutatión reductasa; GSH: glutatión reducido; GSSG: glutatión oxidado; $O_2^{\cdot -}$: anión superóxido; H_2O_2 : peróxido de hidrógeno; REn: retículo endoplasmático. Modificado de: <http://zl.elsevier.es/imatges/14/14v28n08/grande/14v28n08-13078997tab02.gif>

Las ERO pueden provocar un amplio espectro de respuestas dependiendo de la magnitud de los niveles, la duración de la exposición, la localización y la naturaleza de las especies involucradas. Si bien bajos niveles de ERO son necesarios para la regulación de diferentes procesos biológicos, como la inducción de la proliferación y la supervivencia celular, un incremento en el contenido de estas especies químicas conduce al arresto de las células en alguna fase del ciclo o induce la diferenciación celular. Niveles aún mayores de ERO producen daño oxidativo de los componentes celulares. Un ejemplo de daño oxidativo, lo constituye la reacción de las ERO con los ácidos grasos insaturados celulares, mediante una reacción química en cadena conocida como peroxidación lipídica. En esta reacción se generan otras especies radicalarias como el radical HO^{\cdot} , radicales alcoxilos, hidroperóxidos y aldehídos, entre otros, lo cual altera la permeabilidad de las membranas biológicas. Otras macromoléculas afectadas por las ERO son los ácidos nucleicos y las proteínas. El daño a las proteínas deriva en la inhibición de enzimas, la desnaturalización y la degradación de las mismas. Los

radicales HO^{\cdot} y ONOO^{-} son las principales especies involucradas en este proceso. Finalmente, el daño oxidativo al ADN conlleva a la aparición de mutaciones en el mismo (Barrera, 2012). Un daño moderado en el ADN puede desencadenar la detención del ciclo celular e iniciar procesos de reparación del ADN. Por el contrario, un daño excesivo o el fracaso en la reparación del ADN pueden inducir la apoptosis celular.

Como mencionamos anteriormente, los tumores sólidos a menudo presentan regiones con baja presión de O_2 . Las células presentes en estas regiones, contienen alteraciones en el metabolismo, así como una mayor resistencia a la radiación y la quimioterapia. La condición de hipoxia celular no solo influye en la sensibilidad de las células tumorales frente a los tratamientos, sino que también se alteran otros aspectos de la progresión tumoral, incluyendo la angiogénesis, el aumento de potencial metastásico, la replicación del ADN y la reducción de la síntesis de proteínas. Adicionalmente, el desbalance redox intracelular modifica la expresión de un gran número de genes e interfiere en la regulación de importantes vías celulares de señalización (Bertout et al., 2008).

Vías de señalización moduladas por ERO

En los últimos años, se han descrito muchas vías de señalización celular reguladas por ERO (Afanas'ev, 2011), entre ellas la vía de las MAPKs (Torres, 2003; Wu, 2006; Yoon et al., 2002). Esta serie de proteínas presentes en las células eucariotas son activadas por diversas señales extracelulares. La activación de las MAPKs, tiene lugar luego de una serie de fosforilaciones consecutivas que se disparan tras la interacción de determinados ligando con sus receptores. Una vez activadas, las MAPKs regulan una amplia variedad de procesos a través de la fosforilación de diferentes proteínas blanco. Hasta el momento se han descrito cuatro proteínas MAPKs: las quinasas c-Jun N-terminal (JNK), las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2, *del inglés: Extracellular signal Regulated Kinases*), la quinasa p38 y la ERK5.

Tradicionalmente se ha considerado que la activación de las quinasas JNK y p38 conduce a la muerte celular, mientras que la activación de ERK1/2 deriva en un incremento de la proliferación de las células. Sin embargo, estas consideraciones han

sido revisadas en los últimos años. Un claro ejemplo lo constituye la activación de la proteína ERK1/2, cuya fosforilación conduce a eventos sumamente diversos como la proliferación, la diferenciación y la muerte celular (Mebratu and Tesfaigzi, 2010; Subramaniam and Unsicker, 2010).

En resumen, las ERO se encuentran íntimamente vinculadas con diversos procesos que subyacen al desarrollo neoplásico, ya sea a través del daño a diferentes macromoléculas, la regulación de factores de transcripción génicos o la interferencia en diferentes vías de transducción de señales. En este sentido, la condición de hipoxia tumoral ejercería una presión de selección, permitiendo la proliferación de los fenotipos más agresivos.

Objetivos e Hipótesis

Durante los últimos años, fuimos testigos de una creciente preocupación científica sobre los efectos perjudiciales ocasionados por la exposición crónica a diferentes contaminantes ambientales sobre la salud humana. Existen evidencias consistentes que postulan a estos compuestos como factores de riesgo para muchos tipos de cáncer, debido a sus propiedades mutagénicas, promotoras del crecimiento, a sus efectos co-carcinogénicos o a su acción como DEs. Dada la gran influencia hormonal que sufre la glándula mamaria en su desarrollo, la exposición a DEs constituye uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de cáncer en este órgano.

El CPF es un plaguicida organofosforado ampliamente utilizado en nuestro país y el mundo. Su principal mecanismo de acción se relaciona con la inhibición irreversible de la enzima AChE del sistema nervioso central y periférico. Sin embargo, un amplio número de investigaciones sugiere que este plaguicida podría alterar la fisiología de los organismos expuestos mediante otros mecanismos como el incremento en los niveles de especies oxidantes o su acción como DE.

Es por ello que el **objetivo general** de este trabajo consiste en estudiar diferentes mecanismos de acción del plaguicida CPF que puedan interferir en el desarrollo de la glándula mamaria y/o en la transformación maligna de este tejido, con especial interés en el estudio de sus efectos como DE y en la alteración del balance redox.

En base a los antecedentes expuestos en la introducción, se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

1. Estudiar la acción del CPF sobre la proliferación celular poniendo especial atención a su acción como DE.

1.1. Evaluar el efecto del CPF en la proliferación y muerte en líneas celulares derivadas de adenocarcinomas mamarios humanos dependientes e independientes de estrógeno para su crecimiento y los mecanismos involucrados en esos procesos.

1.2. Evaluar el efecto del CPF sobre el desarrollo de la glándula mamaria de rata, su entorno hormonal y la tumorigénesis en este tejido.

2. Estudiar el efecto del CPF sobre el estrés oxidativo.

2.1. Evaluar los efectos del CPF sobre los niveles de ERO y ERN, el sistema antioxidante y las vías de señalización involucradas, en líneas celulares derivadas de adenocarcinomas mamarios humanos.

2.2. Evaluar el efecto del CPF sobre el sistema antioxidante y el daño oxidativo en la glándula mamaria de rata.

Nuestra **hipótesis** de trabajo plantea que la exposición al plaguicida organofosforado CPF podría presentar efectos sobre el desarrollo de la glándula mamaria y actuar como factor de riesgo para la carcinogénesis en este tejido mediante su acción como DE y/o alteraciones en el balance redox celular.

Materiales y Métodos

ESTUDIOS EN LÍNEAS CELULARES

Características de las líneas celulares

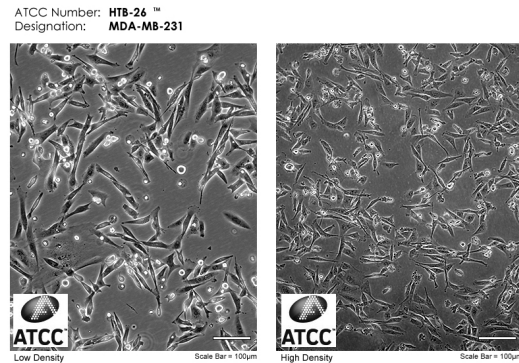
MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™)

Organismo de origen: *Homo sapiens*.

Enfermedad: Adenocarcinoma mamario.

Morfología: epitelial.

Propiedades de crecimiento: adherente.



La línea celular MDA-MB-231 (ATCC: HTB-26) es una línea tumoral derivada de una metástasis (efusión pleural) de un adenocarcinoma mamario. Es una línea celular aneuploide y tumorigénica en ratones *nude*, que induce tumores poco diferenciados. No expresa el RE ni el RPg. Expresa bajos niveles del receptor HER2. Se obtuvo de un paciente de sexo femenino de 51 años de edad (American Type Culture Collection, 2014a; Cailleau et al., 1978; Soto-Cerrato et al., 2004).

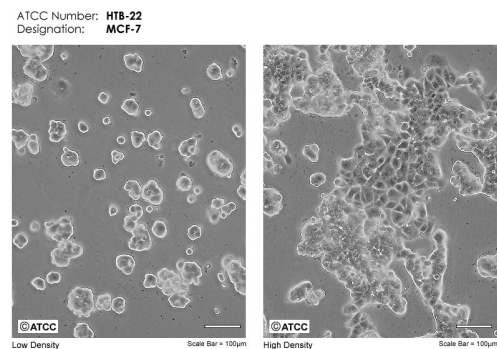
MCF-7 (ATCC® HTB-22™)

Organismo de origen: *Homo sapiens*.

Enfermedad: Adenocarcinoma mamario.

Morfología: epitelial.

Propiedades de crecimiento: adherente.



La línea tumoral MCF-7 (ATCC: HTB-22) deriva de una metástasis (efusión pleural) de un adenocarcinoma mamario. Es una línea celular aneuploide, expresa el RE y presenta varias características del epitelio mamario diferenciado. Se obtuvo de un paciente de sexo femenino de 69 años de edad (American Type Culture Collection, 2014b; Soule et al., 1973).

Cultivo celular

Las líneas celulares de carcinoma mamario humano se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10 %, glutamina 0,03 %, fungizona 0,001 % y gentamicina 0,004 % (Gibco BRL, EE.UU.). Se mantuvieron en estufa de cultivo a 37 °C en atmósfera humidificada con 5 % de CO₂.

Las células se subcultivaron semanalmente, para lo cual se aspiró el medio de cultivo, se lavó la monocapa con solución fisiológica (solución de NaCl 0,9 %) y se cosecharon las células con una solución de tripsina 0,25 % y ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 1 mM. El número de células necesarias para cada ensayo se evaluó por conteo en cámara de Neubauer y luego se realizó la siembra en placas plásticas mediante dilución adecuada de acuerdo al ensayo a realizar.

El medio de cultivo y las soluciones utilizadas se esterilizaron por filtración a través de membranas de 0,22 µm. El material de vidrio empleado en los cultivos se esterilizó por calor seco en estufa eléctrica a 180 °C durante 2 horas, mientras que el material de plástico no descartable se esterilizó en autoclave a 1 atmósfera de sobrepresión durante 20 minutos.

La totalidad de los procedimientos relacionados con la manipulación de las líneas celulares, la preparación de medios de cultivos y los tratamientos de las células se realizaron en condiciones de esterilidad trabajando en cabinas de seguridad biológica bajo flujo laminar (Tecnodepuraciones SRL, Argentina). El material plástico utilizado en cultivo celular se adquirió a Greiner Bio-One (GBO, Argentina).

Drogas utilizadas en los experimentos

Tratamiento con CPF: El plaguicida CPF (Chem Service, Inc., EE.UU.) fue disuelto en etanol absoluto (EtOH) obteniendo una solución 10 mM, la cual fue conservada a -20 °C. Los tratamientos fueron realizados mediante diluciones de la solución madre (CPF 10 mM) en medio RPMI sin rojo fenol, con 10 % de SFB previamente adsorbido con carbón activado al 5 %, glutamina 0,03 % p/v, fungizona 0,0001 % p/v y gentamicina 0,004 % p/v. Las concentraciones de CPF utilizadas fueron

0,05; 0,5; 5 y 50 μM . La concentración final del EtOH resultó como máximo de 0,5 %. Para el tratamiento control (CPF 0 μM), las células fueron cultivadas en presencia de EtOH 0,5 %.

Tratamiento con E₂: El E₂ (Sigma Chemical Company, EE.UU.) fue disuelto en EtOH obteniendo una solución 2,5 μM , la cual fue conservada a -20 °C. El tratamiento con E₂ fue utilizado como control positivo en los ensayos de proliferación realizados en la línea celular MCF-7 y como activador del RE en el ensayo realizado para seleccionar la concentración de ICI 182,780. En el primer caso, la concentración de E₂ utilizada fue 10 nM. En el segundo ensayo, se utilizaron concentraciones de 0,1; 1 y 10 nM. Todos los tratamientos fueron realizados mediante diluciones de la solución de E₂ 2,5 μM en medio RPMI sin rojo fenol, con 10 % de SFB previamente adsorbido con carbón activado al 5 %, glutamina 0,03 % p/v, fungizona 0,0001 % p/v y gentamicina 0,004 % p/v. La concentración final del EtOH resultó como máximo del 0,4 %.

Tratamiento con ICI 182,780: El inhibidor del RE ICI 182,780 (Tocris Bioscience, MO, EE.UU.) fue disuelto en EtOH en una concentración de 40 μM y conservado a -20 °C. Este inhibidor fue utilizado en concentración de 1 nM, preparada mediante la dilución de la solución madre (40 μM). La concentración final del EtOH resultó como máximo del 0,0025 %. En los experimentos en los que se utilizó una concentración diferente de este inhibidor, la misma fue explicitada en la figura correspondiente. En todos los casos, el ICI 182,780 fue agregado al medio de cultivo 15 minutos antes de adicionar el CPF o el E₂, según corresponda.

Tratamiento con H₂O₂: el H₂O₂ (MERK, Argentina) fue utilizado como control positivo en los ensayos de viabilidad celular y muerte celular por apoptosis y/o necrosis. La concentración de la solución madre fue 8 M, y la misma fue conservada a 4 °C en oscuridad. En todos los casos, la concentración final de H₂O₂ utilizada en los experimentos fue 5 μM .

Tratamiento con CAT: La enzima CAT (Sigma Chemical Company, EE.UU.) fue disuelta en solución fisiológica y utilizada en una concentración final de 30 U/ml. En los experimentos en los que se utilizó una concentración diferente de esta enzima, la misma fue explicitada en la figura correspondiente. En los ensayos de determinación de

ERO por citometría de flujo, la CAT fue adicionada a los cultivos una vez finalizado el tratamiento con CPF, y se mantuvo durante 15 minutos a 37 °C antes de iniciar la técnica de determinación de ERO. En los ensayos de proliferación celular y western blot, la CAT fue adicionada al cultivo en forma simultánea con el CPF y se mantuvo en el medio durante todo el período experimental.

Tratamiento con PD95059: El inhibidor de MEK1, PD98059 (Sigma Chemical Company, EE.UU.) fue disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) obteniendo una solución 10 mM, la cual fue conservada a -20 °C. Este inhibidor fue utilizado en concentración de 5 µM, preparada mediante dilución de la solución madre (10 mM) en medio RPMI sin rojo fenol, con 10 % de SFB previamente adsorbido con carbón activado al 5 %, glutamina 0,03 % p/v, fungizona 0,0001 % p/v y gentamicina 0,004 % p/v. La concentración final de DMSO en el cultivo resultó de 0,05 %. En todos los casos, el PD98059 fue agregado al medio de cultivo 15 minutos antes de adicionar el CPF. En el experimento realizado con el objetivo de seleccionar la concentración de PD98059, las concentraciones finales fueron 5, 10 y 30 µM. La concentración final de DMSO en este caso resultó como máximo de 0,3 %. Para el tratamiento control de este experimento (PD98059 0 µM), las células fueron cultivadas en presencia de DMSO 0,3 %.

Tratamiento con SB203580: El inhibidor de p38, SB203580 (Sigma Chemical Company, EE.UU.) fue disuelto en DMSO obteniendo una solución 20 mM, la cual fue conservada a -20 °C. Este inhibidor fue utilizado en concentración de 10 µM, preparada mediante dilución de la solución madre (20 mM). La concentración final de DMSO resultó de 0,05 %. El SB203580 fue agregado al medio de cultivo 15 minutos antes de adicionar el CPF. La concentración utilizada de SB203580 fue seleccionada en base a la bibliografía (Nikhil et al., 2014).

Ensayos de proliferación celular

Viabilidad celular. Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos (1 x 10³ células/pocillo) e incubadas durante 24 horas. Luego, las células fueron tratadas con CPF (0,05; 0,5; 5 y 50 µM) o H₂O₂ (5 µM) durante 24 horas en medio RPMI sin rojo fenol y 10 % de suero adsorbido. Posteriormente, el medio de cultivo fue removido y las células fueron incubadas con 0,1 mg/ml de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-

difeniltetrazol (MTT) (Promega, Reino Unido) durante 1 hora a 37 °C. Finalmente, se agregó 0,1 ml de DMSO a cada pocillo y se homogenizó con pipeta para disolver los cristales de formazán. La lectura de densidad óptica (DO) se realizó en un espectrofotómetro de placa a una longitud de onda de 600 nm. El porcentaje de viabilidad se obtuvo de la siguiente forma:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{DO células tratadas}}{\text{DO células control}}$$

Capacidad clonogénica. Para la evaluación de la proliferación celular por el método clonogénico (Franken et al., 2006), las células se sembraron en placas de 6 pocillos ($1,5 \times 10^3$ células/pocillo) en medio completo durante 24 horas. Posteriormente, las células fueron incubadas con los diferentes tratamientos durante 10 días. Los tratamientos se encuentran indicados en la descripción de cada ensayo e incluyeron:

- a- CPF (0,05; 0,5; 5 y 50 μM),
- b- E_2 (10 nM),
- c- E_2 (0,1; 1 y 10 nM) en presencia y ausencia de ICI 182,780 (0,1 y 1 nM),
- d- CPF (0,05; 0,5; 5 y 50 μM) en presencia y ausencia de ICI 182,780 (1 nM),
- e- CAT (10, 30 y 60 U/ml),
- f- CPF (0,05 y 50 μM) en presencia y ausencia de CAT 30 U/ml,
- g- PD98059 (5, 10 y 30 μM),
- h- CPF (0,05; 0,5; 5 y 50 μM) en presencia y ausencia de PD98059 (5 μM) o SB203580 (10 μM).

Finalmente, las células fueron fijadas con formaldehído 4 % disuelto en PBS (Na_2HPO_4 0,08 M, NaH_2PO_4 0,02 M, NaCl 9 %), y coloreadas con azul de toluidina 1 %. La capacidad clonogénica fue determinada contando las colonias formadas por 50 células o más. Los resultados se expresaron como porcentaje respecto del tratamiento control tratado con el/los vehículo/s correspondiente/s. Previamente se comprobó que la concentración final de EtOH en el medio de cultivo (0,5 %) no afectaba la proliferación en estas líneas celulares, aún si el mismo se encuentra combinado con DMSO 0,05%, lo cual representa la máxima concentración de solventes utilizada en estos experimentos.

Incorporación de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU). Las células se sembraron sobre cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro (Marienfeld, Alemania) colocados en placas de cultivo de 24 pocillos (5×10^4 células/pocillo) y se cultivaron durante 24 horas. A continuación, el medio de siembra fue reemplazado por RPMI sin rojo fenol con 0,5 % de SFB adsorbido, glutamina 0,03 % p/v, fungizona 0,0001 % p/v y gentamicina 0,004 % p/v y se mantuvieron en esta condición durante 18 horas. Una vez sincronizado el cultivo, las células se trataron durante 24 horas con CPF (0,05 y 50 μ M) o vehículo (EtOH 0,5 %). Posteriormente se adicionó BrdU (Sigma Chemical Company, EE.UU.) y el cultivo se mantuvo durante 2 horas más a 37 °C. BrdU es un compuesto análogo a la timidina que se incorpora al ADN de las células que se encuentran duplicando su material genético. Una vez transcurrida la incubación, el medio de cultivo fue removido, las células adheridas fueron lavadas 2 veces con PBS, finalmente se fijaron con formaldehído al 4 % disuelto en PBS. Para desnaturalizar el ADN en moléculas de simple cadena, las células se incubaron con HCl 3 N, Triton X-100 al 1 % en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego las células se lavaron con 1 ml de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0,1 M, Triton X-100 al 1 % en PBS pH 8.5 para neutralizar el ácido. Después de bloquear los sitios inespecíficos con una solución de SFB 5 % en PBS durante 1 hora, las células fueron incubadas durante 24 horas a 4°C con una dilución 1:100 del anticuerpo monoclonal anti-BrdU (Sigma Chemical Company, EE.UU.), la cual fue preparada en una solución de seroalbúmina bobina (BSA) al 1 % en PBS. Luego, las células se lavaron con PBS e incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente con una dilución 1:200 de un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado al fluoróforo FITC (Sigma Chemical Company, EE.UU.), la cual fue preparada en BSA al 1 % en PBS. Posteriormente, las células fueron incubadas con 4',6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI, 1:8000, Sigma Chemical Company, EE.UU.). Finalmente, después de tres lavados con PBS, se procedió al montaje. El mismo se llevó a cabo agregando 1 gota de líquido de montaje Fluor-SaveTM (Calbiochem, Alemania) sobre un portaobjeto y colocando el cubreobjeto con las células adheridas sobre la misma. La visualización se realizó por microscopía de epifluorescencia utilizando un microscopio Olympus BX50 (Center Valley, PA, EE.UU.). Las fotografías fueron adquiridas utilizando una cámara digital (Silver Spring, EE.UU.) acoplada al microscopio. Para cada determinación, se evaluaron al menos 1000 núcleos. El porcentaje de células en proliferación en cada campo fotografiado se determinó según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ células en proliferación} = \frac{N^{\circ} \text{ de células positivas para BrdU}}{N^{\circ} \text{ de células teñidas con DAPI}} \times 100$$

El control negativo se realizó reemplazando al anticuerpo primario específico por PBS.

Análisis del ciclo celular. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos (1,5 x 10⁵ células/pocillo) y se cultivaron por 24 horas para permitir su adhesión a la placa. A continuación, el medio de siembra fue reemplazado por RPMI sin rojo fenol con 0,5 % de SFB adsorbido, glutamina 0,03 % p/v, fungizona 0,0001 % p/v y gentamicina 0,004 % p/v y se mantuvieron en esta condición durante 18 horas con el fin de sincronizar el cultivo. Pasado ese tiempo, las células se trataron durante 24 horas con CPF (0,05; 0,5; 5 y 50 μM) o vehículo (EtOH 0,5 %) y la concentración de suero adsorbido (10 %) fue restablecida. Una vez transcurrida la incubación, las células fueron despegadas de la placa enzimáticamente y fijadas con metanol frío. Posteriormente, las células fueron centrifugadas durante 5 minutos a 1.500 x g e incubadas con ribonucleasa A (0,2 mg/ml disuelta en PBS) por 30 minutos a 37 °C. Finalmente, las células se colorearon con ioduro de propidio (IP) 50 μg/ml (Sigma Chemical Company, EE.UU.). La distribución del ciclo celular se determinó por citometría de flujo (citómetro CyFlow Pas III, Partec; Görlitz, Deutschland, Alemania). Un mínimo de 10.000 eventos se contaron para el análisis. Los datos se analizaron usando el programa Cyflogic v1.2.1 (Perttu Terho & © CyFlo Ltd, Turku, Finlandia).

Análisis de la expresión proteica

Cuantificación de los niveles de expresión proteica mediante western blot.

Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 10 cm de diámetro (1 x 10⁶ células/pocillo), cultivadas en medio completo durante 24 horas, luego se sometieron a los diferentes tratamientos:

- a- CPF (0,05 y 50 μM) o vehículo (EtOH 0,5 %) durante 15 minutos con el fin de evaluar la fosforilación del RE en la tirosina 537,
- b- CPF (0,05 y 50 μM) o vehículo (EtOH 0,5 %) durante 5, 30 y 60 minutos con el fin de evaluar la fosforilación de la quinasa Gsk-3 en la serina 9,

- c- CPF (0,05 y 50 μ M) o vehículo (EtOH 0,5 %) en presencia y ausencia de ICI 182,780 1 nM durante 15 minutos, con el fin de evaluar la fosforilación de la quinasa Gsk-3 en la serina 9,
- d- CPF (0,05 y 50 μ M) o vehículo (EtOH 0,5 %) durante 24 horas para evaluar la expresión de las proteínas reguladoras del ciclo celular ciclina D₁, ciclina E, p27 y el antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA, *del inglés, Proliferating Cell Nuclear Antigen*),
- e- CPF (0,05, 0,5, 5 y 50 μ M) o vehículo (EtOH 0,5 %) durante 24 horas para evaluar la expresión de las proteínas CAT y CuZn SOD,
- f- CPF (0,05 y 50 μ M) o vehículo (EtOH 0,5 %) durante 24 horas para evaluar la nitración de proteínas,
- g- CPF (0,05 y 50 μ M) o vehículo (EtOH 0,5 %) durante 5 y 15 minutos con el fin de evaluar la fosforilación de la proteína p38,
- h- CPF (0,05 y 50 μ M) o vehículo (EtOH 0,5 %) durante 5, 15 y 60 minutos con el fin de evaluar la fosforilación de la quinasa ERK1/2.

En todos los casos, excepto en la determinación de CAT, CuZn SOD y la nitración proteica, las células fueron previamente cultivadas durante 18 horas en medio RPMI sin rojo fenol con 0,5 % de SFB adsorbido, glutamina 0,03 % p/v, fungizona 0,0001 % p/v y gentamicina 0,004 % p/v con el fin de sincronizar el cultivo.

Una vez realizados los tratamientos, las células fueron lavadas dos veces con PBS y despegadas de la placa mecánicamente y lisadas utilizando la solución RIPA (Tris HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, NP-40 1 %, Deoxicolato de sodio 0,5 %, dodecil sulfato de sodio (SDS) 0,1 %, ácido etilenglicol tetraacético (EGTA) 1 mM, NaF 0,1 mM, leupeptina 0,02 mg/ml, Na₃VO₄ 1 mM y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, *del inglés phenylmethylsulfonyl fluoride*) 1 mM. Los lisados se mantuvieron en esta solución durante 20 minutos en baño de hielo. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 13.000 x g por 10 minutos y una alícuota del sobrenadante se utilizó para determinar la concentración de proteínas de acuerdo al ensayo de Bradford (Bradford, 1976). Al resto del lisado celular se le adicionó el volumen adecuado de solución de carga [Tris 100 mM pH: 6,8; SDS 1,7 %; DL-ditiotreitol (DTT) 1,5%; azul de bromofenol 0,02 % y glicerol 5%] y se hirvió durante 3 minutos. Entre 50 y 100 μ g

de proteínas fueron sometidos a la separación electroforética en poliacrilamida al 12 % con SDS (SDS-PAGE). Para la preparación de los geles se siguió el siguiente protocolo:

- a- Gel de separación (12 %): para 10 ml se adicionaron 3,3 ml de agua bidestilada, 4 ml de la mezcla de acrilamida/bis-acrilamida (acrilamida 29,2 % y N,N'-metilen-bis-acrilamida 0,8 %), 2,5 ml de Tris 1,5 M (pH 8), 0,1 ml de SDS 10 %, 0,1 ml de persulfato de amonio (PSA) 10% y 0,004 ml de N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED).
- b- Gel de acumulación (5 %): para 3 ml se adicionaron 2,1 ml de agua bidestilada, 0,5 ml de la mezcla de acrilamida/bis-acrilamida, 0,38 ml de Tris 1 M (pH 6,8), 0,03 ml de SDS 10 %, 0,03 ml de PSA 10 % y 0,003 ml de TEMED.

La electroforesis se llevó a cabo utilizando una solución reguladora a pH 8,3 conteniendo Tris-base (0,025 M), glicina (0,192 M) y SDS (0,1 %) con una intensidad de corriente de 45 mA por gel en baño de hielo. Finalizada la corrida electroforética, las proteínas se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF), con un tamaño de poro de 0,45 μ M, (Thermo Scientific, EE.UU.) las cuales fueron previamente sumergidas en metanol. Para la transferencia se utilizó el sistema húmedo (Hoefer, Pharmacia Biotech, EE.UU.). Tanto los geles como las membranas se equilibraron en solución reguladora de transferencia (Tris 0,025 M, Glicina 0,192 M, SDS 0,1 %, metanol 20 % v/v; pH: 8,3) durante 10 minutos. El gel y la membrana se colocaron entre 2 papeles Whatman 3 mm, el gel en el polo negativo y la membrana en el positivo. La transferencia se realizó a 400 mA durante 90 minutos en baño de hielo. Luego de la misma, las membranas se tiñeron con el colorante rojo Ponceau (Ponceau 0,5 %, ácido acético glacial 1% en agua bidestilada) durante 5 minutos para determinar si la transferencia fue completa y correcta y si la cantidad de proteínas era similar en las distintas calles. Después del lavado de las membranas, se realizó el bloqueo de los sitios inespecíficos de unión mediante la incubación de las mismas con BSA al 5 % preparada en PBS-T (PBS/Tween-20 0,05 %) durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación. A continuación, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios específicos diluidos en PBS-T. Los anticuerpos utilizados fueron: anti p-RE (1:500, Santa Cruz Biotechnology Inc., EE.UU.), anti T-RE (1:500, Santa Cruz Biotechnology Inc., EE.UU.), anti p-Gsk-3 (1:200, Cell Signaling Technology Inc., EE.UU.), anti

ciclina D₁ (1:200, Cell Signaling Technology Inc., EE.UU.), anti ciclina E (1:200, Cell Signaling Technology Inc. EE.UU.), anti p27 (1:200, Sigma Chemical Company, EE.UU.), anti PCNA (DakoCytomation, Dinamarca), anti Catalasa (1:1000, Sigma Chemical Company, EE.UU.), anti CuZn SOD (1:1000, Calbiochem, EE.UU.), anti p-p38 (1:200, Cell Signaling Technology Inc., EE.UU.), anti p-ERK1/2 (1:500, Cell Signaling Technology Inc., EE.UU.), anti ERK1/2 (1:1000, Abcam Inc., EE.UU.), anti nitrorosinas (1:1000; Santa Cruz Biotechnology Inc., EE.UU.), anti -actina (1:3000; Sigma Chemical Company, EE.UU.) o anti -tubulina (1:4000, Sigma Chemical Company, EE.UU.). Todos los anticuerpos utilizados fueron desarrollados en ratón o conejo, excepto el anti CuZn SOD, el cual fue desarrollado en oveja. Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios durante 24 horas a 4 °C. Posteriormente, fueron lavadas tres veces con PBS-T e incubadas con los anticuerpos secundarios específicos diluidos en PBS-T (anti IgG de ratón, conejo u oveja según corresponda), los cuales se encuentran conjugados con peroxidasa de rábano (1:2500; Sigma Chemical Company, EE.UU.). Luego del lavado de las membranas, las bandas inmunorreactivas fueron detectadas por quimioluminiscencia mediante su incubación con una solución de luminol, ácido cumárico y H₂O₂ durante 1 minuto. A continuación, las membranas se expusieron frente a una película fotográfica (Agfa-Gevaert Argentina S.A., Argentina) durante 3-5 minutos y se revelaron. El análisis densitométrico se realizó usando el programa ImageJ 1.32J (NIH, EE.UU.). Los niveles de expresión de -actina o -tubulina (proteínas de expresión constitutiva) se utilizaron como control de carga. En los casos en los que se midió la fosforilación de una proteína, siempre que fue posible, los resultados se normalizaron respecto al contenido total de dichos antígenos (T-RE o ERK1/2 según corresponda). Para ello, los anticuerpos primarios fueron despegados de la membrana mediante su incubación en una solución conteniendo Tris 0,063 M, -mercaptoetanol 0,1 M, SDS 2 % y cuyo pH fue de 6,7. En esta solución, se realizaron dos incubaciones de 15 minutos a 60 °C en agitación constante. Seguidamente, las membranas fueron nuevamente bloqueadas e incubadas con los anticuerpos específicos. En caso de no contar con el anticuerpo adecuado, se utilizó -actina o -tubulina como control de carga.

Determinación de la localización intracelular de proteínas mediante inmunofluorescencia. Para la detección de la expresión de las proteínas -catenina y -tubulina, las células fueron sembradas sobre cubreobjetos circulares de 12 mm de

diámetro (Marienfeld, Alemania) colocados en placas de cultivo de 24 pocillos (6×10^4 células/pocillo), y cultivadas durante 24 horas para permitir su adhesión a los vidrios. A continuación, las células fueron expuestas a los siguientes tratamientos:

- a- CPF (0,05 y 50 μM) durante 1 hora, para la determinación de la localización intracelular de β -catenina,
- b- CPF (0,05 y 50 μM) durante 24 horas, para la observación del citoesqueleto de tubulina.

Una vez finalizado el tratamiento, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con metanol a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 minutos. Tras la fijación, se realizó en forma simultánea el bloqueo y la permeabilización celular utilizando una solución de BSA 5 % y Tritón X-100 0,1 % en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente, las células se incubaron durante 24 horas a $4\text{ }^\circ\text{C}$ con el anticuerpo primario específico: anti β -catenina (1:500, InvitrogenTM, EE.UU.) o anti β -tubulina (1:1000). Las diluciones de los anticuerpos fueron realizadas en solución de BSA 1 % y Tritón X-100 0,1% en PBS. Ambos anticuerpos fueron realizados en ratón. Una vez finalizada esta incubación las células se incubaron con una dilución 1:200 de un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado al fluoróforo FITC (Sigma Chemical Company, EE.UU.), la cual fue preparada en BSA al 1 % en PBS. En el caso de la determinación de β -tubulina, las células fueron posteriormente incubadas con DAPI (1:8000, Sigma Chemical Company, EE.UU.). Finalmente, luego de tres lavados con PBS, se procedió al montaje. El mismo se llevó a cabo agregando 1 gota de líquido de montaje Fluor-SaveTM (Calbiochem, Alemania) sobre un portaobjeto y colocando el cubreobjeto con las células adheridas sobre la misma. La visualización se realizó por microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio Olympus BX50 (Center Valley, PA, EE.UU.). Las fotografías fueron adquiridas utilizando una cámara digital (Silver Spring, MD, USA) acoplada al microscopio. El control negativo se realizó reemplazando a los anticuerpos primarios específico por PBS durante el protocolo experimental, el cual no emitió señal.

Determinación de apoptosis en las líneas celulares

Ensayo de Anexina-V. En células normales, la fosfatidilserina se localiza en la superficie citoplasmática de la membrana celular. La inducción de apoptosis produce

alteraciones en la membrana plasmática que lleva a la exposición de fosfatidilserina en la superficie de las células. En presencia de calcio se produce una unión de alta afinidad entre la fosfatidilserina y la proteína Anexina-V, pudiéndose evidenciar las células apoptóticas de manera temprana, previo al daño nuclear, a la fragmentación del ADN y a la aparición de muchas moléculas asociadas a la apoptosis (Vermes et al., 1995). Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos ($1,5 \times 10^5$ células/pocillo) y cultivadas durante 24 horas en medio completo para permitir su adhesión a la placa. Posteriormente, las células fueron expuestas a CPF (0,05 y 50 μM) o vehículo (EtOH 0,5 %) durante 24 y 48 horas. Una vez transcurrido ese tiempo, las células fueron despegadas de la placa enzimáticamente, mediante su incubación con solución de tripsina en presencia de EDTA. Las células cosechadas y el sobrenadante de cultivo se centrifugaron 5 minutos a $1.500 \times g$ a 4 °C. El precipitado obtenido para cada tratamiento se lavó una vez en PBS y una vez con la solución amortiguadora Anexina-V (BD Biosciences, EE.UU.). Posteriormente, las células se resuspendieron en 200 μl de solución amortiguadora Anexina-V y se adicionaron 2,5 μl de Anexina-V-FITC (BD Biosciences, EE.UU.) y 2 μl del colorante vital IP (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en cada tubo. Los mismos se colocaron en hielo y mantuvieron en oscuridad. La intensidad de fluorescencia se determinó inmediatamente empleando un citómetro de flujo (citómetro CyFlow Pas III, Partec; Görlitz, Deutschland, Alemania). Un mínimo de 20.000 eventos se contaron para el análisis. Los datos se analizaron usando el programa Cyflogic v1.2.1 (Perttu Terho & © CyFlo Ltd, Turku, Finlandia). Como control positivo se utilizaron las células MDA-MB-231 tratadas con H_2O_2 5 μM durante 24 horas. El control negativo se realizó utilizando la misma línea celular y omitiendo el agregado de Anexina-V-FITC e IP durante el protocolo experimental.

Determinación de núcleos apoptóticos. La presencia de núcleos apoptóticos fue determinada mediante la tinción de los mismos con DAPI y su observación al microscopio de fluorescencia. Las células fueron sembradas sobre cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro (Marienfeld, Alemania) colocados en placas de cultivo de 24 pocillos (6×10^4 células/pocillo), y cultivadas durante 24 horas para permitir su adhesión a los vidrios. A continuación, las células fueron expuestas a CPF (0,05 y 50 μM) o vehículo (EtOH 0,5 %) durante 48 o 72 horas. Una vez finalizado el tratamiento, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con metanol a -20°C durante 10 minutos. Tras la fijación, se realizó en forma simultánea el bloqueo y la permeabilización celular

utilizando una solución de BSA 5 % y Tritón X-100 0,1% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente, las células se incubaron durante 14 minutos a temperatura ambiente en presencia de DAPI (1:8000, Sigma Chemical Company, EE.UU.). Luego de tres lavados con PBS, se procedió al montaje agregando 1 gota de líquido de montaje Fluor-Save™ (Calbiochem, Darmstadt, Alemania) sobre un portaobjeto y colocando el cubreobjeto con las células adheridas sobre la misma. La visualización se realizó por microscopía de epifluorescencia utilizando un microscopio Olympus BX50 (Center Valley, PA, EE.UU.). Las fotografías fueron adquiridas utilizando una cámara digital (Silver Spring, EE.UU.) acoplada al microscopio. El control negativo se realizó omitiendo el agregado de DAPI durante el protocolo experimental.

Determinación de especies oxidantes

Niveles intracelulares de ERO. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos (2×10^5 células/pocillo) y se cultivaron durante 24 horas. Una vez adheridas a la placa, las células fueron expuestas a los diferentes tratamientos, los cuales incluyeron:

- a- CPF (0,05; 0,5; 5 y 50 μM) o vehículo (EtOH 0,5 %) durante 24 horas,
- b- CPF (0,05; 0,5; 5 y 50 μM) o vehículo (EtOH 0,5 %) durante 24 horas y CAT 30 U/ml durante 15 minutos,
- c- CPF (0,05; 0,5; 5 y 50 μM) o vehículo (EtOH 0,5%) durante 10 minutos,
- d- Pretratamiento con PD98059 5 μM o vehículo DMSO (0,05 %) durante 15 minutos y tratamiento con CPF (50 μM) o vehículo (EtOH 0,5 %) durante 24 horas.

Una vez finalizado el tratamiento, el medio de cultivo fue eliminado, las células fueron lavadas con PBS y posteriormente incubadas con diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCF-2DA) 5 μM durante 30 minutos a 37 °C (Sigma Chemical Company, EE.UU.). Las células se lavaron y se despegaron de la placa enzimáticamente mediante la incubación con una solución de tripsina y EDTA durante 1 minuto. La inactivación de la tripsina se realizó por dilución, adicionando 1 ml de PBS. Finalmente, las células fueron centrifugadas durante 10 minutos a 1.500 x g y resuspendidas en 1 ml de PBS. El contenido intracelular de ERO se analizó mediante

citometría de flujo (citómetro CyFlow Pas III, Partec; Görlitz, Deutschland, Alemania). Un mínimo de 20.000 eventos se contaron para el análisis. Para evaluar el contenido de ERO, se analizó la media geométrica (MG) del histograma de intensidad de fluorescencia de cada tubo. Los resultados se expresan como porcentaje respecto a la MG correspondiente al tratamiento control. Los datos se analizaron usando el programa Cyflogic v1.2.1 (Perttu Terho & © CyFlo Ltd, Turku, Finlandia).

Determinación del anión $O_2^{\cdot-}$. La detección del anión $O_2^{\cdot-}$ fue evaluada por resonancia paramagnética electrónica (*EPR, del inglés Electron Paramagnetic Resonance*), utilizando 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO) como atrapador de espín (Peluffo et al., 2009; Rosen and Freeman, 1984). Se sembraron $1,5 \times 10^5$ células de la línea celular MDA-MB-231 en placas de 6 pocillos y se cultivaron durante 24 horas para permitir su adhesión a la placa. Posteriormente, las células fueron tratadas con CPF 50 μ M y DMPO 50 mM siguiendo diferentes protocolos experimentales:

- a- Las células fueron cultivadas en presencia de CPF 50 μ M y DMPO 50 mM durante 1 hora.
- b- Las células fueron cultivadas en presencia de CPF 50 μ M durante 24 horas, y el DMPO 50 mM fue agregado al cultivo 1 hora antes de finalizar la incubación.

Posteriormente, las células fueron separadas de la placa mecánicamente y resuspendidas en 100 μ l de PBS. El aducto formado entre el DMPO- $O_2^{\cdot-}$ es muy inestable y rápidamente se transforma en el aducto DMPO- HO^{\cdot} . La presencia del aducto DMPO- HO^{\cdot} fue evidenciada mediante el registro de su espectro de EPR característico. La obtención de los espectros se llevó a cabo a temperatura ambiente en un espectrómetro Bruker EMXplus (Karlsruhe, Alemania). Los parámetros del equipo fueron fijados en: centro de campo: 3515 gauss; amplitud de barrido: 100 gauss; potencia de microondas: 20 mW; frecuencia de microondas: 9,86 GHz; frecuencia de modulación: 50 kHz; amplitud de modulación: 0,5 G; ganancia del detector: 1×10^5 ; tiempo de conversión: 164 ms; constante de tiempo: 655 ms. Número de escaneos: 9. Como control positivo se utilizó la reacción de Fenton ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO^{\cdot} + OH^-$) generada a partir de H_2O_2 200 μ M, $FeSO_4$ 200 μ M y EDTA 200 μ M y solución amortiguadora de fosfato 50 mM pH 7,7, a la cual se adicionó DMPO 50 mM.

Niveles intracelulares de ERN. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos (2×10^5 células/pocillo) y se cultivaron durante 24 horas. Una vez adheridas a la placa, las células fueron expuestas a CPF (0,05; 0,5; 5 y 50 μM) o vehículo (EtOH 0,5%) durante 24 horas. Luego, el medio de cultivo fue eliminado y las células fueron lavadas con PBS. Las células se incubaron con diacetato de 4,5-diamino-fluoresceína (DAF-2DA) 5 μM durante 30 minutos a 37 °C (Sigma Chemical Company, EE.UU.). Las células se lavaron y se despegaron de la placa enzimáticamente mediante la incubación con una solución de tripsina y EDTA durante 1 minuto. La inactivación de la tripsina se realizó por dilución, adicionando 1 ml de PBS. Finalmente, las células fueron centrifugadas durante 10 minutos a 1.500 x g y resuspendidas en 1 ml de PBS. El contenido intracelular de ERN se analizó mediante citometría de flujo (citómetro CyFlow Pas III, Partec; Görlitz, Deutschland, Alemania). Un mínimo de 20.000 eventos se contaron para el análisis. Para evaluar el contenido de ERN, se analizó la media geométrica MG del histograma de intensidad de fluorescencia de cada tubo. Los resultados se expresan como porcentaje respecto a la MG correspondiente al tratamiento control. Los datos se analizaron usando el programa Cyflogic v1.2.1 (Perttu Terho & © CyFlo Ltd, Turku, Finlandia).

Análisis del sistema antioxidante celular

Análisis de la actividad de catalasa. Las células fueron sembradas en placas de 10 centímetros de diámetro (1×10^6 células/placa) y cultivadas durante 24 horas para permitir su adhesión. Posteriormente, las células fueron tratadas con las diferentes concentraciones de CPF (0,05; 0,5; 5 y 50 μM) o vehículo (EtOH 0,5 %) durante 24 horas. Una vez finalizado el tratamiento, las células fueron despegadas mecánicamente de la placa y resuspendidas en solución amortiguadora fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM, pH 7,8). Luego se sonicaron y la suspensiones se centrifugaron a 12.000 x g por 10 minutos a 4 °C. La actividad de catalasa se determinó midiendo la velocidad de descomposición de H_2O_2 a 240 nm por espectrofotometría. La mezcla de reacción fue conformada por: solución amortiguadora fosfato 50 mM (pH 7,8), H_2O_2 (Merck, Argentina) suficiente para alcanzar una absorbancia de 0,600 y 50 μl de la muestra cuya actividad de catalasa se deseaba evaluar. Los resultados se normalizaron de acuerdo al

contenido de proteínas determinado por el ensayo Bradford (Bradford, 1976). Una unidad (U) de catalasa se definió como la desaparición de 1 μmol de H_2O_2 /minuto ($= 43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Los blancos de reacción se prepararon reemplazando la muestra por la solución amortiguadora. Los resultados se expresan como porcentaje respecto a la actividad CAT de las muestras control o como U/mg de proteína.

Análisis de la actividad SOD. Las células fueron sembradas en placas de 10 centímetros de diámetro (1×10^6 células/placa) y cultivadas durante 24 horas para permitir su adhesión a la placa. Posteriormente, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de CPF (0,05; 0,5; 5 y 50 μM) o vehículo (EtOH 0,5 %). Luego de 24 horas de exposición al tóxico, las células fueron lisadas y resuspendidas en buffer TEA-DEA [25 mM trietanolamina (TEA) y 25 mM dietanolamina (DEA)]. Las muestras fueron centrifugadas a $12.000 \times g$ durante 30 minutos a 4°C . La determinación de la actividad SOD fue realizada de acuerdo al método publicado por Paoletti y sus colaboradores (Paoletti et al., 1986). El principio de este método se basa en la determinación de la velocidad de oxidación de NADH, mediada por radical superóxido $\text{O}_2^{\cdot-}$, la cual es inhibida proporcionalmente por la adición de SOD. La concentración de NADH fue monitoreada espectrofotométricamente a 340 nm. El $\text{O}_2^{\cdot-}$ fue generado por reacción química catalizada por β -mercaptoetanol. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 1 ml de buffer TEA-DEA 100 mM [100 mM TEA y 100 mM DEA, pH 7,4], conteniendo NADH 0,28 mM, MnCl_2 1,17 mM y EDTA 2,35 mM. A esta mezcla de reacción se le agregó β -mercaptoetanol 0,95 mM para comenzar la generación de $\text{O}_2^{\cdot-}$. La velocidad de oxidación del NADH fue reducida por el agregado de 20, 50 y 100 μl de muestra. Se define una unidad de SOD (U) como la cantidad de enzima que inhibe en un 50 % la velocidad de oxidación química de NADH por el radical $\text{O}_2^{\cdot-}$. Los datos se ajustan al siguiente modelo (Ferrari et al., 2008):

$$V_{ox} = \frac{V_{max}}{1 + \text{SOD}_{vol}/k_{0,5}}$$

Siendo V_{ox} : la velocidad de oxidación de NADH; SOD_{vol} : el volumen de muestra conteniendo actividad SOD que se agrega a la reacción. V_{max} : la máxima velocidad de

oxidación del NADH la cual se obtiene en ausencia de muestra; y $k_{0,5}$: corresponde al volumen de muestra que contiene 1 Unidad de SOD.

El cálculo de la actividad SOD de cada muestra se realizó graficando la inversa de la velocidad de oxidación del NADH en función del volumen de muestra presente en la cubeta. Los datos se ajustaron a una recta lineal, a partir de la cual se calculó la concentración de la actividad SOD de cada muestra como la inversa de $k_{0,5}$.

$$\frac{1}{V_{0x}} = \text{SOD}_{\text{vol}} \frac{1}{k_{0,5} V_{\text{max}}} + \frac{1}{V_{\text{max}}}$$

Los resultados se normalizaron de acuerdo al contenido de proteínas determinado por el ensayo Bradford (Bradford, 1976) y se expresaron como porcentaje respecto a la Actividad obtenida en las células control o como U/mg de proteína.

Contenido de GSH. El contenido de GSH se evaluó mediante la determinación de la concentración de los grupos -SH totales. El ensayo se basó en la capacidad de los grupos -SH de reducir al ácido 5,5'-ditiobis-nitrobenzoico (DTNB) (Sigma Chemical Company, EE.UU.). Las células fueron sembradas en placas de 10 centímetros de diámetro (1×10^6 células/placa) y cultivadas durante 24 horas para permitir su adhesión a las mismas. Posteriormente, las células fueron tratadas con CPF (0,05 y 50 μM) o vehículo (EtOH 0,5 %). Luego de 24 horas de exposición al tóxico, las células fueron lisadas en solución amortiguadora de fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 50 mM, pH 7,4). 20 μl de cada muestra fueron incubados con 880 μl de una solución conteniendo: solución amortiguadora fosfato 100 mM y EDTA 10 mM, pH 7,4. Se midió la absorbancia a 412 nm. Posteriormente, se incorporaron 100 μl de solución 6 mM de DTNB disuelto en bicarbonato de sodio 0,5% (p/v). La mezcla fue incubada durante 1 minuto a temperatura ambiente y la absorbancia fue medida nuevamente a 412 nm. El contenido de grupos tioles fue calculado sustrayendo a este valor, el valor de absorbancia obtenido antes de la incubación con DTNB y utilizando el coeficiente de extinción $\epsilon = 13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Para la realización del blanco de la reacción, el volumen de muestra adicionado a los tubos fue reemplazado por solución amortiguadora de reacción ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 100 mM y EDTA 10 mM, pH 7,4). Los resultados se normalizaron de acuerdo al

contenido de proteínas determinado por el ensayo Bradford (Bradford, 1976) y se expresaron como porcentaje respecto a la muestra control.

Análisis del daño oxidativo

Peroxidación lipídica. Los productos de la peroxidación lipídica fueron evaluados determinando las sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS). Las células fueron sembradas en placas de 10 centímetros de diámetro (1×10^6 células/placa) y cultivadas en presencia de CPF (0,05 y 50 μM) o vehículo (EtOH 0,5 %) durante 24 horas. Luego, las células fueron lisadas en solución amortiguadora fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 50 mM, pH 7,4). Una alícuota del lisado celular fue separada para la determinación de la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). 0,3 ml de cada muestra fue adicionada a 0,6 ml de la solución de reacción [15 % v/v ácido tricloroacético, 0,25 N ácido clorídrico y 0,375 % p/v de ácido 2-tiobarbitúrico] y calentadas durante 60 minutos a 90 °C. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 1.500 x g por 20 minutos a 4 °C. Como blanco se utilizó la mezcla de reacción hervida por una hora y centrifugada a 1.500 x g pero en ausencia de muestra. El complejo formado fue extraído con 3 ml de butanol y cuantificado espectrofluorométricamente ($\lambda_{\text{ex}}=515$ nm; $\lambda_{\text{em}}=555$ nm). Para la determinación de los μmoles de malondialdeído (MDA) presentes en cada muestra, se utilizó un estándar de MDA 14,6 μM preparado a partir de 1,1,3,3-tetrahidroxipropano (Litterio et al., 2012; Lotito and Fraga, 1998). En cada experimento, se adicionaron 12 tubos conteniendo diferentes volúmenes de esta solución (0, 5, 10, 20, 40 y 80 μl , cada tubo por duplicado), los cuales fueron procesados en forma idéntica a las muestras. Los valores obtenidos fueron utilizados para construir una recta de calibración, en la cual se interpolaron los resultados de las muestras incógnitas. Los resultados fueron expresados como porcentaje respecto al control.

Nitración de proteínas. El daño nitrosativo a proteínas fue determinado por western blot como se describió anteriormente.

ESTUDIOS EN ANIMALES

Modelo para el estudio del desarrollo de la glándula mamaria

Se emplearon ratas hembras de la cepa Sprague Dawley, obtenidas de la División de Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de la Plata, Argentina. Los animales se mantuvieron en grupos de entre 3 y 5 por jaula, con agua y comida *ad libitum*, a temperatura entre 22-23 °C, humedad cercana al 56 % y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas de duración. Los animales permanecieron durante los experimentos en el bioterio del Laboratorio de Metodología de Radioisótopos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. En todos los casos, las condiciones fueron las recomendadas por la guía para el cuidado y trabajo con animales de laboratorio (U.S. National Academy of Sciences, 2011). Los protocolos se aprobaron por el Comité de Ética para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA (Exp. N°0052712/13).

Protocolo de intoxicación de los animales

Los grupos experimentales de trabajo fueron conformados por ratas de 40 días de edad y peso promedio de 180 g, las cuales fueron segregadas aleatoriamente en tres grupos, iniciándose el tratamiento mediante la administración por vía oral (*v.o.*) de CPF o vehículo. El CPF (Chem Service, Inc., EE.UU.) fue disuelto en aceite de ricino en las concentraciones adecuadas y administrado diariamente a los animales.

Descripción:

- (1) Grupo Control (N=6): animales que recibieron aceite de ricino, *v.o.*;
- (2) Grupo CPF 0,01 mg/Kg/día (N=6): animales tratados con CPF 0,01 mg/Kg/día disuelto en aceite de ricino, *v.o.*;
- (3) Grupo CPF 1 mg/Kg/día (N=6): animales tratados con CPF 1 mg/kg/día disuelto en aceite de ricino, *v.o.*

La intoxicación se realizó durante 100 días. El sacrificio de los animales fue realizado cuando los mismos se encontraron en la fase estro del ciclo estral. Para ello, la secreción vaginal de las ratas pertenecientes a los distintos grupos fue colectada en el mismo horario durante los últimos 12 días de experimentación. Los exudados vaginales

fueron observados al microscopio óptico inmediatamente después de ser recolectados. La fase estro del ciclo fue reconocida por la ausencia de leucocitos y la presencia de células epiteliales anucleadas en el preparado. Los animales se sacrificaron por inhalación de CO₂ y se extrajeron muestras de glándula mamaria, hígado, sangre y ovario, las cuales fueron adecuadamente conservadas hasta su utilización en los estudios posteriores.

El protocolo experimental detallado previamente se repitió tres veces de manera independiente, utilizando 6 animales por grupo en cada uno de los casos.

Las dosis utilizadas para la intoxicación de los animales fueron seleccionadas de acuerdo a los límites internacionales vigentes al momento de iniciar esta investigación. Específicamente, utilizamos dos parámetros ampliamente aceptados para la evaluación del riesgo asociado a las exposiciones toxicológicas: la ingesta diaria admisible (IDA) y la máxima dosis a la cual no se observan efectos adversos (NOAEL, del inglés: *No Observed Adverse Effect Level*) (European Food Safety Authority, 2005). De esta manera, las dosis de CPF utilizadas en este trabajo, 0,01 y 1 mg/Kg/día, corresponden a la IDA y el NOAEL, respectivamente.

Parámetros fisiológicos

Análisis de toxicidad. Los animales fueron examinados diariamente para evaluar su estado físico general y observar la aparición de potenciales efectos adversos o tóxicos. Como señales de alarma se consideraron: modificaciones bruscas del peso, disminución del apetito, aparición de diarrea, alteraciones en el pelo, prurito, afectación motriz y cambios en el comportamiento de los roedores. Los controles se realizaron hasta que los animales fueron sacrificados.

Determinación de la actividad AChE. La Actividad AChE fue determinada en los glóbulos rojos de los animales luego de 100 días de intoxicación con CPF o vehículo. El paquete globular fue separado del plasma por centrifugación y lavado tres veces con solución fisiológica. 100 µl del paquete globular, tomados de la parte media del mismo, fueron colocados en un tubo de ensayo al cual se le adicionaron 2,4 ml de agua destilada con el fin de lisar los eritrocitos. La mezcla de reacción se preparó

adicionando 3 ml de solución de DTNB 0,25 mM preparada en solución amortiguadora fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50 mM pH: 7,2) y 20 μl del hemolizado. Esta mezcla fue incubada a 30 °C durante 3-4 minutos. Posteriormente, se adicionaron 100 μl de sustrato (Acetilcolina 150 mM), se homogeneizó y se determinó la absorbancia a 405 nm cada 1 minuto durante 5 minutos. La actividad colinesterasa fue determinada utilizando el coeficiente $\epsilon = 13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Los resultados fueron expresados como porcentaje respecto a los valores del grupo control.

Determinación de la actividad BChE. La Actividad BChE fue determinada en el plasma de los animales luego de 100 días de intoxicación con CPF o vehículo. El plasma fue separado del paquete globular por centrifugación. La mezcla de reacción se preparó adicionando 2,8 ml de solución de DTNB 0,25 mM preparada en solución amortiguadora fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 52 mM pH: 7,2) y 700 μl de butirilcolina 7 mM. Esta mezcla fue incubada a 25 °C durante 3-4 minutos. Posteriormente, se adicionaron 20 μl del plasma. Se homogeneizó y se determinó la absorbancia a 405 nm cada 30 segundos durante 1,5 minutos. La actividad colinesterasa fue determinada utilizando el coeficiente $\epsilon = 13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Los resultados fueron expresados como porcentaje respecto a los valores del grupo control.

Determinación del peso de los animales. La evolución del peso corporal de los animales fue determinada mediante la determinación de este parámetro en balanza de precisión una vez por semana durante las últimas 8 semanas de intoxicación. Adicionalmente, se determinó el peso de los animales luego de 100 días de intoxicación con el plaguicida o vehículo. Luego del sacrificio de los animales, el hígado fue removido y pesado en balanza de precisión (peso húmedo). Estos parámetros fueron expresados en gramos.

Evaluación de la funcionalidad hepática. Los estudios fueron realizados en el suero de los animales pertenecientes a los diferentes grupos experimentales, luego de 100 días de exposición a CPF (0,01 y 1 mg/Kg/día) o vehículo. Las determinaciones fueron realizadas en el Departamento de Bioquímica Clínica del Hospital de Clínicas "José de San Martín", siguiendo las siguientes metodologías:

La determinación de actividad alanina aminotransferasa (ALAT) y aspartato aminotransferasa (ASAT) fue realizada de acuerdo a las recomendaciones de la Federación Internacional de Química Clínica y Medicina de Laboratorio (IFCC, *del inglés: International Federation of Clinical Chemistry Laboratory Medicine*), mediante el método fotométrico a 340 nm. La concentración de colesterol fue determinada mediante el método de Colesterol Oxidasa/Peróxidasa (método enzimático colorimétrico a punto final), mediante el registro de la Absorbancia a 500 nm.

Estudios histológicos. Los diferentes tejidos (hígado y glándula mamaria) fueron fijados en formaldehído al 4 % disuelto en PBS y posteriormente embebidos en parafina. Se realizaron cortes de 5 μ m que se montaron sobre portaobjetos. Los cortes se colorearon con hematoxilina-eosina (HE). Esta técnica de coloración consta de los siguientes pasos: tinción con hematoxilina durante 2 minutos, tinción con eosina durante 2 minutos, incubación con EtOH 50 % durante 1 minuto, incubación con EtOH 70 % durante 1 minuto; incubación con EtOH 95 % durante 1 minuto; dos incubaciones con EtOH 100 % de 1 minuto cada una y dos incubaciones con xileno de 1 minuto cada una. Posteriormente, los cortes se observaron al microscopio óptico (Axiolab Karl Zeiss, Alemania) y se realizaron las siguientes determinaciones histológicas:

a- Los cortes de tejido hepático fueron examinados en busca de signos de toxicidad. Los parámetros evaluados fueron:

a₁- presencia o ausencia de áreas necróticas,

a₂- presencia o ausencia de focos hemorrágicos.

De cada corte se tomaron fotografías representativas con un aumento de 630X.

b- Sobre los cortes de tejido mamario se realizaron las siguientes determinaciones:

b₁- cuantificación del número de ductos: se tomaron 5 fotografías representativas de cada corte con un aumento de 50X. Posteriormente, se cuantificó el número de ductos en cada fotografía,

b₂- cuantificación del número de brotes alveolares: se tomaron 5 fotografías representativas del tejido con un aumento de 100X. Posteriormente, se cuantificó el número de brotes alveolares en cada fotografía,

b₃- los cortes fueron observados por un médico patólogo en busca de diferentes lesiones de la glándula mamaria. En cada caso, se determinó el porcentaje de estructuras en las que se observaba la lesión.

Análisis de expresión proteica

Western blot a partir de tejido mamario. El análisis de la expresión de diferentes proteínas fue realizado siguiendo el protocolo descrito anteriormente, con algunas modificaciones. El tejido mamario de los animales fue obtenido luego del sacrificio de las ratas y conservado a -80 °C hasta el momento de su utilización. Las muestras analizadas se obtuvieron por homogeneización de este tejido realizada en la solución RIPA (Tris HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, NP-40 1 %, Deoxicolato de sodio 0,5 %, SDS 0,1 %, EGTA 1 mM, NaF 0,1 mM, leupeptina 0,02 mg/ml, Na₃VO₄ 1 mM y PMSF 1 mM).

Inmunohistoquímica. Para el estudio inmunohistoquímico, los cortes se desparafinaron por medio de lavados con xileno (2 de 5 minutos) e hidrataron con sucesivos lavados con EtOH 100 %, 96 % y 70 % (2 de 5 minutos en cada caso). Posteriormente, los cortes se lavaron con agua bidestilada y calentaron en un horno a microondas en una solución reguladora de citrato de sodio (10 mM, pH 6.0) dos veces durante 2 minutos para realizar la exposición de los antígenos. Luego de realizar tres lavados con agua bidestilada, se bloqueó la actividad de la enzima peroxidasa endógena mediante una incubación con H₂O₂ al 3 % en agua bidestilada durante 20 minutos. Los cortes se lavaron con PBS (3 lavados de 10 minutos) y los sitios de unión inespecífica se bloquearon por incubación durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de BSA 1 %/leche descremada 1 %/Triton X-100 0,1% en PBS.

A continuación, los preparados se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en BSA 1 % en PBS: anti-PCNA (1:150, Dako Cytomation, Dinamarca); anti T-RE (1:100, Santa Cruz Biotechnology Inc., EE.UU.), anti RPg (1:100, Santa Cruz Biotechnology Inc., EE.UU.) en cámara húmeda a 4 °C por 24 horas. Luego de tres lavados con PBS durante 10 minutos cada uno, se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios anti IgG de conejo o ratón según corresponda, conjugados con peroxidasa de rábano, diluidos 1:100 en BSA 1 % en PBS. Finalmente los cortes se revelaron con 3-3'-diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Company, EE.UU.) y se colorearon con hematoxilina durante 1 minuto. Luego de tres lavados con agua, se procedió a la deshidratación de los cortes. Para ello, los cortes fueron incubados sucesivamente con EtOH 100 %, 96 % y 70 % (2 incubaciones de 5

minutos cada una) y con xileno (2 incubaciones de 5 minutos cada una). Finalmente, se colocó una gota de bálsamo de Canadá sobre cada corte histológico y se cubrió con un cubreobjetos procurando la eliminación completa de burbujas de aire entre ambos vidrios. Para controlar la especificidad de la marcación, cortes seriados de muestras positivas, se sometieron al mismo protocolo pero se reemplazó el anticuerpo primario por PBS.

Una vez finalizado el proceso, los cortes fueron observados en un microscopio óptico (Axiolab Karl Zeiss, Alemania) y se tomaron 5 fotografías representativas de cada uno con un aumento de 630X. En todos los casos, el porcentaje de células positivas fue determinado a doble ciego, mediante la cuantificación de los núcleos marcados para los diferentes antígenos y su relación con el número de núcleos totales presentes en el campo.

Determinación de los niveles de hormonas

Determinación de hormonas esteroideas. Los niveles séricos de E₂, Pg y T fueron determinados por radioinmunoensayo en el Laboratorio de Neuroendocrinología del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) (Fernández et al., 2010; Silveyra et al., 2007). Las hormonas esteroideas fueron extraídas previamente en éter sulfúrico a partir de los sueros de los animales expuestos de forma crónica a diferentes dosis de CPF o vehículo. La extracción consistió en la incubación de 750 µl de suero con 2 ml de éter sulfúrico y su agitación vigorosa durante 1 minuto. Posteriormente, los tubos fueron mantenidos a -80 °C durante 30 minutos con el fin de solidificar la fracción acuosa. La fracción etérea fue recuperada en un tubo de vidrio. Este procedimiento se repitió tres veces. El éter fue evaporado y las hormonas fueron conservadas a -20 °C hasta el momento de su medición. Para el ensayo, se utilizaron anticuerpos provistos por G.D. Niswender (Universidad del Estado de Colorado, Fort Collins, CO, EE.UU.). El E₂ y la Pg marcadas fueron obtenidas de Perkin-Elmer (Wellesley, MA, EE.UU.) y la T de New England Nuclear (Boston, MA, EE.UU.). La sensibilidad del ensayo fue 11,3 pg (E₂), 12,5 pg (T) y 500 pg (Pg). Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron 6,8 % y 11,7 % para E₂, 7,8 % y 12,3 % para T y 7,1 % y 12,15 % para la determinación de Pg, respectivamente.

Para la determinación de estas hormonas en los ovarios, los mismos fueron extraídos luego del sacrificio de los animales y conservados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su utilización. Un ovario de cada animal fue pesado y homogeneizado en solución amortiguadora fosfato de sodio en baño de hielo. El lisado obtenido fue sometido a la extracción con éter sulfúrico como se describió previamente.

Determinación de gonadotrofinas. La concentración sérica de LH y FSH fue determinada por radioinmunoensayo en el Laboratorio de Neuroendocrinología del IBYME (Silveyra et al., 2007). Se utilizaron juegos de reactivos proporcionados por el Instituto Nacional de Diabetes y Enfermedades Digestivas y Renales. La sensibilidad de cada ensayo fue $0,015\text{ ng/ml}$ y $0,1175\text{ ng/ml}$ para la determinación de LH y FSH respectivamente. Los coeficientes de variación intra e interensayo para la determinación de LH fueron $7,2\%$ y $11,4\%$ respectivamente y $8,0\%$ y $13,2\%$ para la determinación de FSH.

Análisis del sistema antioxidante en el tejido mamario

Evaluación de la actividad CAT en el tejido mamario. La actividad CAT fue determinada siguiendo el mismo protocolo experimental descrito previamente pero, en este caso, las muestras analizadas se obtuvieron por homogeneización del tejido mamario de los animales. Este tejido fue obtenido luego del sacrificio de los animales y conservado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su utilización. En ese momento, la homogeneización del tejido mamario fue realizada en una solución amortiguadora fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM , $\text{pH } 7,8$). Una alícuota de dichos extractos fue utilizada para la cuantificación de la concentración de proteínas por el método de Bradford. Los resultados se expresaron como U/mg de proteínas.

Determinación del contenido de GSH en el tejido mamario. El contenido de GSH fue determinado siguiendo el mismo protocolo experimental descrito previamente, introduciendo algunas modificaciones en la preparación de las muestras. Aproximadamente 700 mg del tejido mamario de los animales fue homogeneizado en 1 ml de HClO_4 $0,5\text{ N}$ en hielo. Los extractos obtenidos fueron centrifugados durante 10 minutos a $600 \times g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y adición Na_3PO_4 ($0,44\text{ M}$) hasta alcanzar $\text{pH } 7$. Luego, se

continuó según el protocolo experimental detallado previamente. Los resultados se expresaron como μmol de $-\text{SH}/\text{g}$ de tejido.

Evaluación de la peroxidación lipídica en el tejido mamario

Se determinó siguiendo el mismo protocolo experimental descrito previamente pero, en este caso, las muestras analizadas se obtuvieron por homogeneización del tejido mamario de los animales. Este tejido fue obtenido luego del sacrificio de los animales y conservado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su utilización. En ese momento, la homogeneización del tejido mamario fue realizada en una solución amortiguadora fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 50 mM, pH 7,8). Una alícuota de estos extractos fue utilizada para la cuantificación de la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). 0,3 ml de cada extracto fueron adicionados a 0,6 ml de la solución de reacción [15 % v/v ácido tricloroacético, 0,25 N ácido clorídrico y 0,375 % p/v de ácido 2-tiobarbitúrico] y calentados durante 60 minutos a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a $1.500 \times g$ por 20 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Como blanco se utilizó la mezcla de reacción hervida por una hora y centrifugada a $1.500 \times g$ pero en ausencia de muestra. Los moles de TBARS fueron determinados mediante la medición de la absorbancia de los sobrenadantes utilizando un espectrofotómetro (Genesys 10 UV, Thermo Scientific), a una longitud de onda de 532 nm (Asakawa and Matsushita, 1979) ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Los resultados fueron normalizados respecto a la concentración de proteínas de cada extracto y expresados como mmoles de TBARS/ μg de proteínas.

Modelo para el estudio de la carcinogénesis mamaria

Es conveniente que los trabajos que involucran el desarrollo, inducción o inyección de tumores y/o la realización de estudios toxicológicos utilizando animales de laboratorio, utilicen protocolos o recomendaciones para el tratamiento humanitario de los animales. Estos lineamientos se obtuvieron de guías de trabajo del Instituto Nacional de Salud (NIH) de los Estados Unidos, los cuales se encuentran en continua revisión (National Institutes of Health, 2013). Para evitar someter a los animales a dolor o sufrimiento innecesario, estos estudios requieren un seguimiento periódico sobre el

estado y la salud de los animales. Los ítems que se consideraron en el presente trabajo de tesis se encuentran resumidos en la **Tabla 1**.

Signos clínicos que constituyen puntos finales.	Edema, deshidratación, dermatitis progresiva, ulceración, deterioro neurológico, sangrado de cualquier tipo, cualquier impedimento en desarrollo de funciones básicas (alimentación, hidratación, movilidad, eliminación de orina y heces).
Signos adicionales en estudios neoplásicos, que constituyen puntos finales.	Crecimiento de la masa tumoral por encima del 10 % de la masa del animal. Se recomienda que el tamaño del tumor primario no debe superar los 40 mm en ningún sentido de medida (consideración para ratas). Si el tumor se encuentra ulcerado, necrótico o infectado. Si el tumor interfiere con la capacidad de los animales para comer y/o beber o deambular.
Observaciones clínicas utilizadas para evaluación toxicológica.	Apariencia general (postura corporal, pérdida de peso), alteraciones en piel y pelo (dermatitis, alopecia), afectación motriz, aparición de sangre en orina y/o heces, diarrea, salivación excesiva.
Número de animales y duración del estudio.	Deberá reducirse al mínimo el número de animales requeridos para la evaluación científica y estadística de los resultados.

Tabla 1: Criterios generales utilizados en modelos experimentales de cáncer mamario humano. Elaboración propia a partir de National Institutes of Health, 2013.

Inducción tumoral

Los tumores se indujeron químicamente en ratas Sprague Dawley mediante la administración por vía intraperitoneal (*i.p.*) de tres dosis de 50 mg/kg del carcinógeno químico NMU (Sigma Chemical Company, EE.UU.) a los 50, 80 y 110 días de vida de los animales (Cocca et al., 2005; Martín et al., 1998, 1997; Rivera et al., 1994). El carcinógeno se administró a los animales inmediatamente luego de ser disuelto en una concentración final de 10 mg/ml en solución fisiológica estéril. La pureza del carcinógeno fue garantizada mediante la determinación de su punto de fusión entre 24 y 48 horas antes a la disolución del mismo. En todos los casos, el punto de fusión obtenido fue de 122-124 °C (International Agency of Research on Cancer, 1978). El desarrollo de los tumores se controló por palpación de las cadenas mamarias, a partir de la administración de la segunda dosis del carcinógeno.

Protocolo de intoxicación de los animales

El tratamiento de los animales con CPF comenzó a los 40 días de edad, 10 días antes de la primera inyección de NMU. Los grupos experimentales de trabajo fueron conformados por 6 ratas, con un peso promedio de 180 g, las cuales fueron segregadas aleatoriamente en tres grupos, iniciándose el tratamiento mediante la administración de CPF (*v.o.*) o vehículo (*v.o.*). El CPF fue disuelto en aceite de ricino, en las concentraciones adecuadas y administrado diariamente a los animales. A los 50, 80 y 110 días de edad, los tres grupos experimentales recibieron las dosis de NMU.

Descripción:

- (1) Grupo Control + NMU (N=6): animales que recibieron aceite de ricino (*v.o.*) y tres dosis de NMU (*i.p.*);
- (2) Grupo CPF 0,01 mg/Kg/día + NMU (N=6): animales tratados con CPF 0,01 mg/Kg/día disuelto en aceite de ricino (*v.o.*) y tres dosis de NMU (*i.p.*);
- (3) Grupo CPF 1 mg/Kg/día + NMU (N=6): animales tratados con CPF 1 mg/kg/día disuelto en aceite de ricino (*v.o.*) y tres dosis de NMU (*i.p.*).

La intoxicación se realizó durante 140 días con el fin de que todos los animales desarrollen al menos un tumor. Al final del experimento los animales fueron sacrificados por inhalación de CO₂ y los tumores fueron extirpados con el fin de realizar estudios histoquímicos.

El protocolo experimental detallado previamente se repitió dos veces de manera independiente, utilizando 6 animales por grupo en cada uno de los casos.

Se determinaron los siguientes parámetros:

Período de latencia (PL): tiempo (días) transcurrido desde la administración de la primera dosis de NMU hasta la aparición del primer tumor en cada rata.

Incidencia tumoral (IT): porcentaje de animales que desarrollan al menos un tumor en cada grupo experimental.

Número de tumores por rata: número promedio de tumores desarrollados por rata en cada grupo experimental.

Crecimiento y tiempo de duplicación tumoral

Para evaluar el crecimiento tumoral los animales fueron revisados tres veces por semana y cada tumor fue medido utilizando un calibre para determinar dos diámetros perpendiculares de cada tumor. De estas medidas se obtuvo el diámetro promedio. El tamaño tumoral se calculó utilizando la fórmula del volumen de una esfera:

$$\text{Volumen tumoral} = \frac{4 \pi}{3} \times r^3$$

Con el fin de comparar el crecimiento tumoral de diferentes tumores, los volúmenes fueron relativizados en relación al volumen inicial de cada tumor, el cual fue fijado arbitrariamente en 1 unidad.

El tiempo de duplicación de cada tumor se calculó en base a la curva de volumen tumoral relativo en función del tiempo (Massari et al., 2013; Mehrara et al., 2007). Las cuales se ajustaron por un programa de regresión no lineal de acuerdo a la ecuación:

$$V_{(t)} = V_{(0)} e^{kt}$$

donde $V_{(0)}$ es el volumen tumoral relativo inicial, el cual fue fijado arbitrariamente y tubo un valor de 1 unidad para todos los tumores. El volumen tumoral (V) se incrementa exponencialmente en función del tiempo (t) con una tasa constante (k). El tiempo de duplicación tumoral (t_d), se calculó como:

$$t_d = \frac{\text{Ln } 2}{k}$$

Estudios histológicos e inmunohistoquímicos en los tumores

Los estudios histológicos e inmunohistoquímicos de los tumores fueron realizados siguiendo los mismos protocolos experimentales descritos previamente. Luego del sacrificio de los animales, cada tumor fue extraído y procesado para la realización de estos estudios. La caracterización histológica y la expresión de los

antígenos PCNA, RE y RPg fueron evaluadas en todos los tumores mamarios desarrollados. La clasificación de todos los tumores se realizó de acuerdo con los criterios publicados por la Escuela de Medicina de la Universidad de Stanford (Stanford University School of Medicine, 2006).

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El análisis de la significación estadística de los resultados obtenidos se realizó con el programa GraphPad Prism versión 5 (California, EE.UU.). Las evaluaciones se efectuaron por el análisis de la varianza (ANOVA) de uno o dos factores seguido del test de comparación de Dunnet, test de comparación múltiple de Tukey o test de Bonferroni. En los casos en que las varianzas no fueron homogéneas, se realizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido por el test de comparación múltiple de Dunn. Se consideraron estadísticamente significativas las diferencias que presentaron una $p < 0,05$ (ensayos bilaterales).

Resultados. *Primera parte*

Efectos del CPF sobre la proliferación celular en líneas derivadas de adenocarcinomas mamarios.

Efectos del CPF sobre la proliferación celular

Como mencionamos en la introducción de este trabajo, existen numerosas evidencias que alertan sobre los efectos tóxicos generados por la exposición a CPF en diferentes modelos experimentales. Si bien la mayoría de los efectos han sido relacionados con la inhibición de la actividad colinesterasa, otros involucran la interferencia en la síntesis de macromoléculas (Qiao et al., 2001), la interacción con receptores celulares (Howard and Pope, 2002), la modulación de diferentes vías de transducción de señales (Caughlan et al., 2004; Song et al., 1997) y la modificación del balance redox celular (Gupta et al., 2010). Adicionalmente, algunos reportes indican una posible acción estrogénica del CPF. En este sentido, Andersen y sus colaboradores estudiaron la interacción de veinticuatro plaguicidas con el RE y el receptor de andrógenos (RA) mediante ensayos de transactivación. En estos estudios, los investigadores observaron una débil respuesta estrogénica inducida por el CPF en los ensayos realizados (Andersen et al., 2002).

Debido a estos antecedentes, decidimos investigar el efecto del CPF sobre la proliferación celular, utilizando dos líneas celulares derivadas de adenocarcinomas mamarios humanos, una dependiente (MCF-7) y la otra independiente (MDA-MB-231) de estrógenos para su crecimiento.

Los resultados que se describen en este capítulo, corresponden a experimentos que tuvieron como objetivo el estudio de la viabilidad celular, la capacidad clonogénica, el tiempo de duplicación y la muerte celular luego de la exposición de las células a diferentes concentraciones de CPF. Adicionalmente, se analizó el efecto de este tóxico sobre el ciclo celular y las proteínas reguladoras del mismo, así como sobre las vías de señalización involucradas en estos efectos.

Efecto del CPF sobre la viabilidad celular

En primer lugar, se estudió el efecto de diferentes concentraciones de CPF sobre la viabilidad celular. La selección de las concentraciones de CPF utilizadas en los experimentos, se realizó en base a las concentraciones ambientales de este plaguicida. La viabilidad celular fue determinada mediante el ensayo de MTT. Este ensayo contempla la reducción metabólica del MTT, catalizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, que da lugar a la aparición de un compuesto azulado denominado formazán. Dado que la conversión ocurre en las células vivas, la cantidad de formazán producida se correlaciona directamente con el número de células viables. Este ensayo se realizó en ambas líneas celulares expuestas a diferentes concentraciones de CPF o vehículo durante 24 horas. Como se observa en la figura I.1, en la línea celular MCF-7 no se detectaron modificaciones significativas en la viabilidad celular con ninguna de las concentraciones del plaguicida utilizadas. En esta línea celular, la máxima concentración de CPF estudiada (50 μ M), condujo a una reducción del 15,2 % en la viabilidad celular respecto al tratamiento control, sin embargo, esta disminución no fue estadísticamente significativa. En la línea celular MDA-MB-231, la viabilidad de las células expuestas a CPF 50 μ M solo disminuyó en un 8,2 % (p:ns) respecto a las células expuestas al vehículo. Estos resultados indican que las concentraciones empleadas de CPF, no inducen una importante disminución de la viabilidad celular luego de 24 horas de exposición al tóxico. Como control positivo del experimento, las células fueron cultivadas en presencia de H₂O₂ (5 μ M) durante 24 horas. Como puede observarse, la adición de H₂O₂ redujo significativamente el porcentaje de células viables en ambas líneas celulares (30,6 % en las células MCF-7 y 31,5 % en la línea celular MDA-MB-231, p<0,05).

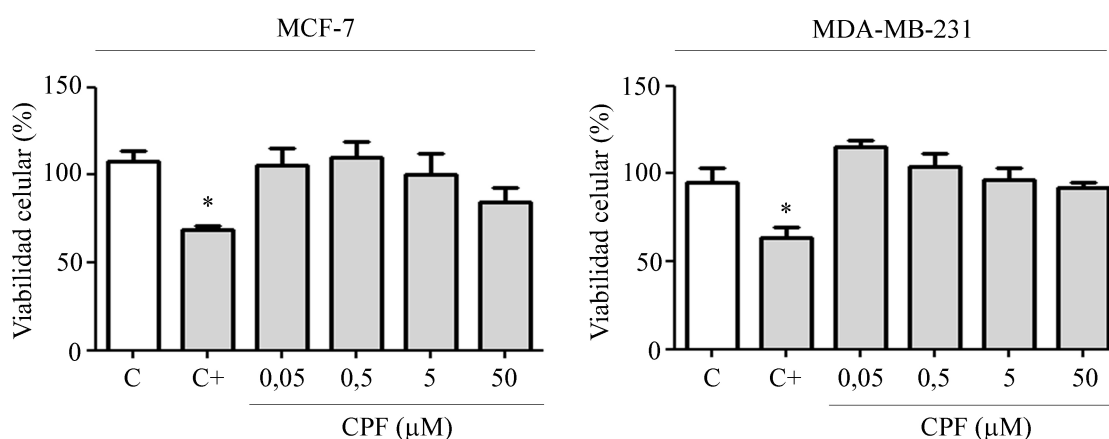


Figura I.1. Ensayo de viabilidad celular. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de CPF o vehículo (C) durante 24 horas. Como control positivo del experimento (C+), las células fueron expuestas a H₂O₂ (5 μM) por el mismo tiempo. La viabilidad celular fue determinada mediante el ensayo de MTT, midiendo la DO a 600 nm en un espectrofotómetro de placa, los resultados se expresan como porcentaje respecto del tratamiento control. Las barras representan la media ± EEM de dos experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado (*p<0,05. ANOVA de un factor y Test Dunnett a posteriori).

Efecto del CPF sobre la formación de colonias

Debido a que no observamos efectos sobre la viabilidad celular luego de 24 horas de exposición al CPF, decidimos investigar el efecto de exposiciones más prolongadas evaluando la capacidad clonogénica celular. Esta técnica es considerada una herramienta de gran utilidad debido a su bajo costo, reproducibilidad, sencillez, rapidez y sensibilidad (Franken et al., 2006; Kawada et al., 2002; Salmon et al., 1978). En este ensayo, las células se cultivan en presencia del tóxico durante 10 días, luego de los cuales se evalúa el número de colonias formadas por más de 50 células presentes en cada placa. Como se observa en la figura I.2, la exposición de las células a CPF 50 μM redujo la capacidad clonogénica en ambas líneas celulares. En las células MCF-7, esta reducción fue del 40 % (p<0,05) respecto al tratamiento control (EtOH 0,5%) mientras que en la línea celular MDA-MB-231 alcanzó el 56 % (p<0,001). Adicionalmente, en esta línea celular, la formación de colonias se encontró reducida utilizando CPF 5 μM

(33,3 %, $p<0,01$), 0,5 μM (28,6 %, $p<0,05$) y 0,05 μM (27,4 %, $p<0,05$) (Fig. I.2). Este experimento evidencia una acción tóxica del CPF sobre las células luego de una exposición prolongada, la cual no fue observada con el ensayo de MTT, tras 24 horas de exposición al tóxico.

Si bien el CPF 50 μM desencadenó un efecto citotóxico en ambas líneas celulares, concentraciones menores de este plaguicida condujeron a un incremento de la proliferación en la línea celular MCF-7. Como se muestra en la figura I.2, observamos un incremento del 46 % ($p<0,05$) en la capacidad de formar colonias al exponer a las células MCF-7 a CPF 0,05 μM . Como control positivo estas células fueron cultivadas en presencia de E_2 10 nM, el cual incrementó significativamente la capacidad clonogénica celular. Cabe destacar, que el efecto proliferativo del CPF solo fue observado en la línea celular MCF-7, la cual expresa el RE y responde a los estímulos estrogénicos para su crecimiento. Por el contrario, en la línea celular MDA-MB-231, la cual carece de ese receptor, el CPF no incrementó la proliferación en ninguna de las concentraciones evaluadas.

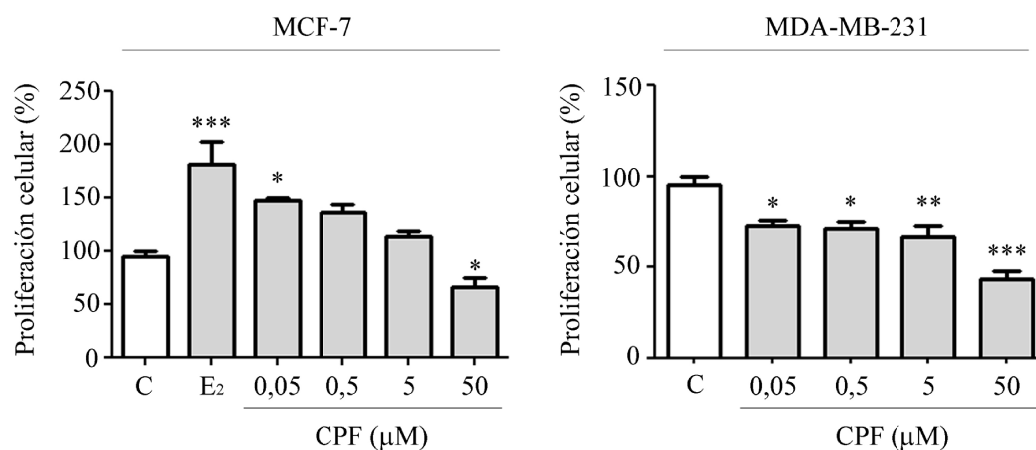


Figura I.2. Ensayo de proliferación celular por el método clonogénico. Las células fueron expuestas a concentraciones variables de CPF o vehículo (C) durante 10 días. En la línea celular MCF-7, se utilizó E_2 10 nM como control positivo del ensayo. En los gráficos se muestran los porcentajes de colonias formadas en ambas líneas celulares para cada concentración estudiada respecto al control. Las barras representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; ANOVA de un factor y Test Dunnett a posteriori).

Efecto sobre la incorporación de BrdU

Con el fin de completar los estudios sobre el efecto proliferativo observado en la línea celular MCF-7, evaluamos la incorporación de BrdU luego de 24 horas de exposición de ambas líneas celulares a diferentes concentraciones del CPF. La BrdU es una molécula análoga a la timidina, que se incorpora al genoma de las células que se encuentran duplicando su ADN. Las células fueron cultivadas en presencia de BrdU durante 2 horas a 37 °C y el porcentaje de células en proliferación fue determinado por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo monoclonal específico. En concordancia con los resultados observados previamente, el cultivo de las células MCF-7 en presencia de CPF 0,05 μ M produjo un aumento significativo en la proliferación celular. Como se muestra en la figura I.3, el porcentaje de células en activa síntesis de ADN se incrementó en un 58 % ($p < 0,01$) cuando las mismas fueron expuestas a CPF 0,05 μ M ($28,6 \pm 4,5$ %) respecto al control ($18,1 \pm 3,1$ %). Al evaluar una concentración mayor de CPF (50 μ M), no observamos modificaciones en el porcentaje de células en activa síntesis de ADN. Este resultado confirma los datos obtenidos mediante el ensayo de MTT, en el cual la viabilidad celular no fue alterada luego del cultivo de las células en presencia de CPF 50 μ M por 24 horas. Del mismo modo, tampoco observamos una reducción en la incorporación de BrdU en estas condiciones.

Por otra parte, en la línea celular MDA-MB-231, no observamos modificaciones en el porcentaje de células en proliferación con ninguna de las concentraciones de CPF estudiadas. Este resultado concuerda con los datos obtenidos mediante el ensayo clonogénico.

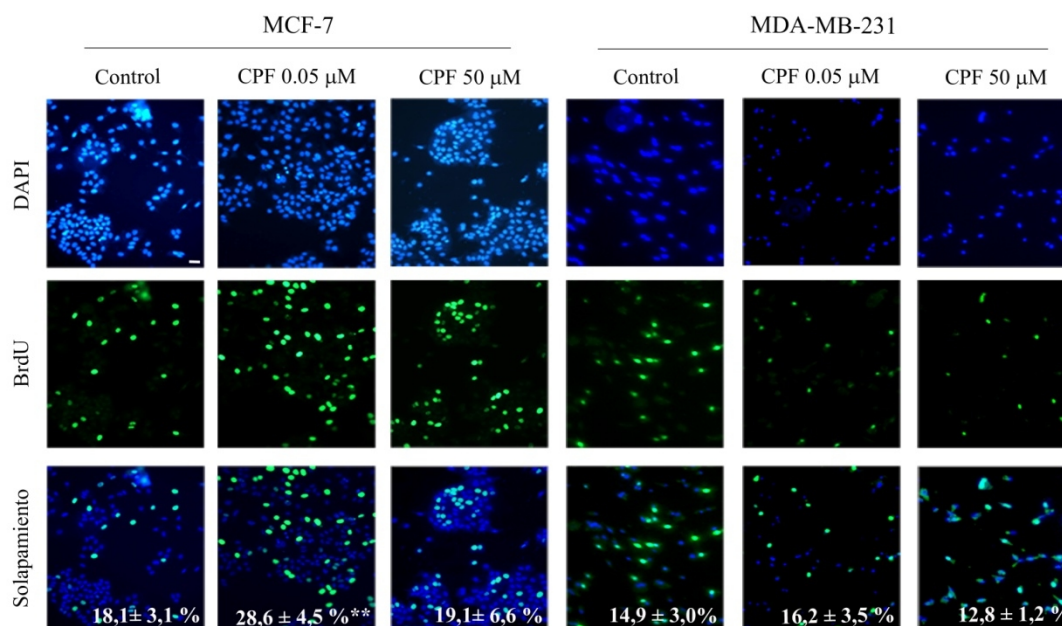


Figura I.3. Incorporación de BrdU. Las células fueron expuestas al CPF (0,05 y 50 μM) o al vehículo (control) durante 24 horas. El porcentaje de células en proliferación fue calculado como el número de núcleos positivos para BrdU (mostrados en color verde) en relación al número de núcleos totales teñidos con DAPI (mostrados en color azul). Para cada tratamiento se cuantificaron 5 campos al azar, fotografiados con un aumento de 200X. En la fila inferior se muestra la superposición de las fotografías y se detalla el porcentaje de células que incorporaron BrdU en cada tratamiento. Se muestra el resultado promedio ± EEM de dos experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado (**p<0,05. ANOVA de un factor y Test de Dunnett a posteriori). Barra: 20 μm.

Efectos del CPF sobre la vía estrogénica

Como se mencionó anteriormente, una gran variedad de compuestos químicos actúan como DEs estimulando la proliferación celular en tejidos hormono-dependientes a través de múltiples mecanismos, incluyendo la activación de la vía estrogénica. Debido a que observamos un efecto proliferativo inducido por el CPF 0,05 μM en la línea celular MCF-7, decidimos evaluar el efecto del CPF sobre la fosforilación del RE y la función de este receptor en la proliferación celular inducida por el plaguicida.

Efecto sobre la fosforilación del RE

La mayoría de los estudios realizados sobre la activación del RE han sido sobre su fosforilación en diferentes residuos de serina. Hoy se conoce que el RE se fosforila adicionalmente en la tirosina 537 y que esta fosforilación induce la activación del receptor y promueve la proliferación celular.

La fosforilación del receptor fue evaluada por western blot luego de exponer a las células MCF-7 a diferentes concentraciones de CPF durante 15 minutos. Como se observa en la figura I.4, la exposición de las células a CPF 0,05 μM produjo un incremento del 85 % ($p < 0,01$) en la fosforilación del RE respecto al tratamiento control. No observamos modificaciones en la fosforilación del RE cuando las células fueron expuestas a CPF 50 μM .

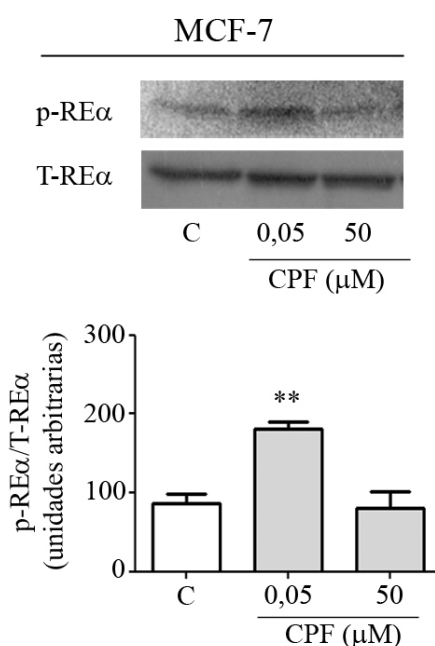


Figura I.4. Fosforilación del RE . Las células fueron expuestas a CPF (0,05 y 50 μM) o vehículo (C) durante 15 minutos. La fosforilación del RE en la tirosina 537 (p-RE) fue determinada mediante western blot a partir del lisado total de células. Se muestran las fotografías de un experimento representativo. Debajo se representa la cuantificación densitométrica de las bandas correspondiente al p-RE respecto al contenido total de este receptor (T-RE). Se representa la media \pm EEM de dos experimentos independientes (** $p < 0,01$; ANOVA de un factor y Test Dunnett a posteriori).

Efecto sobre la proliferación utilizando un inhibidor específico del RE

Con el objetivo de seleccionar una concentración adecuada del inhibidor del RE, ICI 182,780, que impidiera el efecto proliferativo inducido por el E₂, realizamos un ensayo evaluando la capacidad clonogénica de las células estimuladas con E₂, en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor. Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura I.5. Como puede observarse, la presencia de E₂ 10 nM incrementó en un 71,6 % (p<0,001) la capacidad clonogénica de las células MCF-7 y este efecto fue impedido por la presencia de ICI 182,780 en concentración de 0,1 y 1 nM. Un aspecto importante a destacar, es que la presencia del inhibidor no alteró significativamente la proliferación cuando las células fueron cultivadas en ausencia de E₂ (C). A partir de este experimento, decidimos utilizar ICI 182,780 en una concentración de 1 nM para los siguientes ensayos.

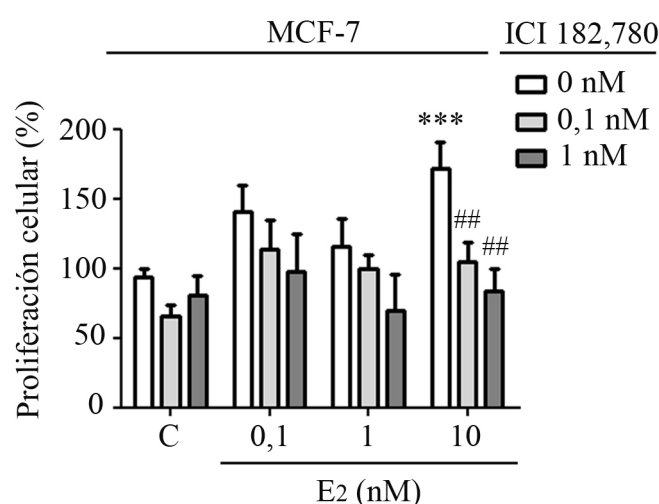


Figura I.5. Selección de la concentración de ICI 182,780. Las células MCF-7 fueron expuestas a concentraciones variables de E₂ o vehículo (C) durante 10 días en presencia y ausencia de diferentes concentraciones del inhibidor del RE, ICI 182,780 (ICI). En el gráfico se muestran los porcentajes de las colonias formadas para cada concentración estudiada en presencia y ausencia de ICI respecto al obtenido en células expuestas a vehículo sin inhibidor. Las barras representan la media ± EEM de dos experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado (***)p<0,001 vs. C + ICI 0 nM; ##p<0,01 vs. E₂ 10 nM + ICI 0 nM; ANOVA de dos factores y Test Bonferroni a posteriori).

Una vez seleccionada la concentración de ICI 182,780, evaluamos el papel del RE en el incremento en la proliferación inducido por el CPF 0,05 μM en la línea celular MCF-7. Para ello, analizamos la capacidad clonogénica de estas células expuestas a diferentes concentraciones de CPF, en presencia y ausencia de ICI 182,780 1 nM. Como se observa en la figura I.6, la adición del inhibidor revirtió completamente el efecto proliferativo inducido por el CPF. De esta manera, cuando las células fueron cultivadas en presencia de CPF 0,05 y 0,5 μM , observamos un incremento en la capacidad clonogénica del 39,7 y 27,4 % respectivamente ($p < 0,01$). Por otra parte, al adicionar ICI 182,780 junto con estas concentraciones del plaguicida, la capacidad clonogénica celular resultó similar a la observada en las células control. En cuanto al efecto antiproliferativo inducidos por el CPF 50 μM , el mismo fue observado independientemente de la presencia de ICI 182,780 en el medio de cultivo.

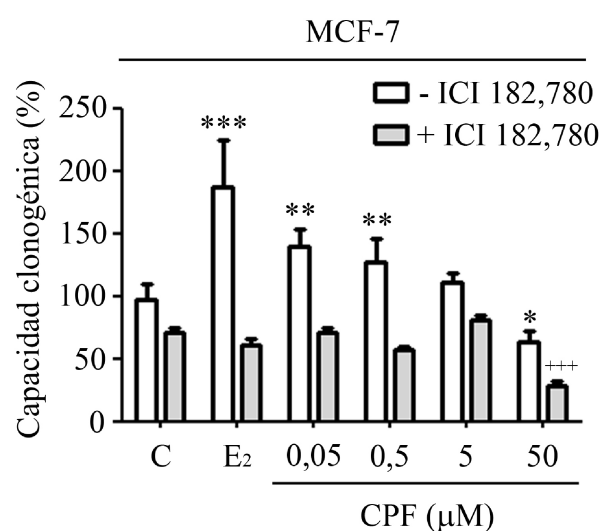


Figura I.6. Papel del RE en el efecto proliferativo inducido por el CPF. Las células MCF-7 fueron expuestas a concentraciones variables de CPF o vehículo (C) durante 10 días en presencia y ausencia del inhibidor del RE, ICI 182,780 (ICI). En el gráfico se muestran los porcentajes de las colonias formadas para cada concentración estudiada en presencia y ausencia de ICI respecto al obtenido en células expuestas a vehículo sin inhibidor. Las barras representan la media \pm EEM de dos experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado. Para el análisis estadístico, las series con y sin ICI fueron analizadas de forma independiente (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. control - ICI; +++ $p < 0,001$ vs. control + ICI; ANOVA de un factor y Test Dunnett a posteriori).

Efectos sobre la vía Wnt/ β -catenina

Previamente describimos un incremento de la proliferación celular inducida por el CPF 0,05 μ M, el cual se encuentra mediado por la activación del RE . Además de los mecanismos genómicos tradicionalmente descritos para el RE , los estímulos estrogénicos disparan una serie de señales no genómicas. Estos mecanismos incluyen la activación de una amplia variedad de vías de señalización, entre las que se encuentra la vía protagonizada por las proteínas Gsk-3 y β -catenina. Con el fin de estudiar los efectos del CPF sobre esta vía de señalización, evaluamos la fosforilación de Gsk-3 en las células MCF-7 expuestas a ambas concentraciones de CPF durante 5, 30 y 60 minutos.

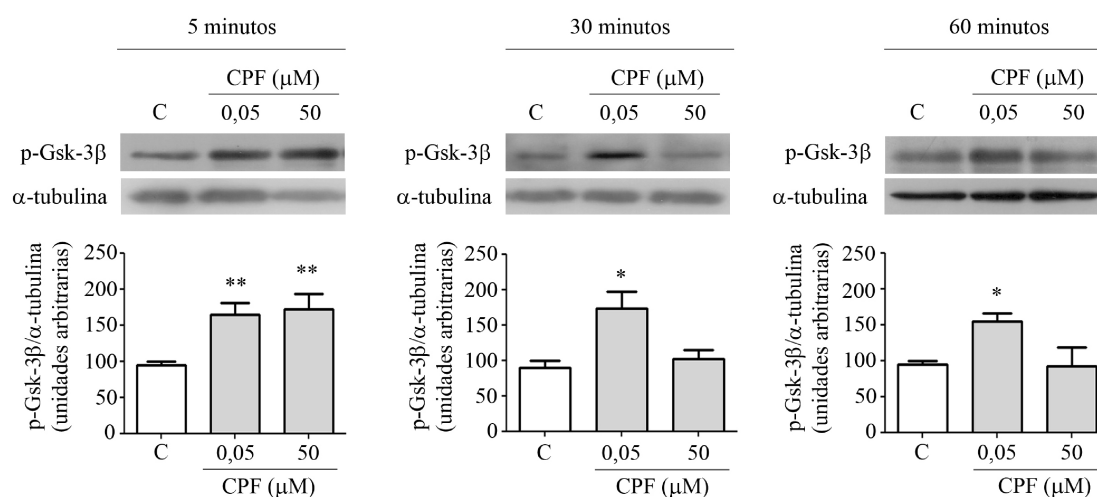


Figura I.7. Fosforilación de Gsk-3 en la línea celular MCF-7. Las células fueron expuestas a CPF (0,05 y 50 μ M) o vehículo durante 5, 30 y 60 minutos. La fosforilación de la quinasa Gsk-3 en la serina 9 (p-Gsk-3) fue determinada mediante western blot a partir del lisado total de células. Se muestran las fotografías de un experimento representativo. Debajo se representa la cuantificación densitométrica de las bandas obtenidas respecto al contenido de α -tubulina. Se representa la media \pm EEM de dos experimentos independientes (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; ANOVA de un factor y Test Dunnett a posteriori).

Como se observa en la figura I.7, el cultivo de las células MCF-7 en presencia de CPF 0,05 μ M incrementó la fosforilación de Gsk-3 en todos los tiempos evaluados.

Estos incrementos fueron del 67 % ($p<0,01$), 75 % ($p<0,05$) y 55 % ($p<0,05$) a los 5, 30 y 60 minutos de exposición respectivamente. Por otra parte, una mayor concentración de CPF (50 μM) solo indujo la fosforilación de esta proteína luego de 5 minutos de exposición al plaguicida en un 72 % ($p<0,01$) respecto al control.

Como describimos en la introducción de este trabajo, la fosforilación de Gsk-3 en la serina 9, trae aparejada la inactivación de esta quinasa, lo cual conlleva a la estabilización de β -catenina y su translocación al núcleo celular. Con el fin de profundizar los estudios sobre esta vía de señalización, evaluamos la localización intracelular de la proteína β -catenina luego de la exposición de las células MCF-7 al plaguicida durante una hora. Como se observa en la figura I.8, el cultivo de las células con ambas concentraciones de CPF, condujo a la translocación de β -catenina hacia el núcleo celular. De esta manera, en las células cultivadas en presencia de vehículo la expresión de β -catenina fue observada en el citoplasma y en la membrana plasmática, mientras que, cuando las células fueron tratadas con CPF (0,05 y 50 μM) la expresión de esta proteína fue observada principalmente en el núcleo.

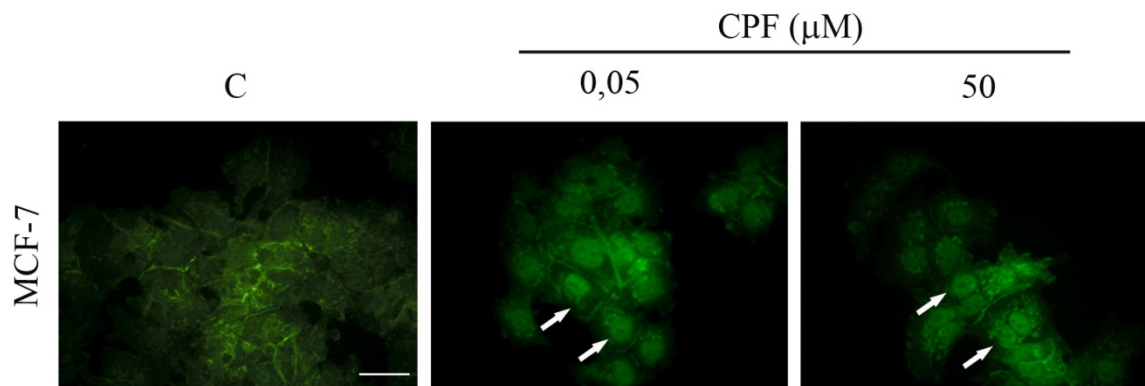


Figura I.8. Localización intracelular de β -catenina. Las células fueron expuestas a CPF (0,05 y 50 μM) o vehículo (C) durante una hora. La localización intracelular de β -catenina se determinó por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo monoclonal específico. La barra ubicada abajo y a la derecha de la primera fotografía corresponde a 20 μm . Aumento 630X. Las flechas blancas señalan la localización nuclear de β -catenina.

La fosforilación de Gsk-3 ha sido relacionada con la activación del RE . Con el fin de evaluar si la inactivación de Gsk-3 inducida por el CPF 0,05 μ M se encuentra vinculada con la activación del RE , estudiamos la fosforilación de esta quinasa en presencia y ausencia del inhibidor del RE , ICI 182,780. La figura I.9, muestra que la presencia ICI 182,780 en el medio de cultivo no influyó sobre la inactivación de Gsk-3 inducida por el CPF 0,05 μ M. Como discutiremos más adelante en este trabajo, este resultado indica que ambos eventos, la fosforilación del RE y la fosforilación de Gsk-3 , ocurren en forma paralela e independiente dentro de las células expuestas al tóxico.

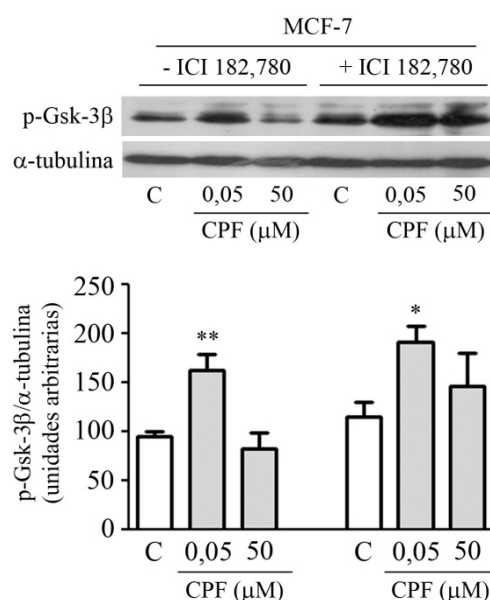


Figura I.9. Relación entre la fosforilación de Gsk-3 y el RE . Las células fueron expuestas a CPF (0,05 y 50 μ M) o vehículo durante una hora en presencia y ausencia del inhibidor del RE ICI 182,780. La fosforilación de la quinasa Gsk-3 fue determinada mediante western blot a partir del lisado total de células. Se muestran las fotografías de un experimento representativo. Debajo se representa la cuantificación densitométrica de las bandas obtenidas respecto al contenido de α -tubulina. Se representa la media \pm EEM de dos experimentos independientes (* p <0,05, ** p <0,01 vs. su correspondiente control; ANOVA de un factor y Test Dunnett a posteriori).

Con el fin de corroborar si la fosforilación de la quinasa Gsk-3 inducida por el CPF constituye un efecto independiente de la activación del RE, evaluamos la fosforilación de esta quinasa en la línea celular MDA-MB-231. En este experimento, observamos un incremento en la fosforilación de la serina 9 de Gsk-3, inducida por la exposición a CPF 50 μ M durante 1 hora. Este resultado, corrobora la independencia del efecto producido por el CPF sobre la quinasa Gsk-3 y la activación de la vía estrogénica en nuestro modelo de estudio (Fig. I.10).

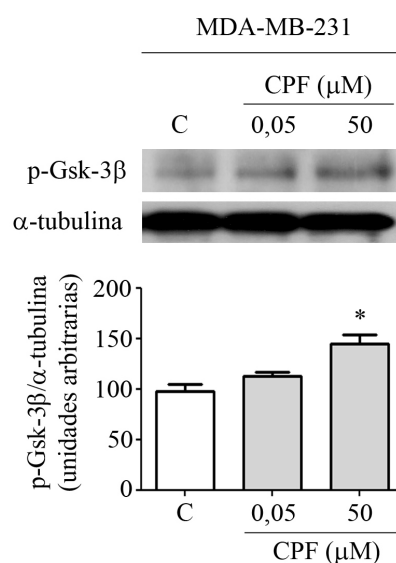


Figura I.10. Fosforilación de Gsk-3 en la línea celular MDA-MB-231. Las células fueron expuestas a CPF (0,05 y 50 μ M) o vehículo durante 60 minutos. La fosforilación de la quinasa Gsk-3 fue determinada mediante western blot a partir del lisado total de células. Se muestran las fotografías de un experimento representativo. Debajo se representa la cuantificación densitométrica de las bandas obtenidas respecto al contenido de α -tubulina. Se representa la media \pm EEM de dos experimentos independientes (* p <0,05; ANOVA de un factor y Test Dunnett a posteriori).

Efecto del CPF sobre el ciclo celular

Las etapas a través de las cuales pasa una célula desde una división celular a la siguiente constituyen el ciclo celular. Como mencionamos anteriormente, en nuestros experimentos observamos diferentes efectos del CPF sobre la capacidad clonogénica en ambas líneas celulares. Por un lado, el CPF 0,05 μ M condujo a un incremento de la

proliferación en las células MCF-7, sin embargo, concentraciones mayores de CPF (50 μM) causaron una disminución en la capacidad clonogénica tanto en la línea MCF-7 como en la línea MDA-MB-231.

El transcurso a través de las diferentes fases del ciclo se encuentra regulado por la acción de complejos proteicos formados por ciclinas y Cdks. Las ciclinas son las unidades reguladoras de estos complejos, por lo cual decidimos investigar su expresión en las células expuestas a diferentes concentraciones de CPF. Particularmente, la expresión de ciclina D_1 es regulada positivamente por la acción estrogénica. La progresión a través de la fase G1 del ciclo celular es regulada por esta ciclina, la cual alcanza su máxima expresión y activa a las quinasas Cdk4 y Cdk6. Por otra parte, el complejo proteico formado por ciclina E y Cdk2 interviene en la transición desde la fase G1 a la fase S.

Efectos sobre la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular

Los niveles de expresión de estas proteínas fueron evaluadas mediante la técnica de western blot en el lisado total de células cultivadas en presencia de CPF durante 24 horas. Como se observa en la figura I.11, las células MCF-7 cultivadas en presencia de CPF 0,05 μM mostraron un incremento del 42 % ($p < 0,05$) en los niveles de ciclina D_1 . Por otra parte, estas células cultivadas en presencia de CPF 50 μM mostraron niveles de ciclina E que superaron en un 54 % ($p < 0,05$) a los presentes en las células expuestas al vehículo (Fig. I.11).

Uno de los mecanismos de regulación más estudiados del ciclo celular, involucra la acción de inhibidores proteicos sobre los complejos formados por las ciclinas y las Cdks. Entre ellos, la proteína p27 es un potente inhibidor del complejo formado por la ciclina E y la quinasa Cdk2. La expresión de este inhibidor fue reducida significativamente por la concentración más baja del plaguicida (0,05 μM) en ambas líneas celulares (Fig. I.11). Más adelante discutiremos la relación entre este resultado y el incremento en la proliferación celular observado en las células MCF-7.

En cuanto a la línea celular MDA-MB-231, la presencia del plaguicida no indujo modificaciones significativas en los niveles de expresión de las ciclinas E y D_1 , en

ninguna de las concentraciones estudiadas. Sin embargo, observamos un incremento del 58,8 % ($p < 0,05$) en la expresión del inhibidor p27 cuando estas células se cultivaron en presencia de CPF 50 μM durante 24 horas (Fig. I.11).

Finalmente, evaluamos la expresión de PCNA en ambas líneas celulares expuestas al plaguicida durante 24 horas. El CPF 50 μM no modificó significativamente la expresión de esta proteína en la línea MCF-7. Sin embargo, en concordancia con los resultados descritos anteriormente, observamos un leve incremento en la expresión de PCNA cuando las células se cultivaron en presencia de CPF 0,05 μM . Por otra parte, en la línea celular MDA-MB-231, el CPF 50 μM redujo la expresión de PCNA, lo cual se ajusta a la disminución en la proliferación observada previamente (Fig. I.11).

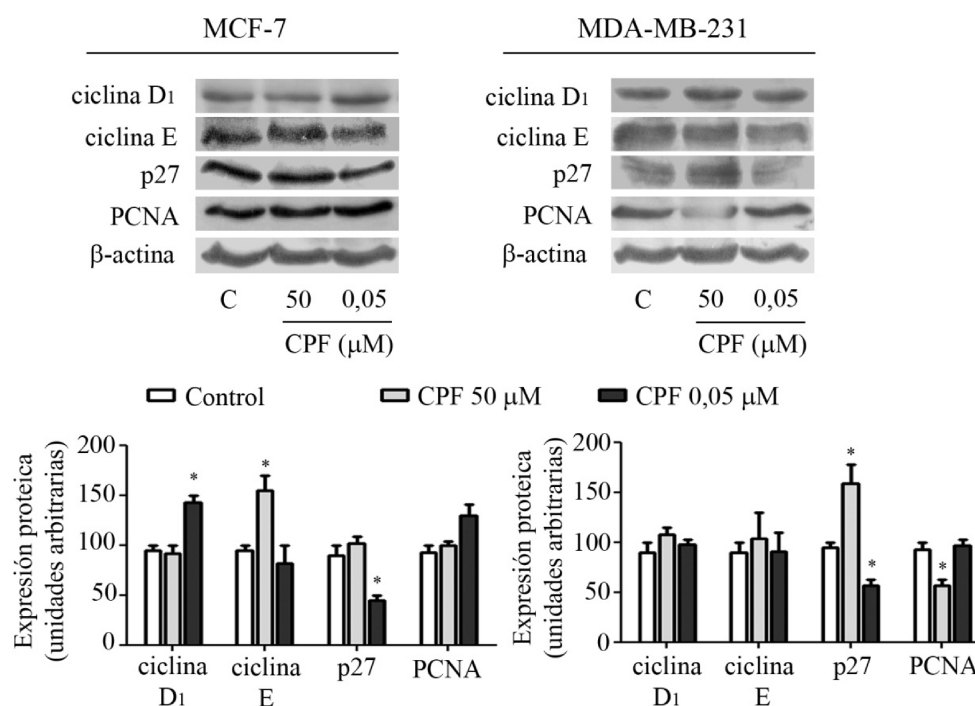


Figura I.11. Niveles de expresión de proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular (ciclinas D₁ y E y p27) y PCNA. Las células fueron expuestas a CPF (0,05 y 50 μM) o vehículo (Control) durante 24 horas. La expresión de cada proteína se determinó por western blot a partir del lisado total de células. Se muestran las fotografías de un experimento representativo. El gráfico de barras representa la cuantificación densitométrica de las bandas obtenidas en relación al contenido de β -actina. Se representa la media \pm EEM de dos experimentos (* $p < 0,05$; ANOVA de un factor y Test de Dunnett a posteriori).

Efecto sobre la distribución en las diferentes fases del ciclo

Muchos tóxicos ambientales ejercen su acción mediante la desregulación del ciclo celular, lo cual conduce a la acumulación de las células en alguna fase del ciclo. Como describimos anteriormente, el cultivo de ambas líneas celulares con CPF durante 24 horas, produjo modificaciones en los niveles de diferentes proteínas reguladoras del ciclo celular. Estos datos podrían evidenciar una desregulación del ciclo que derive en la pérdida de la capacidad clonogénica descrita previamente.

Con el fin de probar esta hipótesis, investigamos la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular analizando el contenido de ADN luego de 24 horas de exposición a diferentes concentraciones del tóxico. Para ello, utilizamos IP como marca para la cuantificación del ADN celular. Este compuesto ingresa a las células y se intercala de manera estequiométrica en el ADN, permitiendo su cuantificación por citometría de flujo.

En la figura I.12 se muestran los histogramas y se detallan los porcentajes de células presentes en las diferentes fases del ciclo para ambas líneas celulares cultivadas en presencia del vehículo o de diferentes concentraciones de CPF durante 24 horas. Como puede observarse, en la línea celular MCF-7 el porcentaje de células en fase S pasó del $26,6 \pm 0,8$ % con el tratamiento control al $39,7 \pm 2,3$ % cuando las células se incubaron con CPF $50 \mu\text{M}$, lo cual representa un incremento del 43% ($p < 0,001$). El avance a través de la fase S del ciclo para ingresar a la fase G2, se encuentra asociado a una disminución en los niveles de ciclina E, por lo tanto, este resultado podría vincularse con el incremento de esta proteína observado previamente. Cuando se utilizaron concentraciones menores de CPF, no observamos modificaciones significativas en el porcentaje de células presentes en las diferentes etapas del ciclo.

En la línea celular MDA-MB-231, en cambio, observamos una acumulación de células en fase G2/M del ciclo. Las fases G2 y M no pueden distinguirse con esta metodología de estudio ya que, en ambas fases, las células poseen la misma cantidad de ADN. Por lo tanto, las dos fases serán analizadas en forma conjunta bajo la denominación de G2/M. El porcentaje de células en las fases G2/M fue de $12,4 \pm 0,4$ % en el tratamiento control y se incrementó hasta $19,5 \pm 0,9$ % cuando las células fueron

expuestas a CPF 50 μM . La exposición de las células a concentraciones menores de CPF tampoco afectó la distribución en las diferentes fases del ciclo en esta línea celular.

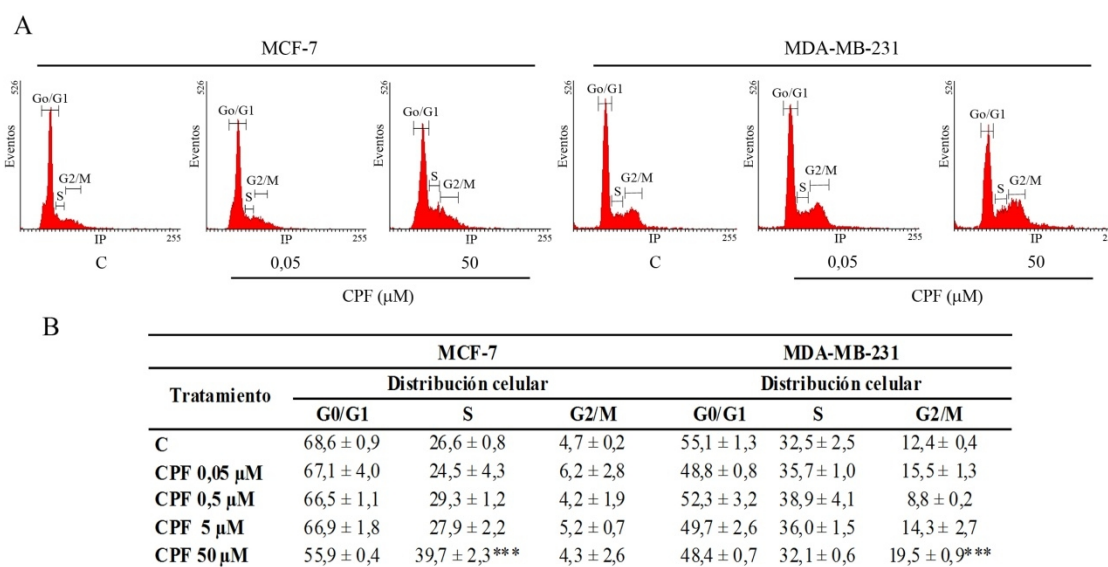


Figura I.12. Análisis del ciclo celular. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de CPF o vehículo (C) durante 24 horas. **A)** Los histogramas muestran la distribución de la población celular en las diferentes fases del ciclo determinada por citometría de flujo utilizando IP. **B).** En la tabla se muestran los porcentajes de células en las diferentes fases del ciclo. Los datos corresponden a la media \pm EEM de dos experimentos independientes cada uno realizado por duplicado (**p<0,001 vs. su respectivo control; ANOVA de dos factores y Test de Bonferroni a posteriori).

Efecto sobre el citoesqueleto

La tubulina es una proteína clave en la división celular ya que interviene en la formación del huso mitótico, el cual es necesario para la correcta segregación de los cromosomas hacia las células hijas. Muchas sustancias son capaces de unirse covalentemente a la tubulina impidiendo su correcta polimerización, llevando a la detención del ciclo en la fase M. Debido a que observamos una acumulación en la fase G2/M del ciclo cuando las células MDA-MB-231 fueron expuestas a CPF 50 μM , decidimos investigar el efecto de este tóxico sobre el citoesqueleto de tubulina en

células expuestas a diferentes concentraciones del plaguicida durante 24 horas. La organización de los microtúbulos fue evaluada mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente a la proteína α -tubulina, independientemente de que se encuentre en forma monomérica o formando los microtúbulos. Como se observa en la figura I.13, la exposición de ambas líneas celulares a CPF 50 μM produjo una despolimerización de los microtúbulos, evidenciada en las fotografías por una marca difusa ubicada en el citoplasma celular. Por otra parte, el tratamiento de las células con CPF 0,05 μM no produjo modificaciones en el citoesqueleto de tubulina.

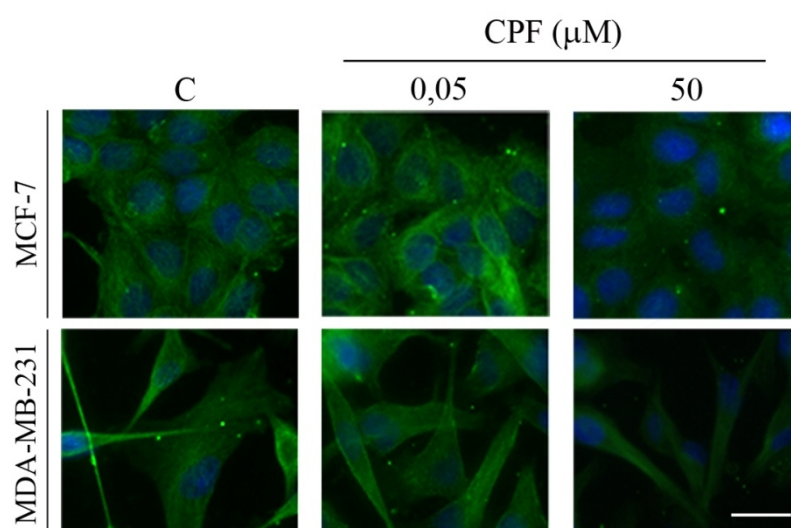


Figura I.13. Polimerización de tubulina. Las células fueron expuestas a CPF (0,05 y 50 μM) o vehículo (C) durante 24 horas. Los microtúbulos se observaron por microscopía de fluorescencia mediante la detección de α -tubulina utilizando un anticuerpo monoclonal específico. Barra: 20 μM . Se muestran áreas amplificadas digitalmente, correspondientes a fotografías adquiridas con un aumento de 630X.

Efecto del CPF sobre la apoptosis y la necrosis celular

Como describimos anteriormente, en nuestros experimentos observamos diferentes efectos del CPF sobre la proliferación en ambas líneas celulares. Por un lado, el cultivo de las células MCF-7 con CPF 0,05 μM condujo a un aumento en la

capacidad clonogénica y en la incorporación de BrdU, junto con un incremento en los niveles de ciclina D₁ y una disminución en la expresión de p27. Sin embargo, concentraciones mayores de CPF (50 µM) causaron una disminución en la capacidad clonogénica en ambas líneas celulares, la cual podría estar relacionado con la acumulación de las células en diferentes fases del ciclo celular.

Con el fin de evaluar si la disminución en la formación de colonias observada previamente se correspondía con un incremento de la muerte celular, decidimos evaluar la presencia de células apoptóticas y/o necróticas luego de la exposición de ambas líneas celulares al plaguicida. Estos mecanismos fueron evaluados por citometría de flujo utilizando los agentes fluorescentes IP y Anexina-V-FITC. La Anexina-V es una proteína que se une específicamente a residuos de fosfatidilserina, los cuales se encuentran expuestos en la cara externa de la membrana plasmática de las células desde las primeras etapas de la apoptosis, constituyendo un biomarcador efectivo de las células que atraviesan dicho proceso. Como muestra la figura I.14, en concordancia con los resultados obtenidos mediante el ensayo de viabilidad celular, la exposición de ambas líneas celulares a diferentes concentraciones de CPF por 24 horas no incrementó el porcentaje de células apoptóticas y/o necróticas con respecto al encontrado en las células expuestas al vehículo. Sin embargo, cuando la exposición a CPF 50 µM se prolongó por 48 horas, el porcentaje de células necróticas aumentó significativamente con respecto al observado en las células control. Finalmente, la exposición de las células a CPF 0,05 µM no modificó el porcentaje de células apoptóticas y/o necróticas en ninguna de las líneas celulares utilizadas. En la figura I.14 se detallan los porcentajes de células apoptóticas tempranas (Anexina-V+/IP-), apoptóticas tardías (Anexina-V+/IP+) y necróticas (Anexina-V-/IP+) para ambas líneas celulares luego de 24 y 48 horas de cultivo en presencia de vehículo o diferentes concentraciones de CPF (0,05 y 50 µM). Adicionalmente, se muestra un control negativo, en el cual se omitió el agregado de Anexina-V-FITC y de IP durante el protocolo experimental, y un control positivo constituido por células expuestas a H₂O₂ 5 µM durante 24 horas.

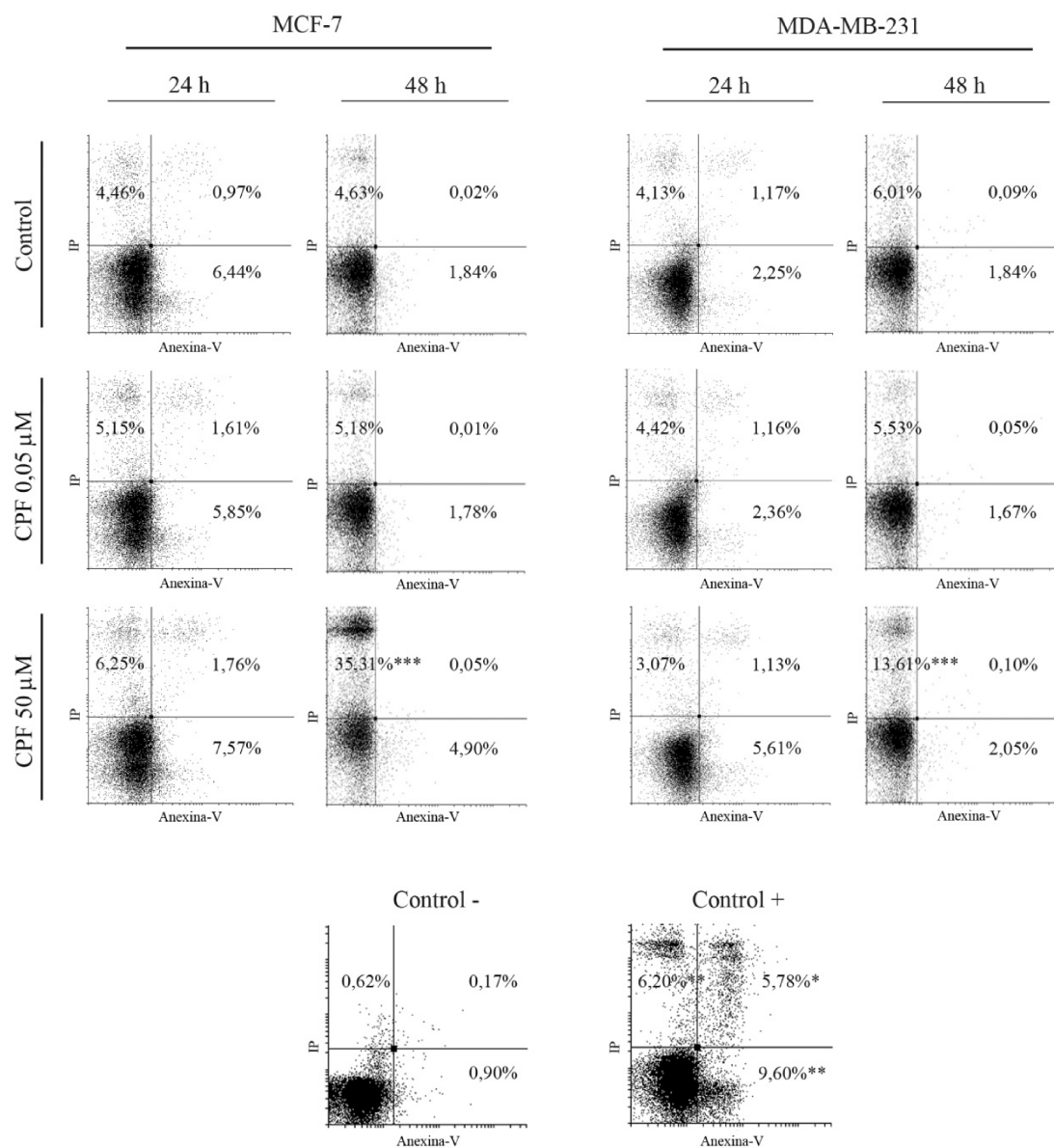


Figura I.14. Efecto del CPF sobre la apoptosis y la necrosis celular. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de CPF (0,05 y 50 μM) o vehículo (Control) durante 24 y 48 horas. El control negativo corresponde a células MDA-MB-231 sin el agregado de Anexina-V-FITC ni IP. El control positivo corresponde a la misma línea celular expuesta a H₂O₂ 5 μM durante 24 horas. En los gráficos se muestran los porcentajes de células apoptóticas tempranas (Anexina-V+/IP-), apoptóticas tardías (Anexina-V+/IP+) y necróticas (Anexina-V-/IP+). Los datos corresponden a la media ± EEM de dos experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs. su respectivo control; ANOVA de un factor y Test de Dunnett a posteriori).

Si bien observamos un incremento en el porcentaje de células necróticas, el porcentaje de células marcadas con AnexinaV-FITC no se vio modificado luego de la exposición de las células al plaguicida. Con el fin de confirmar la ausencia de apoptosis, las células fueron cultivadas en presencia de CPF (0,05 y 50 μM) o vehículo durante 48 y 72 horas y los núcleos celulares fueron visualizados mediante la tinción con el colorante fluorescente DAPI. De esta manera, los núcleos apoptóticos fueron observados con su cromatina condensada distinguiéndose de los núcleos no apoptóticos.

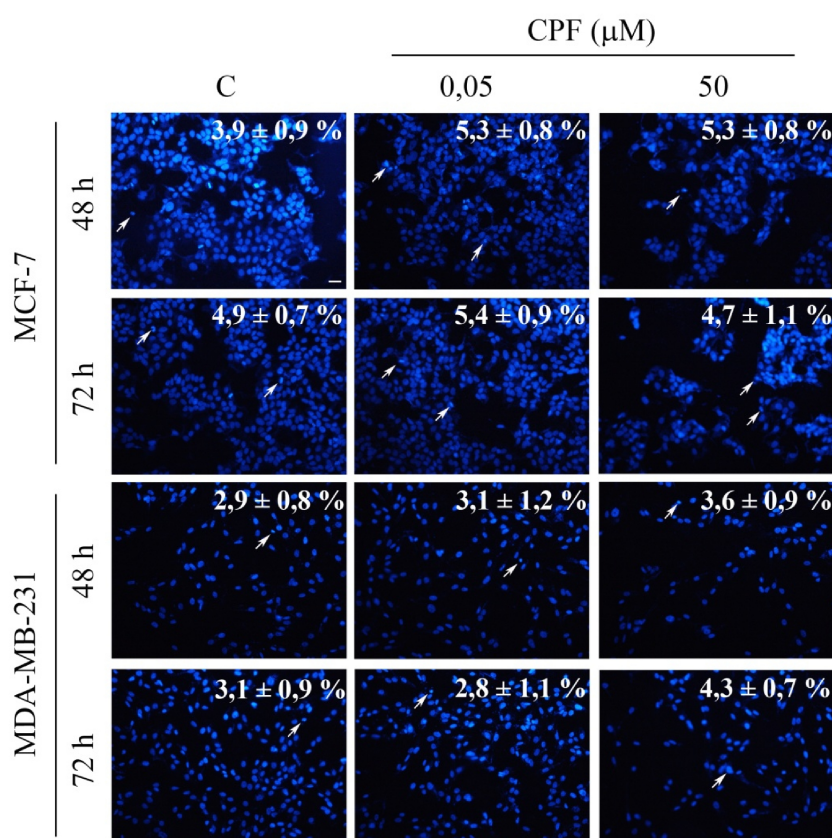


Figura I.15. Efecto del CPF sobre la apoptosis. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de CPF (0,05 y 50 μM) o vehículo (C) durante 48 y 72 horas. Los núcleos celulares fueron teñidos con el colorante DAPI y fotografiados con un aumento de 200X. Se muestran fotografías representativas de cada situación experimental. El porcentaje de núcleos apoptóticos fue calculado como el número de núcleos con cromatina condensada en relación con el número de núcleos totales por campo. Las flechas blancas sobre las fotografías señalan algunos ejemplos de núcleos considerados apoptóticos. Los datos corresponden a la media \pm EEM de dos experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado (p:ns; ANOVA de un factor y Test de Dunnett a posteriori). Barra: 20 μm .

En la figura I.15 se muestran fotografías representativas y se detallan los porcentajes de células apoptóticas en cada situación experimental. No observamos diferencias significativas en los porcentajes de núcleos apoptóticos presentes en las células expuestas a CPF en ninguna de las concentraciones utilizadas. El resultado fue el mismo independientemente del tiempo durante el cual las células fueron expuestas al tóxico.

Discusión. *Primera parte*

En este primer capítulo, hemos descrito el efecto del CPF sobre la proliferación y el ciclo celular utilizando dos líneas celulares derivadas de adenocarcinomas mamarios humanos. Una de las líneas celulares utilizadas, denominada MCF-7, expresa el RE y responde a los estímulos estrogénicos para su crecimiento. La segunda línea celular, MDA-MB-231, carece de dicho receptor y, por lo tanto, su proliferación resulta independiente de estos estímulos.

En ambas líneas celulares evaluamos diferentes parámetros de crecimiento como la viabilidad celular, la capacidad clonogénica, la incorporación de BrdU, la apoptosis y la necrosis. Adicionalmente, estudiamos la progresión a través del ciclo celular y las proteínas reguladoras del mismo, así como la participación del RE y la Gsk-3 en estos procesos.

Para realizar estos estudios, las células fueron cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de CPF, las cuales abarcaron un rango desde 0,05 a 50 μM . Las concentraciones de CPF utilizadas fueron seleccionadas en base a datos publicados previamente en la bibliografía, con el interés de que las mismas sean representativas de las concentraciones presentes en los ambientes cercanos a sitios de aplicación. De esta manera, nuestros resultados adquieren relevancia, permitiendo estimar los efectos que el CPF podría presentar sobre la salud de los habitantes de estas regiones.

En la tabla I.2, se resumen los resultados obtenidos por distintos grupos de investigación, nacionales y extranjeros, que evaluaron las concentraciones de CPF presentes en el medioambiente. Durante el año 2010, Del Prado y sus colaboradores reportaron la presencia de CPF en muestras de agua de la ciudad de Benguet, en Filipinas, encontrando una concentración media de 0,07 mg/ml (Del Prado Lu, 2010), la cual equivale a 0,2 μM de CPF. En México, Dzul-Caamal y colaboradores reportaron altos niveles de CPF en el Lago Zumpango. En este trabajo los investigadores encontraron una concentración promedio de CPF en agua de 25,22 ng/L (0,07 nM), mientras que la concentración en sedimentos fue seis órdenes de magnitud mayor (Dzul-Caamal et al., 2014).

Por otra parte, en un estudio realizado en Tailandia, la mayor concentración de CPF detectada en agua fue 0,2920 mg/L, lo cual equivale a 0,83 μM de este compuesto.

Estos investigadores también detectaron la presencia de CPF en aire (0,2580 mg/m³, equivalente a 0,81 nanomoles por litro de aire) y tierra 32,19 mg/Kg (Harnpicharnchai et al., 2013).

Como describimos en la introducción de este trabajo, la principal fuente de contaminación no ocupacional con plaguicidas es a través de la ingesta de residuos presentes en los alimentos. En un estudio realizado en la provincia de Talca, Chile, se detectó la presencia de CPF en frutas consumidas por niños en las escuelas y en sus hogares. Estos investigadores recolectaron diversos tipos de frutas y evaluaron la presencia de plaguicidas. Sus resultados señalaron la presencia de CPF en manzanas y naranjas. La concentración más alta de CPF encontrada fue de 0,16 mg/Kg de fruta, mientras que la concentración más baja fue de 0,01 mg/Kg de fruta (Muñoz-Quezada et al., 2014).

En nuestro país, Marino y Ronco informaron la presencia de CPF en agua en regiones de producción de soja. La mínima concentración detectada fue 0,4 µg/L (0,0003 µM), mientras que la máxima concentración detectada fue 10,8 µg/L (0,03 µM) (Marino and Ronco, 2005). Por otra parte, Jergentz y sus colaboradores realizaron un estudio durante las épocas de aplicación de insecticidas, en los arroyos Brown y Horqueta, detectando niveles de CPF superiores a los criterios de calidad establecidos. Las mayores concentraciones detectadas en agua fueron de 0,0013 y 0,00085 µM en Brown y La Horqueta respectivamente. Por otra parte, se encontraron concentraciones de hasta 150 mg/Kg cuando se analizaron los sedimentos presentes en el lugar (Jergentz et al., 2005). Estos arroyos se encuentran en la provincia de Buenos Aires, principal zona de producción de soja de Argentina, representando un riesgo tanto para la fauna acuática como para las poblaciones cercanas.

En otro estudio realizado en nuestro país, Loewy y sus colaboradores evaluaron la distribución de plaguicidas en suelo, aguas superficiales, aguas subterráneas poco profundas y agua depositada por la deriva, en el valle del río Neuquén. Es importante destacar, que la evaluación fue realizada en lugares alejados de los sitios de aplicación. Los plaguicidas detectados con mayor frecuencia en este estudio fueron el CPF y el metilazinfos, otro compuesto organofosforado ampliamente utilizado en nuestro país. La máxima concentración de CPF reportada fue de 1,16 ppb, lo cual equivale a 0,003

μM. En cuanto a las concentraciones en suelo, el CPF fue detectado tanto en épocas de aplicación como en periodos sin actividad. La concentración máxima detectada en estos estudios fue de 60,5 μg/Kg de suelo, y la misma se encontró en los estratos con mayor contenido de materia orgánica debido a la elevada constante de partición en solventes orgánicos de este compuesto (Loewy et al., 2011).

	Lugar	Concentración	Referencia
Agua (μM)	Benguet, Filipinas	0,2	(Del Prado Lu, 2010)
	Lago Zumpango, México	7,0 x 10 ⁻⁵	(Dzul-Caamal et al., 2014)
	Tailandia	0,83	(Harnpicharnchai et al., 2013)
	Río Paraná, Argentina	0,03*	(Marino and Ronco, 2005)
	Brown, Argentina	0,0013*	(Jergentz et al., 2005)
	La Horqueta, Argentina	8,5 x 10 ⁻⁴ *	(Jergentz et al., 2005)
	Neuquén, Argentina	0,003*	(Loewy et al., 2011)
Sedimentos (mg/Kg)	Lago Zumpango, México	5,12	(Dzul-Caamal et al., 2014)
	Brown, Argentina	13,5	(Jergentz et al., 2005)
	La Horqueta, Argentina	150	(Jergentz et al., 2005)
Suelo (mg/Kg)	Tailandia	32,19	(Harnpicharnchai et al., 2013)
	Neuquén, Argentina	0,06	(Loewy et al., 2011)
Aire (nmoles/L)	Tailandia	0,81	(Harnpicharnchai et al., 2013)
Alimentos (mg/Kg)	Chile	0,16*	(Muñoz-Quezada et al., 2014)

*El valor corresponde a la concentración máxima detectada

Tabla I.1. Concentraciones de CPF presentes en el medio ambiente. En la tabla se resumen las concentraciones de CPF informadas en agua, sedimentos, suelo, aire y alimentos por diferentes investigadores.

En base a estos datos bibliográficos, seleccionamos las concentraciones utilizadas en nuestros experimentos. Como mencionamos anteriormente, la concentración mínima seleccionada fue 0,05 μM , mientras que la concentración máxima fue 50 μM . Si bien no existen trabajos que reporten concentraciones ambientales cercanas a los 50 μM , la misma fue incluida en nuestros estudios debido a que concentraciones similares y aún mayores son frecuentemente utilizadas para la evaluación de los efectos de este plaguicida sobre el sistema redox, lo cual constituye un objetivo de esta investigación y cuyos resultados se describirán en el último capítulo de este trabajo.

Nuestros resultados demuestran que las concentraciones de CPF ensayadas no afectan significativamente la viabilidad celular durante las primeras 24 horas de exposición. Sin embargo, la exposición de ambas líneas celulares a CPF 50 μM por tiempos más prolongados condujo a una disminución en la capacidad clonogénica de las mismas.

Adicionalmente, en la línea celular MCF-7, observamos un incremento en la proliferación celular cuando las células se cultivaron en presencia de CPF 0,05 μM . Este efecto fue evidenciado tanto por un incremento en la capacidad clonogénica como en la incorporación de BrdU. Resulta importante destacar, que este efecto no fue observado en la línea celular MDA-MB-231, la cual no responde a los estímulos estrogénicos para su crecimiento.

En los últimos años se han descrito muchos compuestos químicos capaces de actuar como agonistas estrogénicos, los cuales estimulan la proliferación celular cuando se encuentran en bajas concentraciones en el ambiente. En el año 2002, Andersen y sus colaboradores, publicaron un estudio sobre la interacción de un gran número de plaguicidas utilizados en la agricultura, con los receptores de hormonas esteroideas. Específicamente, evaluaron la respuesta inducida por veinticuatro plaguicidas sobre la proliferación celular y activación del RE en células MCF-7. En estos estudios, los investigadores observaron una débil respuesta estrogénica inducida por el CPF en concentración de 25 μM (Andersen et al., 2002). Adicionalmente, Kojima y sus colaboradores observaron que el CPF induce la transactivación del RE utilizando una menor concentración del plaguicida (7,5 μM) (Kojima et al., 2003). Ambos estudios

evalúan la capacidad estrogénica del CPF en base a su capacidad de transactivar al RE utilizando al gen de la luciferasa como gen reportero. Hasta el momento, no se han publicado nuevos estudios que evalúen este efecto utilizando menores concentraciones del plaguicida.

El RE es el principal encargado de recibir los estímulos estrogénicos de las células y convertirlos en una respuesta biológica. Este receptor se encuentra involucrado en la proliferación y el desarrollo celular en la glándula mamaria y otros tejidos sensibles a los estímulos hormonales. Si bien la activación por ligando constituye la vía de activación más estudiada del RE, se han descrito diferentes fosforilaciones que incrementan la actividad del mismo aún en ausencia de ligando (Le Romancer et al., 2011; Murphy et al., 2011; Ward and Weigel, 2010). Una de ellas, es regulada por la quinasa c-Src (*del inglés: Steroid Receptor Co-activators*) la cual conduce a la fosforilación del RE en la tirosina 537 (Arnold et al., 1995a; Castoria et al., 1993). La importancia de esta fosforilación ha sido advertida por muchos investigadores y se ha relacionado con diferentes funciones del RE como la unión de la hormona al receptor, la dimerización y el incremento de la actividad transcripcional (Arnold et al., 1995b; Flint et al., 2000; Weis et al., 1996; Yudt et al., 1999; Zhong and Skafar, 2002). Muchas de las investigaciones realizadas indican que la fosforilación de este residuo incrementa la actividad del receptor en ausencia de hormona (White et al., 1997).

Recientemente, Castoria y sus colaboradores demostraron el papel de esta fosforilación en la localización citoplasmática del RE y en la actividad proliferativa inducida por el E₂, mediante el incremento en la transcripción del gen ciclina D₁ (Castoria et al., 2012). En el mismo sentido, nuestros experimentos mostraron un incremento en la fosforilación del RE en la tirosina 537 y de la expresión de ciclina D₁, cuando las células fueron incubadas con CPF 0,05 μM.

El ICI 182,780 es un antagonista específico del RE. Este compuesto se une al receptor con una afinidad similar a la del E₂ e impide la dimerización, incrementa la degradación y dificulta la localización nuclear del receptor. De esta forma, el ICI 182,780 no solo bloquea la activación del RE, sino que disminuye los niveles intracelulares del mismo (Osborne et al., 2000). Con el fin de confirmar el rol de RE en el efecto proliferativo inducido por el CPF 0,05 μM, cultivamos a las células en

presencia de ICI 182,780 y evaluamos la capacidad clonogénica de las mismas. Como describimos anteriormente, el efecto proliferativo inducido por el CPF 0,05 μM no fue observado cuando las células fueron cultivadas en presencia de este inhibidor. Este resultado indica que la activación del RE es necesaria para la acción del plaguicida y el mismo es apoyado por el hecho de que las células MDA-MB-231, las cuales carecen del RE, no responden a los estímulos proliferativos inducidos por el CPF.

Resultados similares fueron publicados por García y sus colaboradores en el año 2010 quienes investigaron la acción del hexaclorobenceno (HCB), un pesticida organoclorado, sobre la proliferación de las células MCF-7 y MDA-MB-231. Estos investigadores demostraron que el plaguicida induce la proliferación, la expresión del receptor de insulina (RI) y del receptor del factor de crecimiento insulínico I (IGF-IR) en las células MCF-7. Estos efectos fueron impedidos por la presencia de ICI 182,780. Adicionalmente, García y sus colaboradores observaron la activación de la quinasa c-Src y la fosforilación del RE en la tirosina 537 cuando las células se cultivaron en presencia de bajas concentraciones del plaguicida. Estos resultados indican que los efectos desencadenados por ese tóxico en la línea celular MCF-7 son mediados por el RE (García et al., 2010).

Como describimos en la introducción de este trabajo, los estrógenos pueden iniciar señales no genómicas asociadas con diferentes vías de señalización intracelular. Entre ellas, se encuentran la activación de proteínas MAPK, PKC, PI3K y Gsk-3. La Gsk-3 es una serina treonina quinasa implicada en diversas funciones fisiológicas, como la regulación del metabolismo de la glucosa, la dinámica de los microtúbulos durante el ciclo celular, la adhesión, la motilidad y el desarrollo celular (Varea et al., 2010). En nuestros experimentos, evidenciamos un incremento en la fosforilación de Gsk-3 en la serina 9, inducida por el CPF. Este efecto fue observado luego de 5, 30 y 60 minutos de exposición a CPF 0,05 μM en las células MCF-7. Muchos estudios demuestran que los estímulos estrogénicos incrementan la fosforilación de la Gsk-3 en la serina 9, lo cual deriva en la inactivación de esta quinasa (Cardona-Gomez et al., 2004; Grisouard and Mayer, 2009; Medunjanin et al., 2005). En este sentido, Medunjanin y sus colaboradores demostraron una íntima relación entre el RE y la quinasa Gsk-3, la cual modula la actividad del receptor mediante su fosforilación en varios residuos de serinas pertenecientes al dominio de activación independiente del

ligando, AF-1. Además, estos investigadores reportaron la formación de un complejo entre el RE y la Gsk-3. Es importante destacar que los trabajos realizados por este grupo de investigación se realizaron utilizando la línea celular MCF-7, la misma línea que empleamos en esta tesis (Medunjanin et al., 2005).

La presencia de E₂ induce la fosforilación e inactivación de Gsk-3 en forma dependiente de la concentración. De Servi y sus colaboradores identificaron a la isoforma α de la PKC como la principal responsable de la fosforilación e inactivación de Gsk-3 en células mamarias (De Servi et al., 2005). Por otra parte, Kim y colaboradores postulan a la quinasa c-Src como responsable de esta inhibición. Estos investigadores estudiaron el desarrollo de varios órganos reproductivos en ratones carentes de c-Src. Debido al papel de esta quinasa en la fosforilación del RE, el cultivo de células epiteliales mamarias derivadas de estos ratones en presencia de E₂, no incrementa la fosforilación del RE en su tirosina 537. Adicionalmente, estas células no responden a la inactivación de Gsk-3 estimulada por el E₂, sugiriendo un papel importante de la c-Src en la fosforilación de esta proteína (Kim et al., 2005). Otros investigadores proponen a las vías de Akt/PI3K como las responsables de la fosforilación de Gsk-3 inducida por el E₂ (Armanious et al., 2010).

La relación entre la inactivación de Gsk-3 y la respuesta estrogénica ha sido ampliamente documentada mediante el estudio de diferentes fitoestrógenos. El ASPP049, es un fitoestrógeno proveniente de *Curcuma comosa* el cual induce la fosforilación de Gsk-3 en la serina 9 y la acumulación nuclear de β -catenina (Bhukhai et al., 2012). En el mismo sentido, el fitoestrógeno β -sitosterol, induce la inactivación de la Gsk-3 en células neuronales (Shi et al., 2013).

En concordancia con nuestros resultados, Chen y sus colaboradores demostraron la inactivación de Gsk-3 inducida por CPF en el hipocampo y el cuerpo estriado de ratas (Chen et al., 2012). En el mismo sentido, en el año 2009, Stapleton y Chang publicaron una investigación sobre los cambios en la expresión génica inducidos por bajas dosis de CPF en el cerebro de ratas, utilizando micro-arreglos de ADN. En este estudio, los investigadores observaron 277 genes modulados por CPF. El análisis de las redes de asociación biológica entre estos genes demostró que la proteína Gsk-3

presenta un papel importante en la respuesta celular ante una exposición a CPF (Stapleton and Chan, 2009).

La inactivación de Gsk-3 conduce a la estabilización y translocación nuclear de β -catenina (Aberle et al., 1997). En este trabajo, investigamos la localización intracelular de β -catenina en células MCF-7 cultivadas en presencia del plaguicida CPF 0,05 y 50 μ M. Como describimos anteriormente, el cultivo de las células con ambas concentraciones de CPF conduce a la acumulación de β -catenina en el núcleo celular. La localización nuclear de esta proteína induce la expresión de diferentes genes involucrados en la proliferación e invasión celular. Entre ellos, la inducción de la transcripción de ciclina D₁ ha sido ampliamente reportada (Behrens and Lustig, 2004; Tetsu and McCormick, 1999). En concordancia con esos resultados, nuestros experimentos revelaron un incremento en la expresión de ciclina D₁ en las células MCF-7 cultivadas en presencia de CPF 0,05 μ M.

Adicionalmente, observamos un incremento en la fosforilación de Gsk-3 en la serina 9 en células MCF-7 expuestas a CPF 50 μ M durante 5 minutos. Esta concentración de CPF, también indujo la localización nuclear de β -catenina. En contraposición con lo discutido anteriormente, el CPF 50 μ M no posee un efecto estrogénico en las células MCF-7, por lo cual la inactivación de Gsk-3 y la localización nuclear de β -catenina deben responder a otros factores. Numerosas investigaciones describen los efectos tóxicos producidos por metales en diferentes tipos celulares y señalan un importante papel de las ERO en la inactivación de Gsk-3 (Son et al., 2013, 2012). Más adelante en este trabajo, describiremos los efectos del CPF 50 μ M sobre el balance redox celular y discutiremos su asociación con la inactivación de Gsk-3 y localización nuclear de β -catenina.

Con el objetivo de analizar si la inactivación de Gsk-3 inducida por el CPF se relaciona con la activación del RE α , investigamos la fosforilación de esta quinasa en presencia y ausencia del antagonista del RE α , ICI 182,780. Nuestros resultados demostraron que la inactivación de Gsk-3 se produce independientemente de la actividad del RE α . La inactivación de esta quinasa inducida por el CPF 50 μ M en la línea celular MDA-MB-231, constituye una evidencia adicional de la independencia de los fenómenos.

Como describimos anteriormente, la presencia de ICI 182,780 en el medio de cultivo bloquea completamente el efecto proliferativo inducido por el CPF 0,05 μM en las células MCF-7. Muchas investigaciones han reportado la formación de un complejo entre el RE y la Gsk-3 tanto en el núcleo como en el citosol celular (Medunjanin et al., 2005). Otros investigadores reportan la interacción de β -catenina con el RE, formando un complejo capaz de regular la transcripción génica en células de hipocampo (Varea et al., 2010). La participación del RE en estos complejos implica que, si bien la inactivación de Gsk-3 y la fosforilación del RE son eventos independientes, la activación del receptor es necesaria para la proliferación celular inducida por el plaguicida.

Como describimos anteriormente, el cultivo de las células MCF-7 con CPF 0,05 μM condujo a un incremento de la proliferación celular. Sin embargo, concentraciones mayores de CPF (50 μM) derivaron en una disminución de la capacidad clonogénica en ambas líneas celulares. El efecto antiproliferativo fue observado luego de 10 días de exposición al plaguicida. Sin embargo, otros parámetros analizados, como la distribución de las células en las diferentes etapas del ciclo celular, demostraron que el CPF produce alteraciones tras 24 horas de exposición. En relación a esto, en la línea celular MCF-7 observamos un incremento en el porcentaje de células acumuladas en la fase S del ciclo cuando las mismas se cultivaron en presencia de CPF 50 μM . Diferentes compuestos son capaces de incrementar el porcentaje de células en esta fase. La guggulsterona, un polifenol de origen vegetal, suprime la proliferación celular a través de la inhibición de la síntesis de ADN, produciendo la acumulación de células en la fase S (Shishodia et al., 2007). Un mecanismo de acción similar se ha reportado para describir los efectos tóxicos del dimetacrilato de uretano y el 2-hidroxi-etil-metacrilato, componentes liberados por diversos materiales de resinas dentales, que inducen la detención del ciclo celular en la fase S junto a la formación de ERO (Chang et al., 2010, 2005).

Las células se encuentran continuamente expuestas a factores capaces de dañar el ADN celular. Con el fin de minimizar los daños, las células poseen una maquinaria de reparación del ADN y diferentes puntos de control de su ciclo celular. El daño en el material genético causado por la exposición a CPF ha sido documentada en varios

sistemas experimentales (Gupta et al., 2010; Itziou et al., 2011; Li et al., 2009; Nakadai et al., 2006). En el último capítulo de esta tesis, describiremos los efectos del CPF sobre el balance redox celular, donde observamos un incremento en los niveles de ERO inducidas por el CPF 50 μ M. Nuestra hipótesis establece que el incremento de ERO provoca daños en el ADN induciendo la inestabilidad genómica de las células. El daño al ADN afecta particularmente a la fase S del ciclo, en la cual el ADN se sintetiza activamente. Este hecho podría provocar que las células se mantengan en la fase de síntesis hasta reparar el ADN dañado o bien derivar en muerte celular.

La ciclina E, es la proteína más importante en la regulación de la fase S del ciclo. El incremento sostenido en los niveles de ciclina E observado tras el cultivo de las células en presencia de CPF 50 μ M durante 24 horas, podría relacionarse con la incapacidad de las mismas de culminar con la duplicación de su material genético.

En el caso de las células MDA-MB-231, observamos una acumulación de células en la fase G2/M del ciclo. Durante esta fase, específicamente en la mitosis, las cromátidas hermanas de los cromosomas duplicados se separan y reparten en dos nuevos núcleos. El huso mitótico es una estructura fundamental en este proceso y se encuentra formado por dímeros de tubulina polimerizados. De este modo, si se interrumpe el libre intercambio de subunidades de tubulina, la función del huso se ve comprometida y la célula no puede dividirse. Como consecuencia, las células no pueden finalizar la mitosis y se acumulan en la fase M del ciclo (Cocca et al., 2009; Jordan and Wilson, 2004).

Se han detectado múltiples sitios de unión covalente del CPF en diferentes tirosinas de la molécula de tubulina (Grigoryan et al., 2009) y su metabolito, el CPFO, es capaz de interrumpir la polimerización de esta proteína (Grigoryan and Lockridge, 2009; Prendergast et al., 2008). Adicionalmente, el CPF inhibe la diferenciación de células del sistema nervioso de rata afectando la estructura de los microtúbulos (Sachana et al., 2008). Finalmente, estudios in vitro han demostrado que el CPF afecta al transporte intracelular dependiente de quinesinas en el citoesqueleto (Gearhart et al., 2007). Muchas sustancias impiden la proliferación celular mediante el bloqueo de la mitosis. La 15-deoxi-^{12,14}-prostaglandina J₂ (15d-PGJ₂), actúa como un potente agente antiproliferativo, interfiriendo en la polimerización de la tubulina y conduciendo a una

acumulación de las células en la fase G2/M del ciclo (Cocca et al., 2009). En concordancia con estos antecedentes, observamos una despolimerización del citoesqueleto de tubulina inducida por el CPF 50 μM en ambas líneas celulares. Estos resultados podrían explicar la acumulación de células en la fase G2/M del ciclo observada en las células MDA-MB-231 expuestas a CPF 50 μM . En relación a la línea celular MCF-7, no observamos un incremento en el porcentaje de células en la fase G2/M, posiblemente por el retraso en la síntesis de ADN descrito previamente.

Como ya mencionamos, la capacidad clonogénica fue afectada por el CPF 50 μM en ambas líneas celulares. Es importante destacar que la formación de colonias fue evaluada tras cultivar a las células en presencia del plaguicida durante 10 días. Con el fin de evaluar el mecanismo por el cual el CPF 50 μM reduce la capacidad clonogénica, investigamos el efecto de este plaguicida sobre la muerte celular por apoptosis y necrosis, luego de 24 y 48 horas de exposición. Nuestros resultados mostraron que el CPF incrementa el porcentaje de células necróticas en ambas líneas celulares luego de 48 horas de exposición. Sin embargo, la apoptosis celular no fue observada aún tras 72 horas de exposición al tóxico.

Muchos estudios demuestran un incremento en la muerte celular por apoptosis inducida por el CPF (Lee et al., 2012; Li et al., 2009; Nakadai et al., 2006), sin embargo, es importante destacar que las concentraciones de plaguicida utilizadas por estos investigadores, son mayores a las ensayadas en nuestro trabajo. Lee y colaboradores, observaron un incremento en la apoptosis celular inducida por CPF en células neuronales utilizando concentraciones del orden de 100 μM durante 24 horas (Lee et al., 2012). Lo mismo sucede en el trabajo publicado por Nakadai y sus colaboradores, quienes observan un incremento en la apoptosis celular inducido por concentraciones de CPF que abarcan entre 100 y 600 μM (Nakadai et al., 2006). Otros investigadores han observado un incremento en la apoptosis utilizando CPF 50 μM , sin embargo, estos ensayos fueron realizados en cultivos primarios de células neuronales de ratas (Caughlan et al., 2004), por lo tanto, resulta probable que estas células presenten una mayor sensibilidad al plaguicida, en relación a las líneas celulares utilizadas en nuestro trabajo.

En base a estos resultados, podemos concluir que el CPF 50 μ M provoca una disminución en la capacidad clonogénica celular. Este efecto, se inicia con una alteración del ciclo celular y de la expresión de las proteínas que lo regulan, lo cual deriva en un incremento de la necrosis celular. En el último capítulo de este trabajo, profundizaremos los estudios referentes a los mecanismos moleculares implicados en estos procesos.

Resultados. *Segunda parte*

Efecto del CPF sobre el desarrollo de la glándula mamaria de rata

El uso indiscriminado de plaguicidas representa uno de los mayores riesgos de impacto ambiental en todo el mundo. Anteriormente en este trabajo describimos los efectos del CPF sobre la proliferación en líneas celulares tumorigénicas mamarias. En esos estudios, observamos un incremento de la proliferación celular en la línea MCF-7, el cual fue mediado por la acción del RE. Estos resultados, demuestran el efecto estrogénico del CPF. Con el fin de profundizar nuestros estudios sobre el CPF como un posible DE, evaluamos el efecto de este plaguicida sobre el desarrollo de la glándula mamaria de rata, su entorno hormonal y la carcinogénesis mamaria en esta especie.

Para ello, utilizamos ratas hembras de la cepa Sprague Dawley, las cuales fueron intoxicadas con diferentes dosis de CPF desde los 40 días de vida como se detalló en materiales y métodos.

Como se discutirá más adelante en este trabajo, las dosis utilizadas fueron seleccionadas de acuerdo a los límites internacionales, los cuales establecen una IDA de 0,01 mg/Kg/día y un NOAEL de 1,00 mg/Kg/día. Al final de los experimentos, los animales fueron sacrificados y se extrajeron muestras de glándula mamaria, hígado, ovario y sangre para realizar los diferentes estudios.

En este modelo, estudiamos el efecto del CPF sobre la histología y la funcionalidad hepática. Posteriormente, evaluamos los efectos sobre la histología mamaria y la expresión de los receptores de hormonas esteroideas (RE y RPg) en este tejido. A su vez, analizamos el efecto del CPF sobre los niveles séricos de hormonas esteroideas y gonadotrofinas y estudiamos los cambios en la esteroidogénesis, mediante la determinación del contenido ovárico de E₂, Pg y T.

Finalmente, estudiamos los efectos del plaguicida sobre la carcinogénesis mamaria, utilizando un modelo tumoral inducido por NMU. En estos animales, analizamos diferentes parámetros de desarrollo tumoral, las características histológicas de los tumores y la expresión de los receptores hormonales RE y RPg en este tejido.

Evaluación de los efectos tóxicos del CPF

Efectos del CPF sobre la actividad colinesterasa

En primer lugar, nos propusimos estudiar el efecto de las dosis de CPF seleccionadas sobre la actividad colinesterasa. Para ello, evaluamos la actividad AChE eritrocitaria y la actividad butirilcolinesterasa (BChE) plasmática en los animales intoxicados con diferentes dosis del plaguicida o vehículo. Como se observa en la figura II.1.A, las dosis de CPF utilizadas no indujeron modificaciones significativas en la actividad de la enzima AChE de los animales. Sin embargo, las ratas expuestas a CPF 1 mg/Kg/día presentaron una disminución del 49,1 % ($p < 0,001$) en la actividad BChE respecto a los animales control (Fig. II.1.B). Este parámetro no fue modificado por el CPF 0,01 mg/Kg/día.

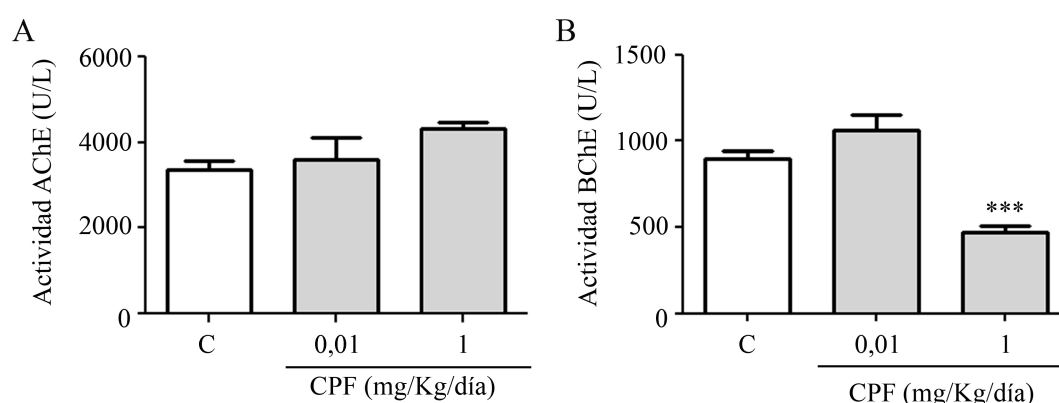


Figura II.1. Determinación de la actividad AChE y BChE. La actividad de las enzimas AChE (A) y BChE (B) fue cuantificada espectrofotométricamente en los glóbulos rojos o el plasma de los animales luego de la administración de CPF (0,01 y 1 mg/Kg/día) o vehículo (C) durante un período de 100 días. Los datos corresponden a la media \pm EEM de dos experimentos independientes. En cada ensayo, los grupos experimentales estuvieron conformados por seis animales (N=6) (***) $p < 0,001$; Análisis no paramétrico: prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de Dunn a posteriori).

Efectos del CPF sobre el peso corporal y la fisiología hepática

Con el fin de estudiar los efectos tóxicos ejercidos por las diferentes dosis de CPF sobre los animales, evaluamos el peso corporal y el peso del hígado de las ratas expuestas al plaguicida. Adicionalmente, dado que el hígado constituye el principal órgano de detoxificación de estos compuestos, evaluamos su histología al finalizar el período de experimentación. Cabe mencionar que las dosis seleccionadas no generaron signos de toxicidad severa en los animales. En la figura II.2.A se muestra la variación del peso corporal de los animales durante las últimas 8 semanas de intoxicación. Como puede observarse, ninguna de las dosis de CPF utilizadas produjo modificaciones en este parámetro. En el mismo sentido, no observamos diferencias en el peso de los hígados de los animales luego de 100 días de exposición a CPF (Fig. II.2.B).

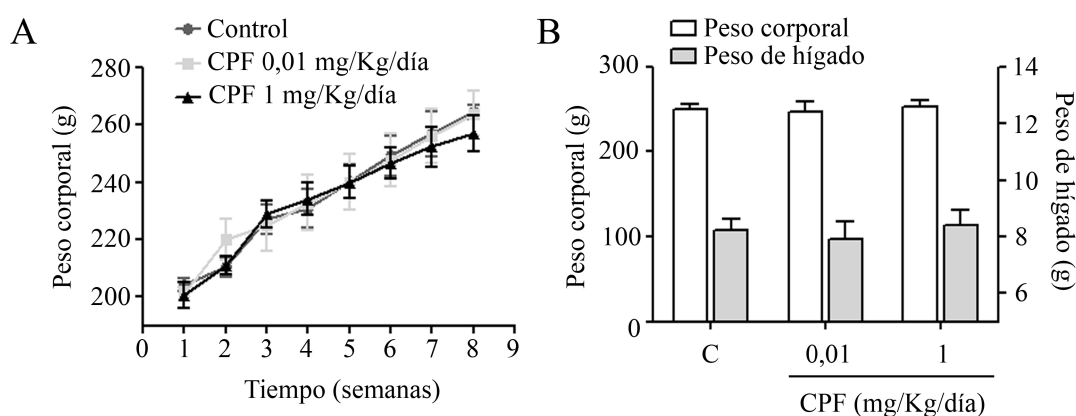


Figura II.2. Efecto del CPF sobre el peso corporal y el peso del hígado. A) Variación del peso corporal de los animales intoxicados con CPF (0,01 y 1 mg/Kg/día) o vehículo (Control) durante las últimas 8 semanas de experimentación. Se representa la media \pm DE de un experimento representativo; N=6 (p:ns; ANOVA de dos factores). B) Determinación del peso corporal y del peso de los hígados de los animales luego de la administración de CPF (0,01 y 1 mg/kg/día) o vehículo (C) durante un período de 100 días. Se representa la media \pm DE de un experimento representativo; N=6 (p:ns; Análisis no paramétrico: prueba de Kruskal-Wallis).

Debido a que no observamos modificaciones en el peso del hígado de los animales luego de la intoxicación con CPF, decidimos estudiar los efectos de este

plaguicida sobre la histología hepática y sobre diferentes parámetros que evalúan la funcionalidad de este órgano. En primer lugar, realizamos cortes histológicos del tejido hepático, los cuales fueron analizados en busca de signos de toxicidad. En la figura II.3 se muestran fotografías representativas de los cortes histológicos de los hígados de las ratas expuestas a CPF (0,01 y 1 mg/kg/día) o vehículo durante 100 días. Como puede observarse, los hígados de los animales expuestos a CPF 1 mg/kg/día presentaron ocasionales focos hemorrágicos y/o necróticos, los cuales no fueron observados en ninguno de los animales que recibieron vehículo durante la etapa experimental.

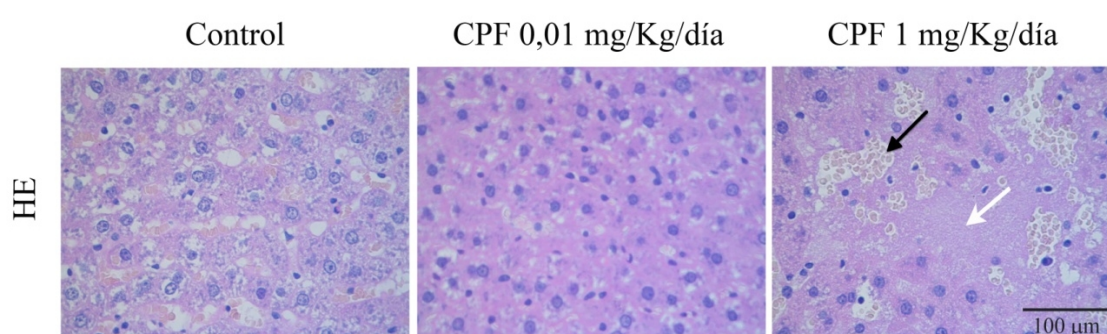


Figura II.3. Estudio histológico de los hígados de las ratas expuestas a CPF. Fotografías representativas de los hígados de las ratas luego de 100 días de administración de CPF (0,01 y 1 mg/kg/día) o vehículo (Control). Las fotografías fueron tomadas con un aumento de 630X. La flecha negra sobre la figura señala la presencia de glóbulos rojos característicos de los focos hemorrágicos. La flecha blanca señala la necrosis celular.

Con el fin de profundizar los estudios sobre los efectos tóxicos del plaguicida en nuestro modelo experimental, evaluamos la funcionalidad hepática mediante la medición de diferentes parámetros bioquímicos en el suero de las ratas expuestas a diferentes dosis de CPF o vehículo durante 100 días. Los resultados de estas determinaciones se muestran en la tabla II.1. Como puede observarse, ninguna de las dosis de CPF modificó significativamente la actividad de las enzimas evaluadas. Si bien se observó un incremento del 20 % (p:ns) en la actividad ASAT en los animales expuestos a CPF 1 mg/Kg/día respecto a los animales control, este incremento no fue significativo estadísticamente. Finalmente, la concentración de colesterol en el suero de

los animales tampoco resultó alterada por ninguna de las dosis de CPF utilizadas (Tabla II.1).

	ALAT (UI/L, 37 °C)	ASAT (UI/L, 37 °C)	Colesterol (mg/dl)
Control	31,9 ± 9,7	182,6 ± 50,3	72,2 ± 15,5
CPF 0,01 mg/Kg/día	28,0 ± 9,7	118,3 ± 26,2	67,6 ± 13,5
CPF 1 mg/Kg/día	39,4 ± 16,3	219,8 ± 95,9	73,4 ± 16,0

Tabla II.1. Estudio de la función hepática. Actividad de las enzimas ALAT, ASAT y la concentración de colesterol en suero de las ratas intoxicadas con CPF (0,01 y 1 mg/Kg/día) o vehículo durante 100 días. Para realizar las determinaciones, se analizaron los sueros de tres animales tomados al azar de cada grupo experimental, en dos experimentos independientes. Los datos corresponden a la media ± EEM (p:ns; Análisis no paramétrico: prueba de Kruskal-Wallis).

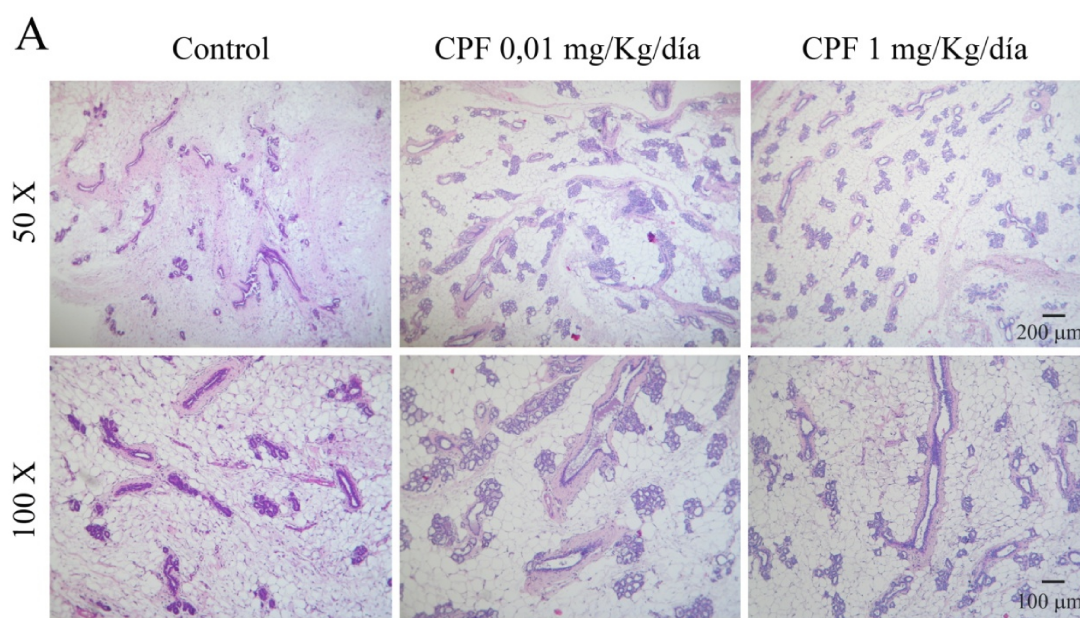
Estudios relacionados con el desarrollo de la glándula mamaria

Cómo se explicó anteriormente, la mama es un tejido que recibe gran influencia hormonal desde su desarrollo en la pubertad hasta la vida adulta, por lo cual representa un blanco de acción de muchos DEs. A continuación, detallaremos los estudios realizados sobre el tejido mamario de ratas expuestas a diferentes dosis de CPF (0,01 y 1 mg/Kg/día) o vehículo por un período de 100 días.

Estudio histopatológico

En el primer capítulo de esta tesis, demostramos que el cultivo de las células MCF-7 con bajas concentraciones de CPF (CPF 0,05 μ M), incrementa la proliferación celular a través de la acción del RE. Como mencionamos anteriormente, esas células derivan de un adenocarcinoma mamario humano y responden a los estímulos estrogénicos para su crecimiento. En esta parte del trabajo, evaluamos el efecto del CPF sobre el desarrollo de la glándula mamaria en ratas Sprague Dawley expuestas al tóxico de manera crónica. En la figura II.4, se muestran fotografías representativas del tejido mamario de los animales (Fig. II.4.A) junto con el recuento del número de ductos y

brotos alveolares presentes en los mismos (Fig. II.4.B). Como puede observarse, el tejido mamario de los animales que fueron intoxicados con el plaguicida presentó un mayor número de estructuras con respecto al de los animales que recibieron vehículo. De esta manera, las ratas tratadas con CPF 0,01 mg/Kg/día mostraron un incremento del 52 % ($p < 0,01$) en el número de ductos con respecto a los animales control. Este efecto no fue observado cuando los animales fueron expuestos a una mayor dosis del plaguicida (1 mg/Kg/día). En cuanto al número de brotes alveolares, observamos un incremento del 32 y el 27 % cuando los animales fueron intoxicados con CPF 0,01 y 1 mg/Kg/día respectivamente. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.



B

	Ductos	Brotos alveolares
Control	11,2 ± 2,9	61,8 ± 18,8
CPF 0,01 mg/Kg/día	17,1 ± 3,3**	81,6 ± 22,8
CPF 1 mg/Kg/día	12,6 ± 2,6	78,3 ± 26,1

Figura II.4. Efectos del CPF sobre la histología mamaria. **A)** Fotografías representativas de cortes histológicos del tejido mamario teñidos con HE provenientes de ratas luego de 100 días de administración de CPF (0,01 y 1 mg/kg/día) o vehículo (Control). Los aumentos en los que fueron tomadas las fotografías se indican en la figura. **B)** Cuantificación del número de ductos y brotes alveolares por campo, cuantificados en las fotografías tomadas con un aumento de 50 y

100X respectivamente. Se cuantificaron 5 campos tomados al azar de cada uno de los animales pertenecientes a los diferentes grupos experimentales (N=6). Los datos corresponden a la media \pm EEM de tres experimentos independientes (** $p < 0,01$ Análisis no paramétrico: prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de Dunn a posteriori).

La glándula mamaria puede sufrir una serie de alteraciones benignas entre las que se encuentran la fibrosis, los quistes simples, la hiperplasia, la adenosis y la mastitis. Estas afecciones son muy comunes por lo que se encuentran frecuentemente en la población. Si bien en su mayoría no presentan relación con el desarrollo de cáncer, algunas de estas afecciones se han asociado con un mayor riesgo de padecer posteriormente cáncer de mama (Guray and Sahin, 2006; Hofmann and Abernathy, 1993; Jensen et al., 1989; Kabat et al., 2011; Visscher et al., 2014).

En este trabajo, estudiamos la presencia de lesiones en la glándula mamaria de los animales luego de su exposición a diferentes dosis de CPF o vehículo durante 100 días. Las lesiones encontradas fueron en todos los casos benignas e incluyeron diferentes tipos de adenosis y la presencia de ductos hiperplásicos. Estas lesiones se hallaron tanto en los animales intoxicados con el plaguicida como en el grupo control.

La adenosis se caracteriza por la presencia de brotes alveolares agrandados. Los animales pertenecientes al grupo control y los expuestos a CPF 1 mg/Kg/día presentaron un porcentaje similar de adenosis ($9,4 \pm 5,8$ % y $12,5 \pm 8,1$ % respectivamente), mientras que el mismo se elevó hasta $24,3 \pm 12,0$ % en los animales expuestos a CPF 0,01 mg/Kg/día (Fig. II.5). Dentro de los diferentes tipos de adenosis observados, destacamos la presencia de adenosis esclerosante, un tipo especial en el cual los brotes alveolares agrandados se encuentran distorsionados por la presencia de tejido fibroso de apariencia cicatrizal a su alrededor. La atención especial a este tipo de adenosis se debe a que se ha descrito que el riesgo de padecer cáncer de mama se incrementa en las mujeres que presentan este tipo particular de lesión (Guray and Sahin, 2006; Jensen et al., 1989; Visscher et al., 2014). En nuestros ensayos, observamos un incremento en el porcentaje de adenosis esclerosante en el tejido mamario de los animales expuestos al CPF 0,01 mg/Kg/día ($5,88 \pm 3,8$ %) respecto al grupo de animales control ($1,5 \pm 1,3$ %),

sin embargo, no observamos diferencias cuando los animales fueron intoxicados con CPF 1 mg/Kg/día ($1,47 \pm 1,29$ %).

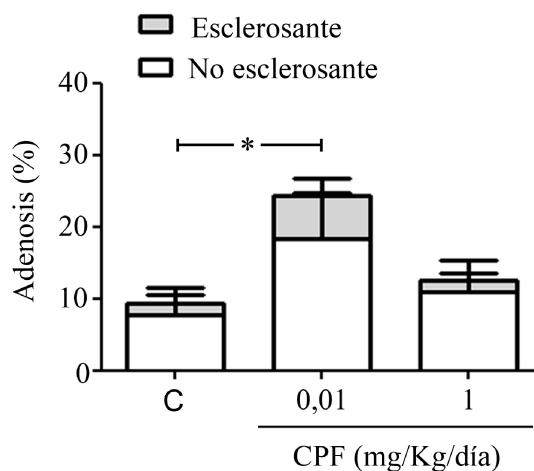


Figura II.5. Efectos del CPF sobre el porcentaje de adenosis. Cuantificación del porcentaje de brotes alveolares presentando adenosis, la cual fue clasificada como esclerosante o no esclerosante de acuerdo a la histología de la lesión. Se cuantificaron 5 campos tomados al azar de cada uno de los animales pertenecientes a los diferentes grupos experimentales (N=6). Los datos corresponden a la media \pm EEM, de tres experimentos independientes. En el análisis estadístico se comparó el porcentaje de brotes alveolares presentando adenosis (esclerosante y no esclerosante) (* $p < 0,05$ vs. C), el porcentaje de brotes alveolares presentando adenosis esclerosante (p:ns vs. C) y el porcentaje de brotes alveolares presentando adenosis no esclerosante (p:ns vs. C). En todos los casos se realizó un análisis no paramétrico de los datos: prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de Dunn a posteriori.

Como mencionamos recientemente, el otro tipo de lesión benigna que encontramos en el tejido mamario de los animales fue la hiperplasia ductal. El término hiperplasia refiere al aumento en el número de células que forman un tejido. En particular, en el tejido mamario, esta proliferación puede darse tanto en los ductos (hiperplasia ductal) como en los brotes alveolares (hiperplasia lobulillar). En nuestros experimentos, observamos la presencia de hiperplasia del tipo usual (sin atipias) en los ductos de los animales pertenecientes a los tres grupos experimentales. Como se

observa en la figura II.6, el tratamiento de los animales con CPF (0,01 y 1 mg/Kg/día) incrementó el porcentaje de ductos hiperplásicos con respecto al grupo control. En este sentido, los animales expuestos al vehículo presentaron el $35,1 \pm 8,5$ % de sus ductos hiperplásicos y este porcentaje se incrementó hasta el $41,2 \pm 4,5$ y $45,6 \pm 7,1$ % cuando las ratas fueron expuestas a CPF 0,01 y 1 mg/Kg/día respectivamente. Si bien el incremento fue observado en los dos grupos experimentales, el mismo fue significativo estadísticamente solo para el grupo de animales intoxicado con CPF 1 mg/Kg/día ($p < 0,05$).

Dentro de las hiperplasias ductales, se pueden distinguir diferentes lesiones de acuerdo a la histología de las mismas. De esta forma, podemos clasificar a las hiperplasias como moderadas o floridas de acuerdo al número de capas de células epiteliales que revisten los ductos. La hiperplasia moderada se caracteriza por presentar entre 2 y 4 capas celulares revistiendo los ductos, mientras que la hiperplasia ductal se considera florida cuando el número de capas de células epiteliales es superior a 4, llegando generalmente a obliterar por completo la luz ductal.

En nuestro estudio observamos la presencia de hiperplasia ductal moderada en todos los grupos experimentales. En los animales expuestos a vehículo y a CPF 1 mg/Kg/día observamos un porcentaje similar de hiperplasia ductal moderada ($25,0 \pm 12,5$ % y $19,8 \pm 12,8$ % respectivamente), mientras que en los animales intoxicados con CPF 0,01 mg/Kg/día, este porcentaje fue del $8,8 \pm 6,7$ % ($p:ns$). Sin embargo, observamos un incremento significativo en el porcentaje de hiperplasia ductal florida en el tejido mamario de los animales expuestos a ambas dosis del plaguicida con respecto al grupo control (Fig. II.6.A). Los animales expuestos al vehículo presentaron hiperplasia florida en el $10,1 \pm 5,7$ % de sus ductos, mientras que este porcentaje se incrementó hasta $32,3 \pm 8,0$ % y $28,7 \pm 9,1$ % en los animales intoxicados con CPF 0,01 y 1 mg/Kg/día, respectivamente. En este tipo de lesiones, pudimos observar un alto grado de anisocariosis, macrocariosis y superposición celular en la luz ductal. Estas características evidencian una alta tasa de proliferación que conlleva a la acumulación de células dentro del ducto. Además fue frecuente observar discontinuidad en la capa de células mioepiteliales que rodea a los ductos así como también la distensión de los ductos debido a la proliferación excesiva de las células epiteliales (Fig. II.6.D y G).

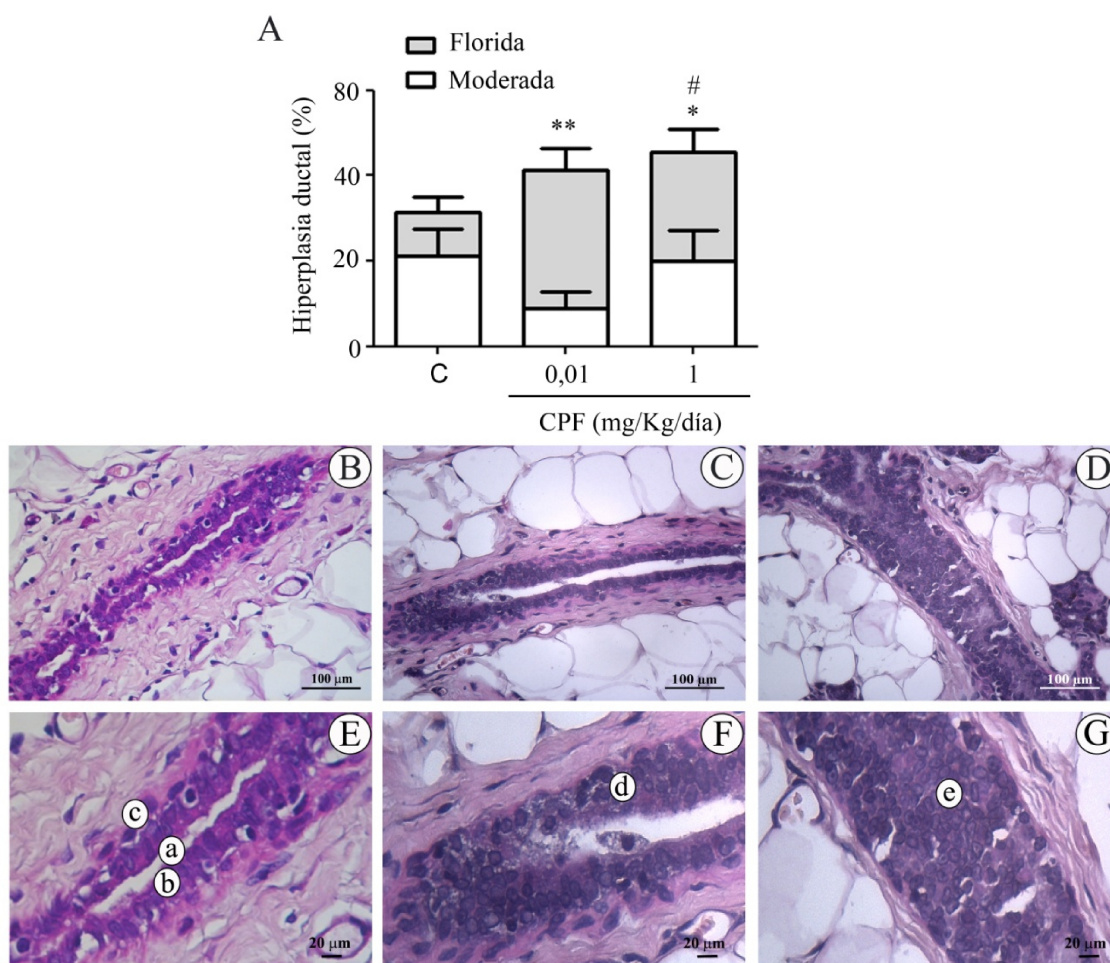


Figura II.6. Efectos del CPF sobre el porcentaje de ductos hiperplásicos. **A)** Cuantificación del porcentaje de ductos presentando hiperplasia usual (sin atipias). Las lesiones fueron clasificadas como moderadas o floridas. Se cuantificaron 5 campos tomados al azar de cada uno de los animales pertenecientes a los diferentes grupos experimentales (N=6). Los datos corresponden a la media \pm EEM de tres experimentos independientes. Se comparó el porcentaje total de ductos hiperplásicos (# p <0,05 vs. C), el porcentaje de ductos con hiperplasia florida (* p <0,05, ** p <0,01 vs. C) y el porcentaje de ductos con hiperplasia moderada (p :ns vs. C). En todos los casos se realizó un análisis no paramétrico de los datos: prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de Dunn a posteriori. **B)** Fotografías representativas de un ducto normal, **C)** un ducto con hiperplasia moderada y **D)** un ducto con hiperplasia florida. Aumento 400X. Debajo de cada fotografía se muestra un fragmento amplificado digitalmente (**E**, **F**, **G**) con el fin de ilustrar la luz ductal (**a**), la capa de células epiteliales (**b**) y mioepiteliales (**c**) que conforman a un ducto normal; la proliferación celular observada en la hiperplasia moderada (**d**) y la obliteración ductal característica de la hiperplasia florida (**e**).

Expresión de la proteína PCNA en la glándula mamaria

Debido a que observamos un mayor número de estructuras y un incremento en el porcentaje de adenosis e hiperplasia en el tejido mamario de las ratas expuestas crónicamente a CPF, decidimos evaluar la proliferación celular en este tejido luego de la intoxicación de los animales con diferentes dosis del plaguicida. Existen varios métodos que evalúan la capacidad proliferativa de un tejido, entre ellos se encuentra la determinación inmunohistoquímica de PCNA. Esta proteína juega un papel crucial en la replicación del ADN siendo una proteína auxiliar de la polimerasa . Su expresión se encuentra elevada durante la fase S del ciclo celular y se expresa en el núcleo de las células que se están dividiendo activamente (Kelman, 1997). Como se observa en la figura II.7, el tratamiento de las ratas con CPF 1 mg/Kg/día condujo a un incremento significativo del número de células epiteliales PCNA positivas ($21,8 \pm 3,3$ %) con respecto al encontrado en el grupo control ($4,7 \pm 1,9$ %). Cuando las ratas fueron intoxicadas con CPF 0,01 mg/Kg/día, si bien se observó un mayor porcentaje de células expresando PCNA ($11,3 \pm 2,7$ %), la diferencia con el porcentaje encontrado en el grupo control no resultó estadísticamente significativa (Fig. II.7).

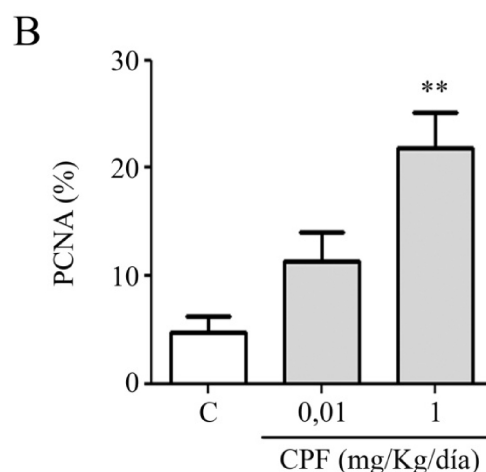
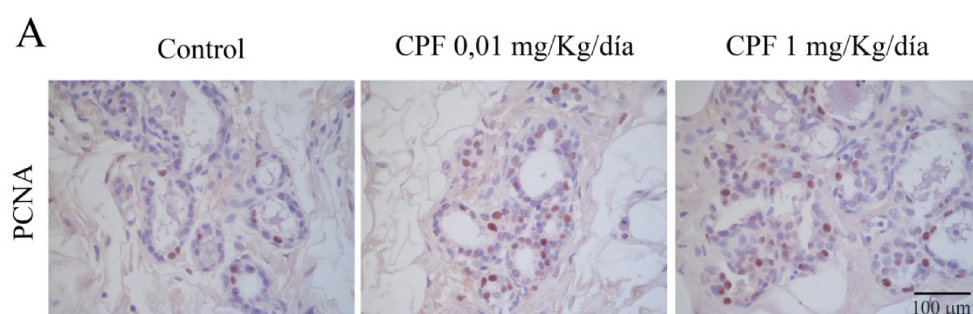


Figura II.7. Expresión de PCNA en tejido mamario de ratas expuestas a CPF. **A)** Fotografías representativas que ilustran la expresión del antígeno PCNA evaluado por inmunohistoquímica en la glándula mamaria de las ratas luego de 100 días de exposición a CPF (0,01 y 1 mg/kg/día) o vehículo (Control). Los núcleos positivos se observan coloreados de marrón. Aumento 630X. **B)** Representación gráfica del porcentaje de células positivas para PCNA calculado como el número de células PCNA positivas/número de células totales por campo de 630X. Se cuantificaron 5 campos tomados al azar de cada uno de los animales pertenecientes a los diferentes grupos experimentales (N=6). Los valores corresponden a la media \pm EEM de dos experimentos independientes (* $p < 0,05$; ANOVA de un factor y Test Dunnett a posteriori).

Efectos del CPF sobre la expresión de receptores esteroideos en la glándula mamaria

Nuestros experimentos realizados en líneas celulares tumorigénicas mamarias indicaron que el CPF modifica la proliferación celular a través del RE. Adicionalmente, en este capítulo mostramos que el CPF produce modificaciones en la histología mamaria relacionadas con cambios proliferativos que se acompañan con una mayor expresión de PCNA. Con el fin de estudiar el efecto del CPF sobre los receptores de hormonas esteroideas en este modelo, evaluamos la expresión del RE y del RPg en el tejido mamario de los animales expuestos al tóxico durante 100 días.

En la figura II.8 se muestra el efecto del plaguicida sobre la expresión del RPg. La expresión de este receptor fue realizada por dos metodologías diferentes, por un lado, realizamos la determinación mediante inmunohistoquímica en cortes histológicos de la glándula mamaria de las ratas pertenecientes a los diferentes grupos experimentales y, en segundo lugar, cuantificamos su expresión mediante western blot en este tejido. Si bien no se observaron diferencias significativas, el tratamiento de las ratas con CPF 1 mg/Kg/día incrementó levemente la expresión del RPg. De esta forma, en los cortes histológicos de los animales control, observamos un $12,2 \pm 3,0$ % de los núcleos positivos para el RPg, mientras que este porcentaje se incrementó hasta $19,1 \pm 7,1$ % en las mamas de los animales intoxicados con CPF 1 mg/Kg/día (Fig. II.8.A). El mismo resultado fue observado en la determinación por western blot (Fig. II.8.B). La

expresión del RPg tampoco fue modificada significativamente en la glándula mamaria de los animales intoxicados con CPF 0,01 mg/Kg/día.

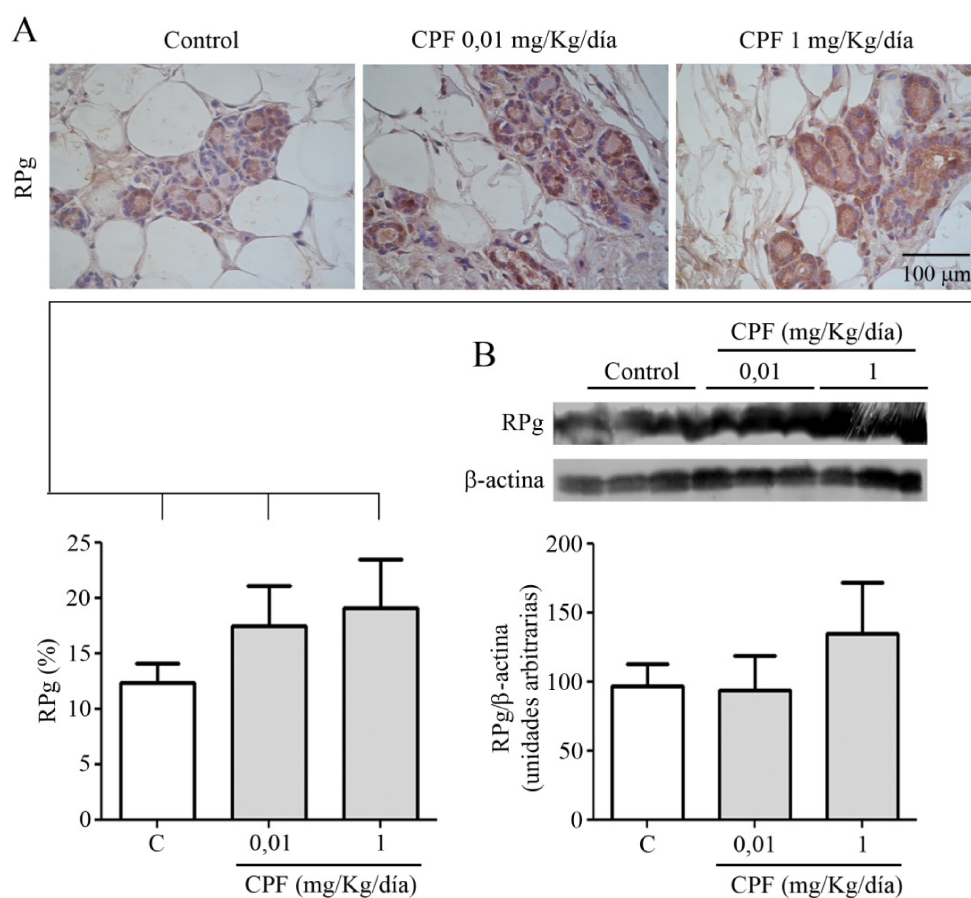


Figura II.8. Expresión del RPg en tejido mamario de ratas expuestas a CPF. **A)** Fotografías representativas que ilustran la expresión del RPg evaluado por inmunohistoquímica en la glándula mamaria de ratas luego de 100 días de exposición a CPF (0,01 y 1 mg/kg/día) o vehículo (Control). Los núcleos positivos se observan coloreados de marrón. Aumento 630X. Debajo de las fotografías se grafica el porcentaje células positivas para el RPg calculado como el número de células RPg positivas/número de células totales por campo de 630X. Se cuantificaron 5 campos tomados al azar de cada uno de los animales pertenecientes a los diferentes grupos experimentales (N=6). Los valores corresponden a la media \pm EEM de dos experimentos independientes (p:ns; Análisis no paramétrico: prueba de Kruskal-Wallis). **B)** Determinación por western blot de la expresión del RPg en la glándula mamaria de los animales. Se muestran las fotografías de un experimento representativo. Debajo de cada grupo de fotografías, se representa gráficamente la cuantificación densitométrica de la señal correspondiente al RPg normalizada respecto al contenido de β -actina para cada grupo

experimental. Las barras representan la media \pm EEM de dos experimentos independientes (p:ns; Análisis no paramétrico: prueba de Kruskal-Wallis).

Por otra parte, evaluamos la expresión y la fosforilación del RE . La expresión de este receptor fue determinada por inmunohistoquímica, mientras que su fosforilación fue evaluada mediante western blot utilizando un anticuerpo específico para la detección de su forma fosforilada en la tirosina ubicada en la posición 537 de la cadena polipeptídica. Como se observa en la figura II.9.A, la exposición de las ratas a ambas dosis de CPF no produjo modificaciones en el número de células que expresaron el RE . Sin embargo, observamos una disminución significativa en la fosforilación de este receptor en la glándula mamaria de los animales intoxicados con CPF 1 mg/Kg/día respecto al grupo control.

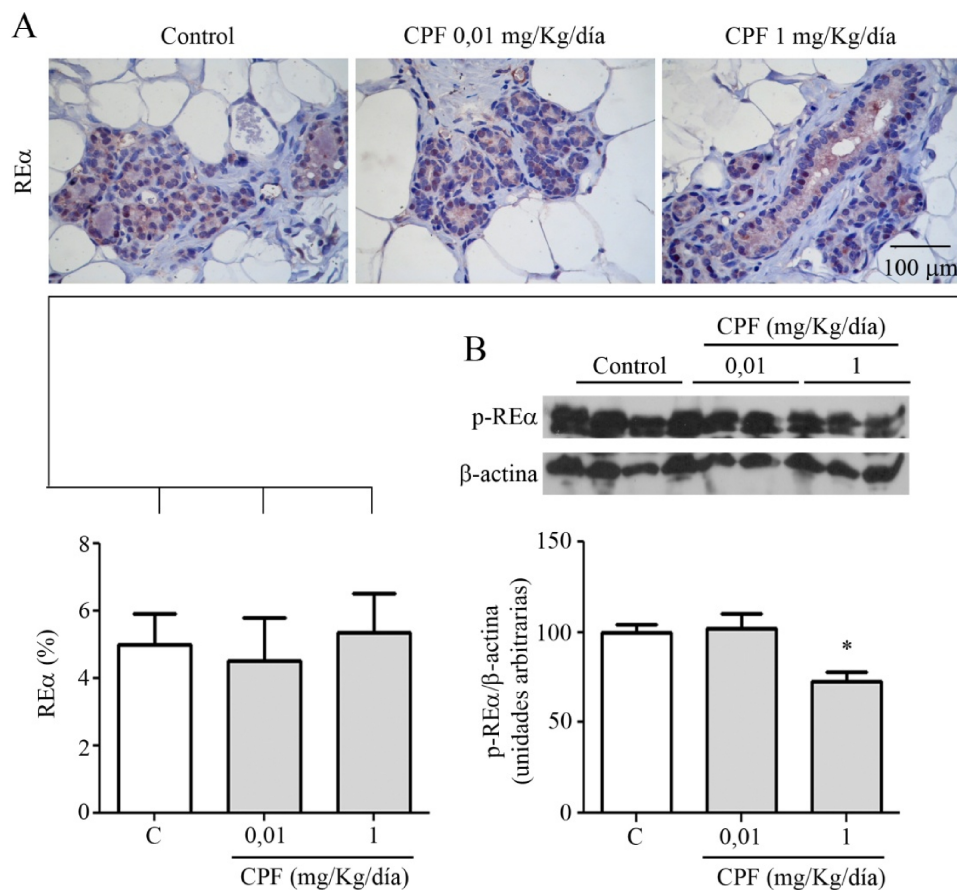


Figura II.9. Expresión del RE y cuantificación de su nivel de fosforilación en tejido mamario de ratas expuestas a CPF. A) Fotografías representativas que ilustran la expresión del RE evaluado por inmunohistoquímica en la glándula mamaria de ratas luego de 100 días de exposición a CPF (0,01 y 1 mg/kg/día) o vehículo (Control). Los núcleos positivos se observan coloreados de marrón. Aumento 630X. Debajo de las fotografías se grafica el porcentaje de células positivas para el RE calculado como el número de células RE positivas/número de células totales por campo de 630X. Se cuantificaron 5 campos tomados al azar de cada uno de los animales pertenecientes a los diferentes grupos experimentales (N=6). Los valores corresponden a la media \pm EEM de dos experimentos independientes (p:ns; Análisis no paramétrico: prueba de Kruskal-Wallis). B) Determinación por western blot de la expresión del p-RE en la glándula mamaria de los animales. Se muestran las fotografías de un experimento representativo. Debajo de las fotografías se representa gráficamente la cuantificación densitométrica de la señal correspondiente al p-RE normalizada respecto al contenido de actina para cada grupo experimental. Las barras representan la media \pm EEM de dos experimentos independientes (*p<0,05; Análisis no paramétrico: prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de Dunn a posteriori).

Efectos sobre el sistema endócrino

Efectos del CPF sobre los niveles de hormonas esteroideas

Como se mencionó anteriormente, los DEs pueden afectar la síntesis, el metabolismo o la función de las hormonas. Para evaluar la acción del CPF como posible DE, estudiamos el efecto de este tóxico sobre los niveles séricos de diferentes hormonas esteroideas involucradas en el desarrollo y la diferenciación del tejido mamario, como son el E₂, la Pg y la T. Los niveles circulantes de estas hormonas fueron determinados por radioinmunoensayo en el suero de las ratas expuestas a diferentes dosis de CPF o vehículo durante un período de 100 días. Debido a la fluctuación característica de estas hormonas a lo largo del ciclo estral, los sueros de los animales fueron obtenidos cuando los mismos se encontraban en la fase estro del ciclo. Los resultados obtenidos se muestran en la figura II.10. Los animales del grupo control presentaron una concentración promedio de E₂ de $22,29 \pm 6,32$ pg/ml. Sin embargo, este valor fue disminuido en un 47 % (p<0,05) cuando los animales recibieron CPF 1 mg/Kg/día ($11,71 \pm 3,00$ pg/ml). En los animales que se expusieron a CPF 0,01 mg/Kg/día los

niveles promedio de esta hormona no se modificaron significativamente respecto al grupo control ($23,67 \pm 10,19$ pg/ml). Sin embargo, los animales de este grupo se distribuyeron en dos poblaciones bien diferenciadas, encontrándose animales con niveles de E_2 mayores a la media del grupo y otros muy por debajo de la misma (Fig. II.10.A).

También se determinaron los niveles de Pg en todos los grupos de animales. Los niveles séricos de esta hormona en el grupo control fueron de $4,03 \pm 0,85$ ng/ml. En las ratas tratadas con CPF 0,01 mg/Kg/día los niveles de Pg fueron similares a los obtenidos en el grupo control, obteniéndose un promedio de $4,23 \pm 1,47$ ng/ml. Por otra parte, cuando los animales fueron expuestos a CPF 1 mg/Kg/día, el nivel de Pg sérica se redujo significativamente llegando a un valor medio de $2,07 \pm 0,75$ ng/ml (Fig. II.10.B).

Finalmente, los niveles de T no fueron afectados por ninguna de las dosis de CPF utilizadas (Fig. II.10.C).

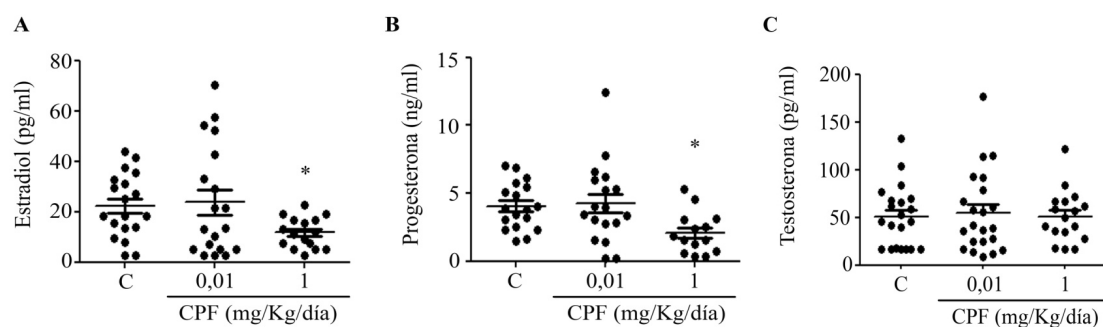


Figura II.10. Efecto de CPF sobre los niveles de hormonas esteroideas. Niveles de A) Estradiol, B) Progesterona y C) Testosterona, en suero de las ratas luego de 100 días de exposición a CPF (0,01 y 1 mg/kg/día) o vehículo (C). Cada punto representa la concentración hormonal en suero de una rata. Se muestran los resultados de animales pertenecientes a tres experimentos independientes. Sobre cada grupo de puntos se representa la media \pm EEM (*p<0,05; Análisis no paramétrico: prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de Dunn a posteriori).

Efectos del CPF sobre la esteroidogénesis

Los DEs ejercen su efecto mediante diversos mecanismos. Como observamos anteriormente, la intoxicación de los animales con CPF 1 mg/Kg/día condujo a una disminución en los niveles de E₂ y Pg circulantes. Por este motivo, decidimos evaluar el efecto del plaguicida sobre la síntesis ovárica de las hormonas esteroideas. Para ello, los animales fueron intoxicados con diferentes dosis del plaguicida o vehículo durante 100 días y los niveles de E₂, Pg y T fueron evaluados en el ovario. Como se observa en la tabla II.2, el CPF 1 mg/Kg/día disminuyó el contenido ovárico de E₂ en un 74 % (p<0,05). Cuando los animales fueron intoxicados con CPF 0,01 mg/Kg/día observamos una leve disminución en el contenido ovárico de E₂, sin embargo, esta variación no fue significativa estadísticamente. Un resultado similar se observa al analizar el contenido de T, a medida que se incrementa la dosis del plaguicida, disminuye levemente el contenido de este esteroide, pasando de 1924,2 ± 692,2 pg en los ovarios de las ratas control a 1697,4 ± 47,1 y 1134,0 ± 329,5 pg en los ovarios de las ratas intoxicadas con el CPF 0,01 y 1 mg/Kg/día respectivamente. Por otra parte, el CPF 1 mg/Kg/día incrementó el contenido de Pg en los ovarios en un 44,7 % (p:ns) pasando de 96,8 ± 18,2 ng en los ovarios de las ratas control a 140,1 ± 32,0 ng cuando los animales fueron intoxicados con CPF 1 mg/Kg/día (Tabla II.2).

	E ₂ (ng)	T (pg)	Pg (ng)	Peso ovario (mg)
Control	1385,4 ± 507,3	1924,2 ± 692,2	96,8 ± 18,2	26,58 ± 2,98
CPF 0,01 mg/Kg/día	640,7 ± 254,0	1697,4 ± 476,1	79,5 ± 30,8	21,68 ± 2,15
CPF 1 mg/Kg/día	363,3 ± 224,4*	1134,0 ± 329,5	140,1 ± 32,0	29,38 ± 4,81

Tabla II.2. Efecto del CPF sobre el contenido ovárico de hormonas esteroideas. Los niveles de E₂, Pg y T fueron determinados en el ovario de ratas intoxicadas durante 100 días con CPF (0,01 y 1 mg/Kg/día) o vehículo (Control). En la columna de la derecha se informan los pesos de los ovarios de los animales pertenecientes a cada grupo experimental. Los datos corresponden a la media ± DE para cada grupo de un ensayo representativo (N=6) (*p<0,05 Análisis no paramétrico: prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de Dunn a posteriori).

Efecto del CPF sobre los niveles de gonadotrofinas

Como describimos en la introducción de este trabajo, la esteroidogénesis ovárica se encuentra estrictamente regulada por las hormonas LH y FSH, las cuales son liberadas desde la adenohipófisis al torrente sanguíneo. Debido a que observamos alteraciones en el contenido ovárico y en los niveles circulantes de hormonas esteroideas, nos propusimos evaluar los niveles séricos de las gonadotrofinas LH y FSH luego de 100 días de intoxicación con diferentes dosis de CPF o vehículo. Como se observa en la figura II.11.A, la intoxicación de los animales con ambas dosis de CPF, condujo a una disminución significativa en los niveles de LH. Específicamente, en los animales del grupo control encontramos una concentración de LH de $2,80 \pm 0,20$ ng/ml, mientras que en los animales intoxicados con CPF 0,01 y 1 mg/Kg/día la concentración de esta hormona fue de $1,43 \pm 0,15$ y $1,97 \pm 0,28$ ng/ml respectivamente. No observamos cambios significativos en los niveles de FSH en los animales expuestos al tóxico (Fig. II.11.B).

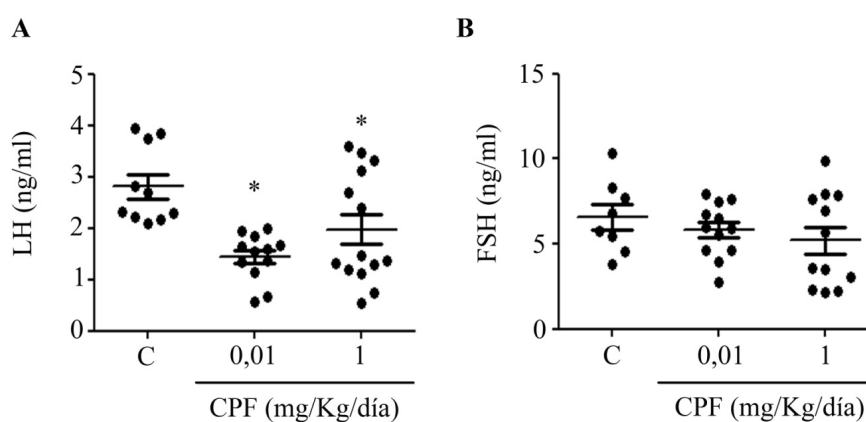


Figura II.11. Efecto de CPF sobre los niveles de gonadotrofinas. Niveles séricos de las hormonas hipofisarias **A)** LH y **B)** FSH en suero de las ratas luego de 100 días de exposición a CPF (0,01 y 1 mg/kg/día) o vehículo (C). Cada punto representa la concentración hormonal en suero de una rata. Se muestran los resultados de animales pertenecientes a dos experimentos independientes. Sobre cada grupo de puntos se representa la media \pm EEM (* $p < 0,05$; Análisis no paramétrico: prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de Dunn a posteriori).

Efectos del CPF sobre la carcinogénesis mamaria

Recientemente describimos los cambios histológicos sobre la glándula mamaria y la alteración en los niveles de hormonas esteroideas presentes en el suero de los animales expuestos de forma crónica al CPF. Adicionalmente, en el primer capítulo de esta tesis describimos la proliferación celular inducida por el plaguicida en la línea celular MCF-7. En conjunto, estos resultados, indican que el CPF podría actuar como un DE alterando el desarrollo normal de la glándula mamaria, lo cual podría derivar en una mayor predisposición al desarrollo de cáncer en este tejido. A la luz de nuestros resultados, decidimos estudiar el efecto del CPF sobre la carcinogénesis mamaria utilizando un modelo de carcinogénesis inducida químicamente en ratas hembras de la cepa Sprague Dawley.

Los tumores mamarios inducidos por el carcinógeno químico NMU, constituyen un modelo de carcinogénesis experimental de reconocidas similitudes con el cáncer de mama humano (Rivera et al., 1994). En vista de los resultados obtenidos en nuestro trabajo, decidimos utilizar este modelo para estudiar el efecto del CPF sobre la carcinogénesis mamaria. Para ello, se utilizaron ratas de la cepa Sprague Dawley las cuales se expusieron a diferentes dosis de CPF (0,01 y 1 mg/Kg/día) o vehículo a partir de los 40 días de vida y por un período de 140 días. El procedimiento de inducción tumoral se detalla en el apartado de materiales y métodos de esta tesis y consta de 3 inyecciones del carcinógeno NMU a los 50, 80 y 110 días de vida de los animales. En este modelo, estudiamos diferentes parámetros de evolución tumoral, la histología de los tumores y la expresión de los receptores RE y RPg.

Efectos del CPF sobre los parámetros de evolución tumoral

Entre los parámetros que describen la evolución tumoral, se encuentran la incidencia y el período de latencia tumoral. La incidencia tumoral se define como el porcentaje de animales con al menos un tumor en cada grupo de animales. Como se observa en la figura II.12.A, este parámetro fue cercano al 100 % en todos los grupos experimentales. Sin embargo, en los grupos intoxicados con CPF 0,01 y 1 mg/Kg/día este porcentaje se alcanzó luego de 100 y 110 días posteriores a la primera inyección de NMU respectivamente, mientras que en el grupo control, el mismo porcentaje se

alcanzó luego de 130 días posteriores a la primera inyección del carcinógeno. Esta diferencia refleja una disminución en el período de latencia tumoral en los animales intoxicados con el plaguicida.

El período de latencia tumoral se define como los días transcurridos entre la primera inyección de NMU y la aparición del primer tumor en cada animal. Este parámetro fue evaluado en los animales expuestos a ambas dosis de CPF (0,01 y 1 mg/Kg/día) o vehículo (Fig.II.12.B). Como puede observarse, los animales expuestos a CPF presentaron un menor período de latencia tumoral que aquellos pertenecientes al grupo control. El tiempo transcurrido entre la primera inyección de NMU y la aparición del primer tumor fue $96,3 \pm 7,5$ días y de $97,0 \pm 5,7$ días en los animales intoxicados con CPF 0,01 y 1 mg/Kg/día, respectivamente, mientras que éste parámetro se elevó a $111,6 \pm 3,7$ días en los animales del grupo control.

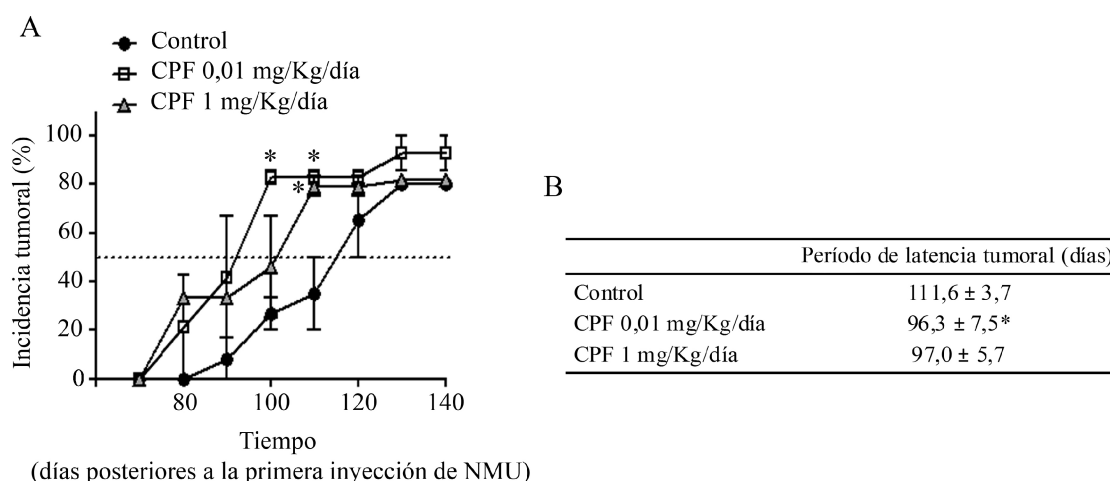


Figura II.12. Efecto del CPF sobre la incidencia y el período de latencia tumoral. **A)** En el gráfico se muestra la incidencia tumoral de cada grupo experimental en función del tiempo (días posteriores a la primera inyección de NMU). Se define a la incidencia tumoral como el porcentaje de animales que desarrollaron al menos un tumor en cada grupo. La intersección de las curvas con la línea punteada, indica el tiempo en que el 50 % de los animales portaron por lo menos un tumor (* $p < 0,05$ vs C en el tiempo especificado; Análisis no paramétrico: prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de Dunn a posteriori). **B)** El periodo de latencia tumoral

se expresa como los días transcurridos entre la primera inyección de NMU y la aparición del primer tumor en cada animal. Los datos corresponden a la media \pm EEM de cada grupo experimental (N=6), de dos experimentos independientes (* $p < 0,05$; Análisis no paramétrico: prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de Dunn a posteriori).

Con el fin de profundizar nuestros estudios, evaluamos el número de tumores desarrollados en cada animal luego de la exposición al tóxico. Nuestros resultados indicaron que el tratamiento de los animales con CPF 1 mg/Kg/día incrementa el número promedio de tumores por rata respecto a los animales control. Como se observa en la figura II.13, al final del experimento los animales del grupo control presentaron un promedio de $1,5 \pm 0,6$ tumores por rata, mientras que el grupo expuesto a CPF 1 mg/Kg/día exhibió $3,0 \pm 0,8$ tumores por rata. En cuanto a los animales intoxicados con CPF 0,01 mg/Kg/día, no observamos modificaciones en este parámetro luego de 140 días de exposición.

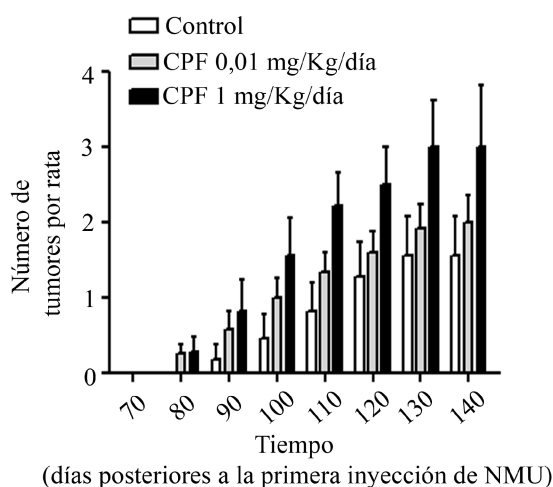


Figura II.13. Efecto del CPF sobre el número de tumores por rata. En el gráfico se representa el número promedio de tumores por rata de cada lote (N=6) en función del tiempo (días posteriores a la primera inyección de NMU). Se representa la media \pm EEM de dos experimentos independientes (p:ns; ANOVA de dos factores).

Finalmente, estudiamos el efecto del CPF sobre el crecimiento y el tiempo de duplicación tumoral. El efecto del CPF sobre la velocidad de crecimiento tumoral fue

determinado controlando el diámetro de los tumores a lo largo del período de tratamiento como se describe en el apartado de materiales y métodos. Como se muestra en la figura II.14.A, el CPF no modificó significativamente el crecimiento tumoral en ninguna de las dosis utilizadas. Sin embargo, los tumores de los animales intoxicados con CPF 0,01 mg/Kg/día, presentaron una velocidad de crecimiento levemente menor a la de los tumores del grupo control, lo cual se evidencia en un mayor tiempo de duplicación tumoral (Fig. II.14.B). De esta manera, el tiempo de duplicación tumoral para los animales del grupo control fue de $7,73 \pm 1,62$ días, el cual fue similar a los observados en los animales intoxicados con CPF 1 mg/Kg/día ($7,58 \pm 2,25$ días), mientras que los tumores de los animales intoxicados con CPF 0,01 mg/Kg/día presentaron un tiempo de duplicación de $8,47 \pm 0,89$ días.

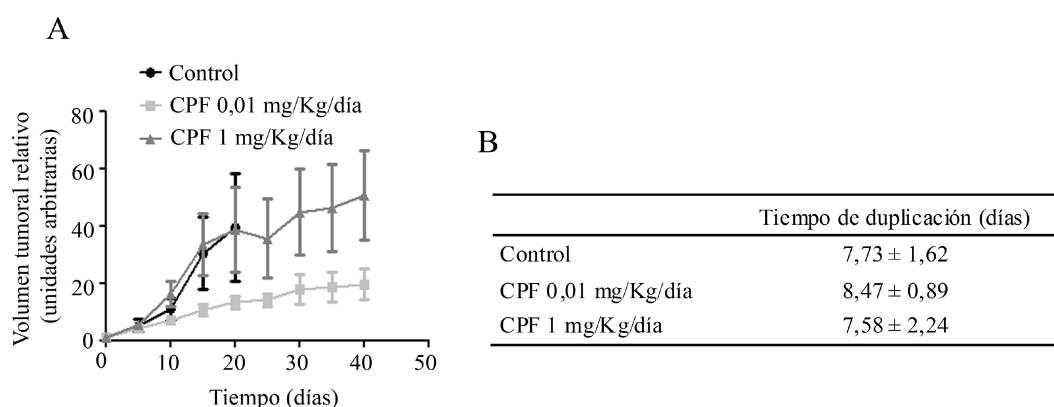


Figura II.14. Efecto del CPF sobre el tiempo de duplicación tumoral. **A)** El gráfico muestra la variación del volumen tumoral relativo en función del tiempo. Para cada tumor, el día 0 corresponde al día en que fue detectado. Se representa la media \pm EEM de dos experimentos independientes (p:ns, ANOVA de dos factores). **B)** El tiempo de duplicación tumoral fue determinado a partir de las curvas de crecimiento tumoral como se describió en materiales y métodos. En la tabla se muestran los tiempos promedio de duplicación tumoral \pm EEM para los grupos control y tratados con CPF en las dosis especificadas (p:ns; ANOVA de un factor).

Efecto del CPF sobre la histología tumoral mamaria

Como describimos anteriormente, la exposición de los animales a diferentes dosis del plaguicida CPF produjo modificaciones en el período de latencia y en el

número de tumores por rata, sin alterar la velocidad de crecimiento de los tumores. Con el fin profundizar el estudio de los efectos de este plaguicida sobre la carcinogénesis mamaria, estudiamos la histología y la expresión de diferentes proteínas en los tumores inducidos químicamente en los animales expuestos a vehículo o a diferentes dosis de CPF. El análisis histológico mostró que todos los tumores desarrollados en las ratas fueron carcinomas del tipo adenoide quístico de origen ductal, con presencia de focos necróticos de tipo comedogénicos. Los patrones de crecimiento observados fueron principalmente de tipo cribiforme, caracterizado por la formación de luces glandulares (Fig. II.15.A), o un patrón de crecimiento sólido (Fig. II.15.C). Estas características fueron similares en los tumores pertenecientes a las ratas tratadas con CPF y en los animales del grupo control. En la figura II.15 se muestran imágenes representativas de los tumores desarrollados y se señalan las principales características histológicas de los mismos.

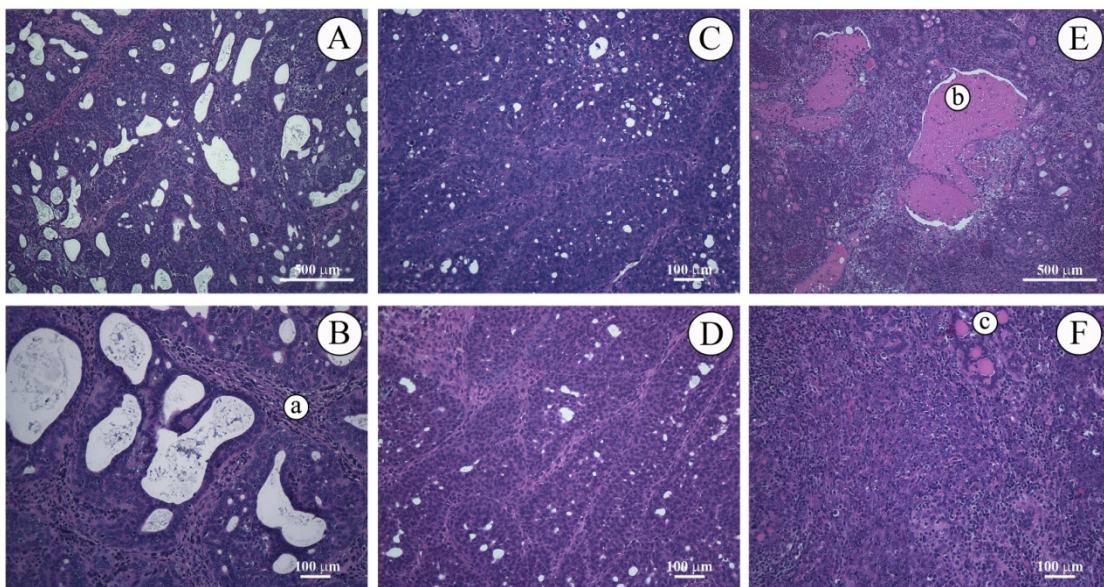


Figura II.15. Histología tumoral. Fotografías representativas que ilustran la histología de los tumores, la cual fue similar en todos los grupos experimentales. **A)** Carcinoma adenoide quístico, que sigue un patrón de crecimiento cilindromatoso con formación de luces glandulares (patrón cribiforme). Aumento: 100X. **B)** Mayor detalle de la neoplasia correspondiente al mismo caso. Nótese el estroma desmoplásico circundante (**a**). Aumento: 200X. **C)** Carcinoma adenoide quístico con un patrón de crecimiento predominantemente sólido. Aumento: 200X. **D)** Mismo caso anterior, donde se detalla una disposición trabecular de la neoplasia. Aumento: 200X. **E)** Carcinoma adenoide quístico presentando diferentes patrones de crecimiento: sectores

de crecimiento sólido, sectores cribiformes y sectores con distribución difusa. Nótese los múltiples focos de necrosis tipo comedo (**b**). Aumento: 100X. **F**) Detalle de un sector del mismo caso anterior en donde se evidencia la distribución celular difusa con elevada tasa de proliferación, que coexiste con un foco de crecimiento basaloide (**c**) que describe luces glandulares rodeando material eosinófilo denso. Aumento: 200X.

Con el objetivo de estudiar el efecto del CPF sobre la proliferación de las células tumorales, evaluamos la expresión de la proteína PCNA en cortes histológicos de los tumores obtenidos en los diferentes grupos experimentales. Como se observa en la figura II.16, el tratamiento de los animales con CPF no modificó significativamente la expresión de PCNA en los tumores con respecto al tratamiento control. Los porcentajes promedio de células positivas fueron $17,24 \pm 3,9$ % en los tumores pertenecientes al grupo control, $14,8 \pm 1,9$ % en los tumores provenientes de animales intoxicados con CPF 0,01 mg/Kg/día y $16,3 \pm 1,6$ % en los tumores pertenecientes a los animales expuestos a CPF 1 mg/Kg/día (Fig. II.16). Anteriormente demostramos que el plaguicida no influye en el tiempo de duplicación de los tumores en nuestro modelo de estudio. En concordancia con ese resultado, el tóxico tampoco afectó la expresión de PCNA en los tumores.

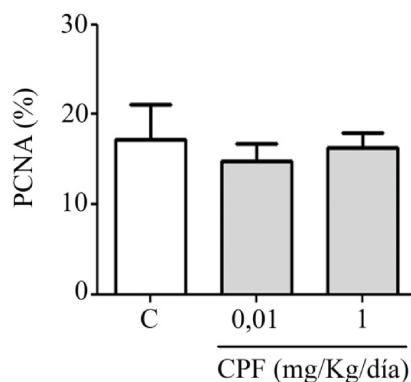
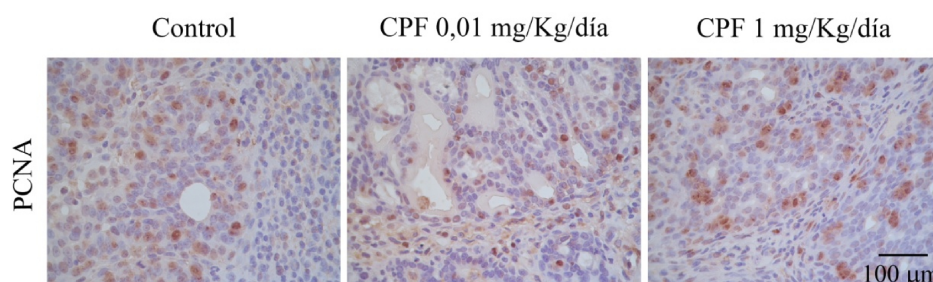


Figura II.16. Expresión de PCNA en los tumores mamarios. Fotografías representativas que ilustran la expresión del antígeno PCNA evaluado por inmunohistoquímica en células del tejido tumoral de ratas intoxicadas con CPF (0,01 o 1 mg/kg/día) o vehículo (C). Los núcleos positivos se observan coloreados de marrón. Aumento 630X. Debajo de las fotografías se muestra una representación gráfica del porcentaje células positivas para PCNA calculado como el número de células PCNA positivas/número de células totales por campo de 630X. Se cuantificaron 5 campos tomados al azar de cada uno de los tumores pertenecientes a los animales de los diferentes grupos experimentales. Se analizaron los tumores provenientes de dos experimentos independientes. Los valores corresponden a la media \pm EEM (p:ns; ANOVA de un factor).

Efectos sobre la expresión de los receptores de hormonas esteroideas

Una de las características más importantes en la caracterización de los tumores mamarios, es la expresión de los receptores de hormonas esteroideas, como el RE y el RPg, debido a que esto influye en el tratamiento y pronóstico de la enfermedad. La expresión del RE en el tejido tumoral fue evaluada mediante inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo monoclonal específico. Como se observa en la figura II.17, la expresión de este receptor fue disminuida por el plaguicida en ambas dosis utilizadas (0,01 y 1 mg/Kg/día) en relación a los niveles obtenidos en los animales control. En el grupo control observamos en promedio un $12,3 \pm 3,3$ % de las células tumorales expresando el RE, sin embargo este porcentaje disminuyó hasta $7,3 \pm 0,7$ y $4,7 \pm 0,9$ % cuando los animales fueron expuestos a CPF 0,01 y 1 mg/Kg/día respectivamente. Si bien se observó una disminución en la expresión del RE en los tumores desarrollados en ratas expuestas a ambas dosis de CPF, esta disminución solo fue significativa en el grupo de animales intoxicados con CPF 1 mg/Kg/día ($p < 0,05$).

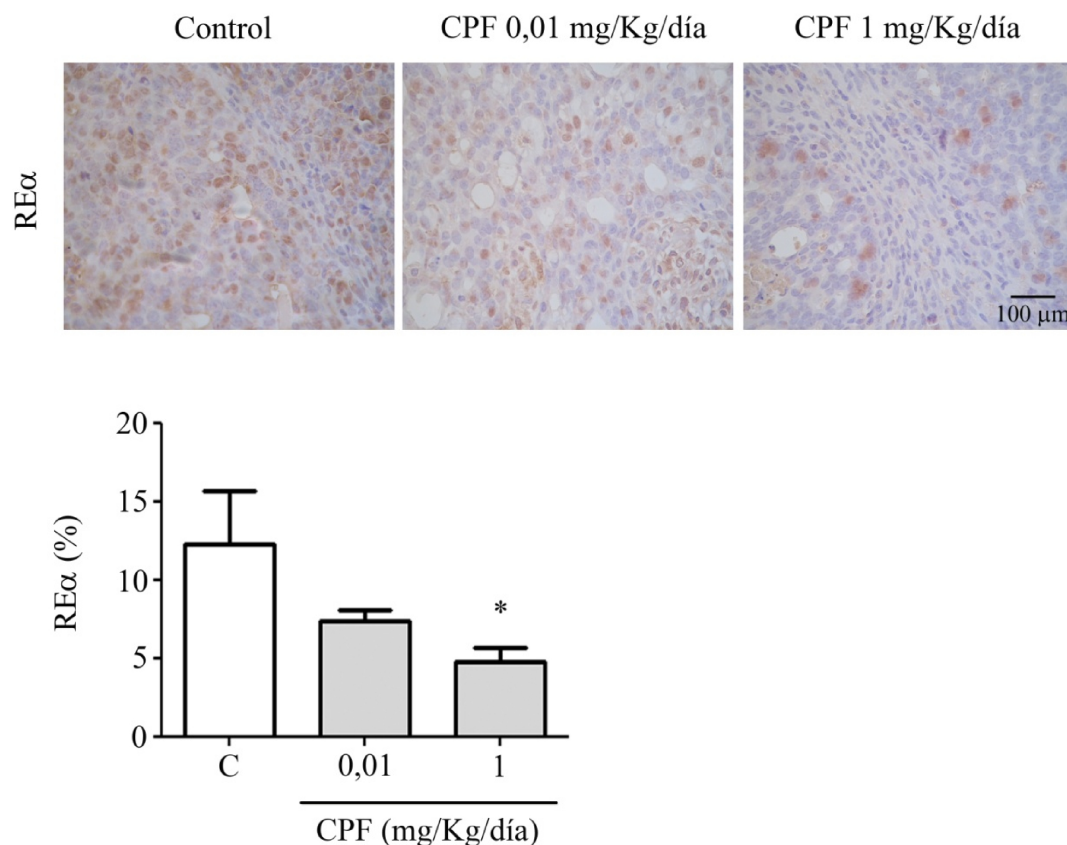


Figura II.17. Expresión del RE en el tejido tumoral de ratas expuestas a CPF. Fotografías representativas que ilustran la expresión del antígeno RE evaluado por inmunohistoquímica en células del tejido tumoral de ratas intoxicadas con CPF (0,01 o 1 mg/kg/día) o vehículo (C). Los núcleos positivos se observan coloreados de marrón. Aumento 630X. Debajo de las fotografías se muestra una representación gráfica del porcentaje células positivas para el RE calculado como el número de células RE positivas/número de células totales por campo de 630X. Se cuantificaron 5 campos tomados al azar de cada uno de los tumores pertenecientes a los animales de los diferentes grupos experimentales. Se analizaron los tumores provenientes de dos experimentos independientes. Los valores corresponden a la media \pm EEM (* $p < 0,05$; ANOVA de un factor y Test Dunnett a posteriori).

Se realizó además la identificación del RPg, otro de los marcadores de diferenciación tumoral utilizados. La determinación de este receptor fue realizada mediante la técnica de inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo monoclonal específico que reconoce ambas isoformas del receptor. Como se observa en la figura

II.18, el tratamiento de los animales con CPF redujo la expresión del RPg en los tumores, respecto a los niveles encontrados en los tumores de las ratas que fueron expuestas al vehículo.

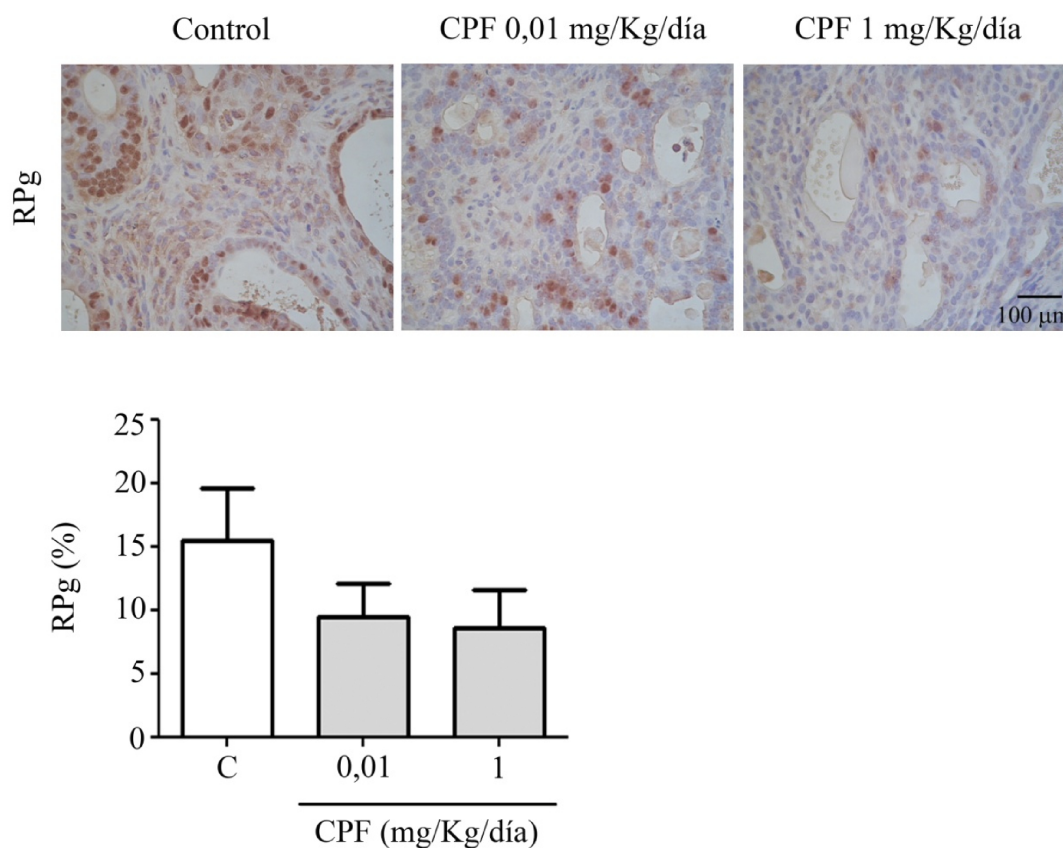


Figura II.18. Expresión del RPg en el tejido tumoral de ratas expuestas a CPF. Fotografías representativas que ilustran la expresión del antígeno RPg evaluado por inmunohistoquímica en células del tejido tumoral de ratas intoxicadas con CPF (0,01 o 1 mg/kg/día) o vehículo (C). Los núcleos positivos se observan coloreados de marrón. Aumento 630X. Se cuantificaron 5 campos tomados al azar de cada uno de los tumores pertenecientes a los animales de los diferentes grupos experimentales. Se analizaron los tumores provenientes de dos experimentos independientes. Los valores corresponden a la media \pm EEM (p:ns; ANOVA de un factor).

Discusión. *Segunda parte*

En el capítulo anterior, describimos los efectos del CPF sobre la proliferación celular, la muerte y los mecanismos involucrados en estos procesos en líneas celulares derivadas de adenocarcinomas mamarios humanos con distinto grado de diferenciación. En esos estudios, evidenciamos que bajas concentraciones del tóxico inducen la proliferación de la línea celular MCF-7 en forma dependiente del RE, mientras que, concentraciones mayores, conducen a una disminución de la capacidad clonogénica.

En esta parte del trabajo, investigamos el efecto del CPF como potencial DE, evaluando su efecto sobre el desarrollo de la glándula mamaria y la carcinogénesis en este órgano. Para los estudios sobre el desarrollo de la glándula mamaria, utilizamos ratas de la cepa Sprague Dawley, a las cuales intoxicamos con diferentes dosis de CPF de manera crónica. La intoxicación comenzó a los 40 días posteriores al nacimiento de los animales, debido a que es el momento en el cual la glándula mamaria se encuentra en su etapa de desarrollo puberal (I. H. Russo and Russo, 1996; Sternlicht, 2006) y se prolongó durante 100 días, momento en el que los animales han alcanzado su madurez. De esta manera, la intoxicación con el plaguicida abarcó un momento crítico en el desarrollo de los animales el cual se encuentra fuertemente regulado por diferentes hormonas. Como detallaremos más adelante, esta característica del diseño experimental nos permitió evidenciar diferentes efectos del plaguicida sobre el sistema endócrino.

Las dosis utilizadas para la intoxicación de los animales fueron seleccionadas de acuerdo a los límites internacionales vigentes al momento de iniciar esta investigación. Específicamente, utilizamos dos parámetros ampliamente aceptados para la evaluación del riesgo asociado a las exposiciones toxicológicas: la IDA y el NOAEL.

El NOAEL es un valor que se establece en base a un efecto particular y en un sistema de estudio específico, por lo tanto, se encuentran en la literatura diferentes valores dependiendo del modelo de estudio y del parámetro evaluado. Como mencionamos en la introducción de este trabajo, los efectos tóxicos del plaguicida CPF se relacionan principalmente con su capacidad de inhibir irreversiblemente a la enzima AChE del sistema nervioso central y periférico. Esta enzima también se encuentra en los glóbulos rojos y, debido a su mayor sensibilidad frente a la inhibición por CPF, la determinación de la actividad AChE eritrocitaria constituye un parámetro ampliamente aceptado para evaluar el NOAEL (European Food Safety Authority, 2014; US

Environmental Protection Agency, 2011b). Debido a las características del diseño experimental utilizado en este trabajo, seleccionamos el NOAEL determinado en base a la inhibición de la AChE eritrocitaria de rata, tras intoxicaciones crónicas por vía oral con CPF.

Por otra parte, la IDA es un parámetro que se determina mediante la aplicación de un factor de seguridad a un valor de NOAEL considerado toxicológicamente relevante. La determinación de estos valores es realizada por diferentes organizaciones internacionales, cada una de las cuales reúne a un comité de expertos que evalúa criteriosamente las publicaciones sobre el tema. Entre estas instituciones, se encuentra la USEPA y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, *del inglés: European Food Safety Authority*).

Al momento de iniciar esta investigación, la EFSA y la OMS, coincidían en una dosis de 0,01 mg/Kg/día como límite para la IDA, la cual se había fijado sobre la base de un NOAEL de 1 mg/Kg/día obtenido en estudios realizados en perros, ratones y ratas durante 2 años y aplicando a este valor un factor de seguridad de 100 (European Food Safety Authority, 2005; World Health Organization, 2009b). De esta manera, las dosis utilizadas en nuestro trabajo fueron 0,01 y 1 mg/Kg/día, las cuales se corresponden con la IDA y el NOAEL, respectivamente.

Es importante destacar que la dosis de referencia para intoxicaciones crónicas por ingestión publicada por la USEPA es considerablemente menor a estos valores (Tabla III.4). Esta discrepancia se debe a que la USEPA se basa en un estudio de neurotoxicidad en el desarrollo realizado en ratas embarazadas, el cual arrojó una dosis límite de 0,03 mg/Kg/día para la inhibición de la AChE eritrocitaria. Este valor, a su vez, fue corregido mediante un factor de incertidumbre de 100 unidades, lo cual deriva en una dosis poblacional ajustada por exposiciones crónicas (cPAD) de 0,0003 mg/Kg/día. Estos parámetros fueron ratificados por la USEPA en la revisión de los riesgos asociados a la exposición a CPF realizada en el año 2011. Debido a que en nuestros experimentos trabajamos con ratas vírgenes, decidimos basarnos en los valores de referencia publicados por la EFSA mencionados anteriormente.

Otro aspecto que deseamos destacar, concierne a una revisión del riesgo asociado a la exposición a CPF realizado por la EFSA en abril del corriente año. En esta

publicación se anuncia una disminución de los valores de referencia en un orden de magnitud respecto a los valores publicados en el año 2005. De esta forma, se define un valor de NOAEL de 0,1 mg/Kg/día, asociado a la inhibición de la actividad AChE eritrocitaria en un ensayo a largo plazo en ratas jóvenes y adultas, para la determinación del riesgo ligado a exposiciones crónicas a CPF. En base a este parámetro, y aplicando un factor de seguridad de 100, la dosis correspondiente a la IDA es fijada en 0,001 mg/Kg/día (European Food Safety Authority, 2014). En la tabla III.4 se resumen los valores de referencia para exposiciones crónicas a CPF publicados por la EFSA y la USEPA y su variación en los últimos años. Cabe destacar que los cambios en los valores de referencia se efectúan tras una cuidadosa y sistemática revisión de nuevos estudios toxicológicos realizados en diferentes modelos experimentales, lo cual resalta la importancia de estos estudios para la actualización de las regulaciones de los diferentes países.

Año	Institución	Valores de referencia	Parámetro	Estudio	Referencia
2005	EFSA	NOAEL: 1 mg/Kg/día IDA: 0,01 mg/Kg/día	Disminución en la actividad AChE eritrocitaria	Estudio a largo plazo en ratas, ratones y perros	(European Food Safety Authority, 2005)
2011	USEPA	BMDL ₁₀ : 0,03 mg/Kg/día cPAD: 0,0003 mg/Kg/día	Disminución en la actividad AChE eritrocitaria	Estudios de neurotoxicidad en el desarrollo de ratas embarazadas	(US Environmental Protection Agency, 2011b)
2014	EFSA	NOAEL: 0,1 mg/Kg/día IDA: 0,001 mg/Kg/día	Disminución en la actividad AChE eritrocitaria	Estudio a largo plazo (2 años) en ratas y perros	(European Food Safety Authority, 2014)

Tabla III.4. Resumen de dosis toxicológicas relevantes para CPF de acuerdo a la USEPA y la EFSA. Para exposiciones crónicas ocupacionales y no ocupacionales, por vía oral. NOAEL: máxima dosis que no produce efectos adversos. IDA: ingesta diaria admisible. BMDL₁₀: límite inferior del intervalo de confianza del 95 % para el valor de la BMD₁₀ (dosis estimada que resulta en una modificación del 10 % en el parámetro evaluado). cPAD: dosis poblacional ajustada para exposiciones crónicas, es la dosis a la cual una persona podría exponerse a lo largo de toda la vida, sin efectos adversos sobre la salud (European Food Safety Authority, 2014, 2005; US Environmental Protection Agency, 2011b; World Health Organization, 2009b).

Como mencionamos anteriormente, la determinación de la actividad AChE eritrocitaria representa el método más aceptado para la evaluación de intoxicaciones con compuestos OPs como el CPF. Sin embargo, un estudio realizado en el año 2010 demostró que solo el 42 % de los trabajadores agrícolas expuestos a plaguicidas OPs presentó disminuidos los niveles de AChE eritrocitaria, mientras que la mayoría de los agricultores declaró presentar síntomas característicos de sobreexposiciones crónicas a estos compuestos (Cuaspuud and Vargas, 2010). En el mismo sentido, las dosis utilizadas en nuestro trabajo no producen una disminución de la actividad AChE eritrocitaria, sin embargo, como discutiremos a continuación, las mismas dosis conducen a un amplio espectro de efectos sobre los animales expuestos.

Otro parámetro ampliamente utilizado como biomarcador de exposiciones a compuestos OPs, es la actividad de la enzima BChE en el plasma de los individuos expuestos. Se ha demostrado que la inhibición de esta enzima se produce a concentraciones menores de compuestos OPs, en comparación a las concentraciones necesarias para la inhibición de la enzima AChE eritrocitaria (Amitai et al., 1998; Eaton et al., 2008; Shenouda et al., 2009), por lo cual su determinación constituye un método más sensible para el monitoreo de la exposición a estos compuestos. En concordancia con estos antecedentes, en nuestros experimentos evidenciamos una inhibición de la actividad BChE cuando los animales fueron intoxicados con CPF 1 mg/Kg/día, lo cual no fue observado al analizar la actividad AChE eritrocitaria. Es importante destacar que, si bien la actividad BChE es inhibida por un amplio número de sustancias además de los compuestos OPs, este hecho no representa una dificultad en nuestro sistema de estudio, debido a que el mismo contempla la intoxicación intencional de los animales con una dosis conocida de CPF, en un ambiente libre de cualquier sustancia tóxica adicional.

Además de los efectos sobre la actividad colinesterasa, consideramos importante evaluar si las dosis de CPF utilizadas afectaban el estado general de los animales. En este sentido, las dosis utilizadas no afectaron la evolución del peso corporal a lo largo del ensayo. Tampoco observamos síntomas de toxicidad tales como alteraciones en la movilidad o en el comportamiento y no se detectó mortalidad en ninguno de los grupos experimentales. Esto nos permitió realizar una intoxicación crónica sin que los animales sufran los efectos toxicológicos característicos de la exposición a estos compuestos.

Tanto la activación como la detoxificación del CPF tienen lugar en el hígado de los individuos expuestos. Por este motivo, evaluamos el peso de este órgano, su histología y su funcionalidad luego de la intoxicación crónica con ambas dosis del plaguicida. Como describimos previamente, no observamos modificaciones significativas en el peso del hígado, ni en la actividad de las enzimas ALAT y ASAT evaluadas en el suero de los animales luego de 100 días de exposición al tóxico. Los valores hallados de estas enzimas se encontraron, en todos los casos, dentro de los parámetros normales para estos animales (León Goñi et al., 2011). Sin embargo, la histología de este órgano reveló la presencia ocasional de focos necróticos y hemorrágicos en los grupos expuestos a la dosis más elevada de CPF, lo cual no fue observado en el grupo control.

Si bien en nuestro trabajo no observamos alteraciones en la función hepática de las ratas expuestas al tóxico, en el año 2010 se publicó un estudio en el cual se evaluaron las alteraciones bioquímicas e histopatológicas hepáticas presentes en ratas lactantes, cuyas madres estuvieron expuestas a las mismas dosis de CPF que utilizamos en esta tesis. En este trabajo, los autores evidenciaron una reducción en el peso corporal y hepático de las crías, junto con alteraciones en la histología y en la función hepática, esta última evaluada mediante la actividad de las enzimas ALAT y ASAT (Mansour and Mossa, 2010). Estos resultados dan cuenta de las diferentes susceptibilidades de acuerdo al estadio del desarrollo de los animales.

Un amplio número de investigaciones han informado que el CPF altera la funcionalidad hepática y modifica la histología de este tejido en animales de experimentación (Goel et al., 2000; Kammon et al., 2010; Ma et al., 2013; Orabi et al., 2013; Uzun and Kalender, 2013). Sin embargo, las dosis de plaguicida utilizadas en estos trabajos, superan ampliamente las dosis seleccionadas para esta tesis.

Como mencionamos anteriormente, los valores de referencia establecidos por los organismos internacionales, se basan en la evaluación de un parámetro en particular, en este caso, la inhibición de la actividad AChE eritrocitaria. Sin embargo, los efectos producidos por dosis más bajas de estos compuestos, no son evaluados. En particular, las alteraciones del sistema endócrino son ocasionadas por concentraciones considerablemente menores que dichos valores de referencia.

Dado que previamente describimos un incremento en la proliferación celular mediada por la activación del RE en células derivadas de un adenocarcinoma mamario, decidimos evaluar el efecto del CPF sobre la glándula mamaria de los animales luego de la intoxicación con diferentes dosis del plaguicida.

En los últimos años, se ha investigado intensamente la acción de tóxicos ambientales en relación al desarrollo de la glándula mamaria. En nuestros experimentos, observamos un incremento en el número de ductos y brotes alveolares en el tejido mamario de los animales intoxicados con CPF. Debemos recordar que la intoxicación de los animales con el plaguicida fue realizada entre los 40 y 140 días de vida de las ratas, lo cual incluye el período de transición entre la pubertad y la adultez. Nuestros resultados concuerdan con los publicados por Nishi y Hundal en el año 2013. Estos investigadores, intoxicaron ratas hembras de 12 semanas de edad con diferentes dosis de CPF durante 8 semanas. Sus resultados evidenciaron un incremento significativo en el ancho ductal, en el número de ramificaciones y en el número y tamaño de los brotes alveolares presentes en la glándula mamaria de los animales intoxicados con CPF (0,1 y 2,5 mg/Kg/día) respecto a los mismos parámetros evaluados en las ratas del grupo control. Adicionalmente, estos investigadores observaron cambios en el ciclo estral y en la histología ovárica y uterina de los animales (Nishi and Hundal, 2013).

Resultados similares fueron encontrados con el bifenol A (BPA), un químico ampliamente utilizado en la fabricación de plásticos, y reconocido como DE en diferentes modelos experimentales. Dosis reducidas de este compuesto afectan el desarrollo de la glándula mamaria murina, incrementando el número TEBs, el número de ductos y brotes alveolares y las ramificaciones del árbol ductal (Ayyanan et al., 2011; Muñoz de Toro et al., 2010; D. Wang et al., 2014). De acuerdo a recientes investigaciones, estos efectos podrían estar asociados a un incremento de la proliferación celular y una disminución de la apoptosis (Jenkins et al., 2009; Qin et al., 2012; J. Wang et al., 2014a). En el mismo sentido, en nuestros experimentos observamos un incremento del marcador de proliferación celular PCNA en la glándula mamaria de los animales intoxicados con el plaguicida.

En adición al incremento en el número de ductos y brotes alveolares descritos anteriormente en este trabajo, el análisis histológico demostró un incremento en la incidencia de afecciones benignas presentes en el tejido mamario de las ratas expuestas a CPF en relación a los animales del grupo control. Como describimos anteriormente, entre las lesiones observadas se encontraron la adenosis y la hiperplasia ductal. La adenosis se caracteriza por un incremento en el tamaño de los brotes alveolares. En ocasiones, estas estructuras se encuentran deformadas por la presencia de tejido fibroso a su alrededor y, en esos casos, la adenosis se denomina esclerosante. Diferentes estudios han demostrado que las mujeres con adenosis esclerosante presentan entre 1,5 y 2 veces mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama en relación a las mujeres que no presentan esta lesión (Guray and Sahin, 2006; Jensen et al., 1989; Visscher et al., 2014). Nuestros resultados mostraron un incremento en el porcentaje de adenosis presente en el tejido mamario de los animales intoxicados con CPF 0,01 mg/Kg/día, en relación a los animales del grupo control.

Adicionalmente, observamos un incremento en el porcentaje de ductos hiperplásicos presentes en el tejido mamario de los animales expuestos a CPF. Las hiperplasias fueron clasificadas como moderadas o floridas, de acuerdo a la gravedad de la lesión y al número de capas de células epiteliales presentes en el ducto. En este sentido, el tratamiento con CPF 1 mg/Kg/día incrementó significativamente el porcentaje de ductos con hiperplasia moderada y florida, mientras que una menor dosis del tóxico sólo incrementó el porcentaje de hiperplasia florida.

Resultados similares han sido descritos por Dolapsakis y sus colaboradores, quienes analizaron la presencia de diferentes afecciones benignas en la glándula mamaria de más de 500 trabajadoras rurales, con más de 10 años de exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos, y las compararon con los mismos parámetros en mujeres consideradas no expuestas a estos compuestos. En este trabajo, los investigadores evidenciaron un incremento significativo en la presencia de fibroadenomas, hiperplasia ductal, adenosis esclerosante y mastitis inflamatoria, en el grupo de mujeres expuestas a plaguicidas en comparación con las mujeres del grupo control (Dolapsakis et al., 2001).

Otros compuestos, como el BPA, inducen cambios proliferativos benignos en el tejido mamario. Durando y sus colaboradores identificaron un incremento en el porcentaje de hiperplasia ductal moderada y florida en ratas hembras intoxicadas con dosis ambientalmente relevantes de BPA (Durando et al., 2011). Otros investigadores han publicado la presencia de hiperplasia ductal con atipias y carcinoma ductal *in situ* tras intoxicaciones con este compuesto (Acevedo et al., 2013; D. Wang et al., 2014), las cuales no fueron observadas en nuestro modelo experimental. Finalmente, en un estudio realizado con otro plaguicida organofosforado, como el malatión, se observó un efecto sinérgico entre este compuesto y el E₂, el cual derivó en la presencia de lesiones proliferativas y en la inducción de tumores en el tejido mamario de los animales (Calaf and Echiburú-Chau, 2012).

Inicialmente, se definen tres categorías para la clasificación de las lesiones mamarias. Los criterios utilizados en esta clasificación incluyen las características histológicas y el riesgo asociado al futuro desarrollo de un carcinoma mamario invasivo. La primera categoría incluye a las lesiones proliferativas que no incrementan el riesgo de padecer cáncer; en la segunda, en la cual se incluye la hiperplasia ductal florida, el riesgo se incrementa entre 1,5 y 2 veces respecto a las mujeres que no presentan esta lesión; finalmente, la tercera categoría contempla la presencia de lesiones con atipia, las cuales incrementan el riesgo 5 veces (Moore et al., 1997).

El aumento de la incidencia de hiperplasia ductal inducido por el CPF podría estar relacionado con una desregulación del sistema endócrino. Durante la pubertad, la elongación ductal y la proliferación de las células epiteliales mamarias se encuentran estrechamente reguladas por las hormonas ováricas como el E₂ y la Pg, las cuales actúan a través de la unión a sus receptores (Sternlicht, 2006; Sternlicht et al., 2006).

En este trabajo, observamos un incremento en los niveles de expresión del RPg cuando los animales fueron intoxicados con CPF 1 mg/Kg/día, junto con un aumento en el porcentaje de células que expresan PCNA, un reconocido marcador de proliferación celular. Como describimos recientemente, estos resultados fueron acompañados por cambios histológicos, los cuales evidenciaron una mayor proliferación celular en la glándula mamaria de los animales intoxicados con el plaguicida en relación a los animales control.

En la introducción de este trabajo de tesis, señalamos la importancia del RPg en la ramificación lateral y el crecimiento alveolar característicos del desarrollo mamario (Lydon et al., 1996, 1995; Oakes et al., 2006; Ruan et al., 2005; Sternlicht et al., 2006). En la actualidad, se encuentra claramente establecida la importancia de este receptor en la inducción de la proliferación de las células epiteliales mamarias mediante mecanismos parácrinos (Anderson and Clarke, 2004; Clarke, 2003). Cabe recordar, que la proliferación de las células mamarias es máxima durante la fase diestro del ciclo de las ratas, cuando los niveles circulantes de Pg se encuentran elevados (Orb and Edwards, 2013). En conjunto, estos datos resaltan la importancia de las señales disparadas por el RPg en la proliferación de las células epiteliales mamarias, lo cual fue observado en nuestro modelo experimental. Resultados similares han sido publicados en relación a otros DEs como el BPA (Jenkins et al., 2009; Muñoz de Toro et al., 2010).

Los animales expuestos a CPF 0,01 mg/Kg/día presentaron cambios histológicos proliferativos y un leve incremento en la expresión de PCNA en la glándula mamaria, sin embargo, la expresión del RPg no se vio afectada en este tejido.

Un aspecto que deseamos destacar, concierne a la similitud de los efectos observados en los animales expuestos a CPF 1 mg/Kg/día y los producidos fisiológicamente por el E₂. Como describimos anteriormente, el E₂ induce la elongación ductal y la proliferación de las células epiteliales mamarias. A su vez, esta hormona induce la expresión del RPg. Estos eventos, junto con otros que describiremos más adelante, sugieren que el CPF podría imitar los efectos inducidos naturalmente por el E₂ en la glándula mamaria.

Si bien observamos un incremento en la expresión del RPg, los niveles séricos de esta hormona fueron disminuidos significativamente por el plaguicida. La activación del RPg tradicionalmente se ha asociado a su unión a la Pg, sin embargo, actualmente se conocen otras vías de activación de este receptor independientes de la presencia hormonal. En este sentido, el RPg puede ser activado por la quinasa c-Src, las vías de señalización de las de MAPKs y la AKT y diferentes factores de crecimiento secretados por los fibroblastos (Giulianelli et al., 2013). Estos mecanismos cobran relevancia si se considera que la intoxicación de los animales con CPF 1 mg/Kg/día, conduce a la activación de la quinasa ERK1/2 en la glándula mamaria (datos no mostrados).

Otro receptor importante involucrado en los cambios proliferativos inducidos por las hormonas esteroideas en la glándula mamaria, es el RE . En nuestro trabajo no evidenciamos modificaciones en la expresión de este receptor en los animales intoxicados con CPF en relación a los animales control. Sin embargo, observamos una disminución en la fosforilación del mismo cuando los animales fueron expuestos a CPF 1 mg/Kg/día. En este trabajo, evaluamos particularmente la fosforilación de este receptor en la tirosina 537, señalada como blanco de fosforilación para la quinasa c-Src. Es importante aclarar, que este receptor presenta, adicionalmente, múltiples residuos de serinas cuyas fosforilaciones modifican su actividad.

La fosforilación del RE se encuentra regulada por una amplia variedad de moléculas y diferentes vías de señalización. Sin embargo, uno de los principales factores que regulan la actividad de esta proteína, es la presencia de su ligando específico, el E₂. Como discutiremos más adelante, la intoxicación de los animales con CPF 1 mg/Kg/día condujo a una disminución en los niveles séricos de E₂, lo cual podría explicar la menor activación del RE en comparación con los animales control.

En conjunto, estos resultados indican que el CPF 1 mg/Kg/día modula la expresión y la activación de los receptores esteroideos en la glándula mamaria, lo cual podría indicar una acción como DE en este tejido.

Otro aspecto importante que caracteriza a los DEs, es su capacidad de modificar los niveles circulantes de diferentes hormonas. Como mencionamos anteriormente, las hormonas involucradas en el desarrollo de la glándula mamaria son el E₂, la Pg y la prolactina. Los niveles de prolactina no fueron determinados en este estudio, debido a que su regulación resulta afectada por el proceso de toma de muestra. Los niveles circulantes de esta hormona se elevan rápidamente en situaciones de estrés, con lo cual, la recolección de la muestra se torna particularmente dificultosa. Por este motivo, decidimos evaluar los niveles séricos de E₂ y Pg luego de la exposición de los animales a diferentes dosis de CPF durante 100 días. Adicionalmente, determinamos la concentración de T, un intermediario clave en la síntesis de los estrógenos ováricos.

Nuestros resultados indicaron que el CPF 1 mg/Kg/día reduce significativamente los niveles circulantes de E₂ y Pg. La depleción en los niveles circulantes de hormonas

esteroideas puede derivar de un daño en la función gonadal o de alteraciones en la regulación hipofisaria de la esteroidogénesis.

Si bien son escasos los trabajos en los que se evalúan los niveles de hormonas esteroideas en animales intoxicados con el plaguicida CPF, en la mayoría de estos estudios se hace referencia a alteraciones oxidativas en la función ovárica o testicular. En este sentido, y en concordancia con nuestros resultados, a comienzos de este año se publicó un estudio realizado en ratas hembras intoxicadas con CPF, en el cual se evidencia una disminución de los niveles circulantes de E₂ inducida por el tóxico (Das et al., 2014). Este efecto, es atribuido por los autores al daño oxidativo producido por el plaguicida en los ovarios de los animales. Otro grupo de investigadores observó alteraciones en la histología de los testículos y en la espermatogénesis luego de administrar CPF a ratas, las cuales fueron revertidas por la presencia de melatonina, un potente antioxidante fisiológico (Umosen and Chidiebere, 2014). Finalmente, en estudios realizados en ratas hembras, se observaron importantes cambios histológicos en el ovario de los animales intoxicados con CPF, incluyendo un incremento de la atresia folicular, debido a la generación de ERO (Nishi and Hundal, 2013). Resultados similares han sido descritos en intoxicaciones con otros DEs, como el cadmio. La exposición a este compuesto, disminuye significativamente los niveles circulantes de E₂, Pg y T en ratas expuestas durante la gestación, lo cual se relaciona con alteraciones en la función ovárica, debido a un incremento del estrés oxidativo en este órgano (Jawahar et al., 2011).

Muchos plaguicidas afectan la regulación del sistema endócrino mediante la alteración de la síntesis, la degradación o el metabolismo de las hormonas esteroideas (Craig et al., 2011). En este sentido, Plíšková y sus colaboradores informaron la alteración en el metabolismo de la T y el E₂, inducida por los compuestos bifenilos policlorados, comúnmente conocidos como PCBs (Plíšková et al., 2005). Como describimos anteriormente, la síntesis de las hormonas esteroideas se encuentra catalizada por un conjunto de enzimas pertenecientes a la familia del citocromo P450. Por lo tanto, las alteraciones inducidas por los plaguicidas se relacionan con la activación o inactivación de estas enzimas. En particular, el CPF interfiere en el metabolismo de la T y el E₂ mediante la inhibición de diferentes miembros de esta familia. Adicionalmente, la preincubación de la enzima aromatasa con CPF y otros

plaguicidas organofosforados conduce a la pérdida de su actividad, impidiendo la síntesis de E_2 catalizada por la misma (Hodgson and Rose, 2006).

Resultados similares fueron descritos por otros investigadores, quienes demostraron que el CPF inhibe a las enzimas 3 β -HSD y 17 β -HSD y reduce la expresión de la proteína StAR, la cual cataliza la reacción inicial necesaria para la síntesis de hormonas esteroideas. Además, estos investigadores informaron una disminución en los niveles de AMPc inducidos por la unión de la LH a su receptor en las células de Leydig en rata (Viswanath et al., 2010).

En nuestros estudios, observamos una disminución en el contenido ovárico de E_2 cuando los animales fueron intoxicados con CPF 1 mg/Kg/día. Este hecho podría estar relacionado con alteraciones en la expresión o actividad de las enzimas esteroidogénicas. Es preciso recordar, que la expresión de las enzimas 3 β -HSD y CYP17 es regulada positivamente por la hormona LH, la cual se encontró reducida en los grupos de animales expuestos al plaguicida (Stocco et al., 2007). Adicionalmente, el contenido ovárico de Pg se encontró levemente incrementado en los animales intoxicados con CPF 1 mg/Kg/día, sin embargo, este incremento no fue estadísticamente significativo.

Como describimos en la introducción de esta tesis, la síntesis de las hormonas esteroideas es regulada por los niveles de gonadotrofinas LH y FSH. Por lo tanto, la disminución en los niveles circulantes de hormonas esteroideas puede estar relacionada con alteraciones en los niveles de estas hormonas hipofisarias. En este trabajo, observamos una disminución en los niveles circulantes de LH cuando los animales fueron intoxicados con ambas dosis de plaguicida, lo cual podría conducir a una disminución en la esteroidogénesis ovárica. En concordancia con nuestros resultados, Muftau y sus colaboradores reportaron recientemente un incremento en el daño oxidativo de la adenohipófisis en ratas machos intoxicadas con CPF, junto con una reducción en los niveles circulantes de LH, FSH y T. De acuerdo a los resultados de esta investigación, los efectos producidos por el CPF son revertidos tras la administración de un antioxidante natural a los animales, indicando la importancia del daño oxidativo en la disminución de los niveles hormonales (Muftau et al., 2014).

Debemos destacar, que la dosis de CPF utilizada en el mencionado estudio es de 10,6 mg/Kg, la cual supera ampliamente a las utilizadas en nuestro trabajo.

El análisis de nuestros resultados, en forma conjunta con los datos obtenidos por otros grupos de investigación, indica que el CPF afecta el sistema endócrino en diferentes puntos claves. Por un lado, altera los niveles de gonadotrofinas y, adicionalmente, afecta directamente la estructura y función de los ovarios. Ambos efectos, conducen a una disminución en la síntesis ovárica de hormonas esteroideas. Otra característica en común de estos efectos, es su relación con el estrés oxidativo inducido por el tóxico. En el próximo capítulo, describiremos el efecto del CPF sobre el balance redox en la glándula mamaria de los animales intoxicados con el plaguicida, así como también en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, donde observamos un incremento en los niveles de ERO inducidas por el CPF. Las ERO se encuentran íntimamente vinculadas con diversos procesos que subyacen al desarrollo neoplásico, ya sea a través del daño a diferentes macromoléculas, la regulación de factores de transcripción génicos o la interferencia en diferentes vías de transducción de señales.

Los efectos del CPF sobre la carcinogénesis fueron evaluados utilizando un modelo de carcinogénesis mamaria inducida químicamente en ratas de la cepa Sprague Dawley. El carcinógeno utilizado fue NMU, el cual fue administrado a los animales en tres dosis (50 mg/Kg) intraperitoneales a los 50, 80 y 110 días de vida. La intoxicación con el plaguicida comenzó a los 40 días de vida de los animales y prolongó durante 140 días, permitiendo que todos los animales desarrollen al menos un tumor. Estudios realizados en este modelo experimental indican que el desarrollo y el crecimiento de los tumores están fuertemente regulados por hormonas y factores de crecimiento (Martín et al., 1997, 1996a, 1996b). Entre las hormonas, el E₂ y la prolactina cumplen un papel esencial durante las etapas de iniciación y de promoción de la carcinogénesis (Martín et al., 1997). Debido a estas características, la inducción tumoral mediada por NMU representa un modelo adecuado para el estudio de los efectos del CPF sobre la carcinogénesis mamaria.

Entre los resultados más relevantes obtenidos en este modelo experimental, se encuentran la disminución del período de latencia de los tumores y el incremento del número de tumores por rata inducidos por el CPF. En el mismo sentido, el BPA, un reconocido DE, disminuye el tiempo de latencia e incrementa el número de tumores por

rata en un modelo de carcinogénesis química (Jenkins et al., 2009; Lamartiniere et al., 2011). Estos resultados, fueron acompañados por un incremento en la proliferación celular del tejido mamario, una disminución de la apoptosis y la activación proteínas claves de diferentes vías de transducción de señales como la Akt y la c-Src (Lamartiniere et al., 2011).

Si bien observamos modificaciones en el período de latencia tumoral y en el número de tumores por rata, la velocidad de crecimiento de los tumores no fue modificada por el plaguicida. Este resultado fue confirmado mediante la determinación del porcentaje de células que expresaban el antígeno PCNA. Adicionalmente, la intoxicación con el plaguicida tampoco alteró la incidencia tumoral, la cual permaneció cercana al 100 % en todos los grupos experimentales, lo cual representa una característica de este modelo experimental (Cocca et al., 1998; Martín et al., 1997, 1996a; Rivera et al., 1994).

En conjunto, estos resultados evidencian los efectos del plaguicida sobre la predisposición a la carcinogénesis mamaria. Este hecho podría relacionarse con el incremento en el porcentaje de lesiones proliferativas como la adenosis esclerosante y la hiperplasia ductal florida, inducidas por el tóxico en la glándula mamaria de los animales. En el mismo sentido, Cabello y sus colaboradores evaluaron el efecto de otros plaguicidas inhibidores de la actividad colinesterasa sobre la carcinogénesis mamaria. Los plaguicidas evaluados fueron el paratión y el malatión, ambos pertenecientes al grupo de compuestos organofosforados. En concordancia con nuestros resultados, estos investigadores, observaron un incremento en la proliferación celular en la glándula mamaria de los animales, evidenciada tanto por un mayor número de TEBs y brotes alveolares, como por un aumento en el número de capas de células epiteliales que rodean a estas estructuras. Resulta interesante destacar que, luego de 28 meses de intoxicación, entre el 8,6 y el 24,3 % de los animales desarrollaron tumores mamarios, lo cual no fue observado en el grupo control (Cabello et al., 2001). Resultados similares, han sido demostrados luego de la administración de E₂, lo cual confirma el efecto estrogénico de los compuestos anteriormente mencionados (Calaf et al., 2007).

En nuestros experimentos, todos los tumores fueron carcinomas del tipo adenoide quístico de origen ductal, los cuales presentaron patrones de crecimiento

sólidos o cribiformes y focos necróticos de tipo comedogénicos. Estas características fueron similares en las ratas tratadas con ambas dosis de CPF y en los animales del grupo control. Sin embargo, en un estudio realizado por Randi y sus colaboradores en el año 2006, los investigadores observaron una disminución en el patrón de crecimiento cribiforme y un incremento en la presencia de focos necróticos del tipo comedogénicos en los tumores provenientes de animales expuestos al tóxico (Randi et al., 2006). Las diferencias encontradas entre ambos tóxicos pueden deberse a las dosis utilizadas pero, fundamentalmente, debemos subrayar que ambos compuestos son químicamente diferentes, perteneciendo a distintas familias químicas y presentando diferentes mecanismos de acción.

Como describimos en la introducción de este trabajo, la clasificación de los carcinomas mamarios se realiza en base a un conjunto de análisis que incluyen estudios histopatológicos, moleculares, genéticos, la patología clínica y los perfiles de expresión génica. En este proceso, los patrones de expresión de los receptores RE , RPg y HER2, resultan sumamente importantes, debido a que condicionan el tratamiento de las pacientes (Perou et al., 2000; Sørlie et al., 2003, 2001). En general los tumores del tipo basal, los cuales no expresan ninguno de los receptores mencionados, tienen los peores pronósticos, mientras que los de tipo luminal A, cuyo patrón de expresión antigénico es similar al de la glándula mamaria normal, presentan una mejor respuesta a los tratamientos (Braun et al., 2013; Sørlie et al., 2001; Sotiriou et al., 2003).

En nuestros experimentos, observamos una disminución de la expresión de los receptores RE y RPg en los tumores de los animales intoxicados con ambas dosis de CPF. Si bien existe una amplia variedad de estudios epidemiológicos que evalúan la relación entre la exposición a diferentes plaguicidas y la expresión tumoral de los receptores de hormonas esteroideas, la mayoría presenta resultados contradictorios o no concluyentes. Un estudio realizado en el año 2001 con los plaguicidas dieldrin y diclorodifeniltriclorohexano (DDT), por ejemplo, señala que no existe una relación entre la concentración de estos compuestos en sangre y tejido adiposo, y la expresión del RE en los tumores de las pacientes evaluadas (Snedeker, 2001). Otros estudios, sin embargo, han encontrado que el plaguicida hexaclorociclohexano (HCH) incrementa el riesgo de desarrollar tumores ER negativos, mientras que el DDT induce la respuesta contraria. Es preciso aclarar, que los mismos autores indican realizar una interpretación

cautelosa de esos resultados debido al número limitado de casos ER⁻ negativos (Anand et al., 2013).

Los resultados obtenidos en nuestros experimentos, indican que el plaguicida CPF conlleva a un menor grado de diferenciación de las células tumorales, lo cual determina la caída de expresión de los receptores RE⁺ y RPg. Como mencionamos anteriormente, los tumores de mama triple negativos, caracterizados por la ausencia de estos dos receptores y del HER2, presentan un mal pronóstico, además de ser refractarios a algunos tratamientos (Sørli et al., 2001; Sotiriou et al., 2003).

Resultados. *Tercera parte*

Efecto del CPF sobre el balance redox celular y la modulación de la vía de señalización intracelular mediada por MAPKs. Estudios *in vitro*.

Las ERO son producidas constantemente durante el metabolismo de los organismos aeróbicos y participan en el control fisiológico de diversas funciones celulares. La exposición a contaminantes ambientales como plaguicidas y otros químicos, puede afectar el equilibrio redox normal de las células (Abdollahi et al., 2004). En particular, se ha demostrado que el CPF altera el balance redox en diferentes sistemas experimentales (Chiapella et al., 2013; Gupta et al., 2010; Itziou et al., 2011).

Como se mencionó en la introducción de este trabajo, el incremento en el contenido de especies oxidantes intracelulares, puede conducir al daño de diferentes macromoléculas. Las consecuencias de estos cambios son variadas e incluyen la desregulación del ciclo celular, la disminución de la supervivencia e incluso el desarrollo de cáncer (Banerjee et al., 2014; Kamata et al., 2005; Klaunig et al., 2010).

En el primer capítulo de esta tesis, describimos el efecto del CPF 50 μ M sobre la proliferación celular en líneas celulares derivadas de adenocarcinomas mamario humanos con diferente grado de diferenciación. Los resultados presentados demostraron una disminución en la capacidad clonogénica inducida por el tóxico, la cual fue precedida por modificaciones en el ciclo celular y la muerte celular por necrosis. Adicionalmente, en los estudios realizados con animales de experimentación, evidenciamos alteraciones que podrían relacionarse con un incremento del daño oxidativo en diferentes tejidos.

Los ensayos que describiremos a continuación, tuvieron como objetivo investigar el efecto del plaguicida CPF sobre el balance redox en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231. Estos estudios incluyen la determinación de los niveles de especies oxidantes y la modulación de los componentes antioxidantes presentes en las células. Asimismo, se intentará describir la acción del plaguicida sobre la vía de señalización de las MAPKs, con especial énfasis en la modulación de ERK1/2, y su relación con las alteraciones en el equilibrio redox. Finalmente, se estudiarán los componentes antioxidantes y el daño celular en la glándula mamaria de ratas intoxicadas con el plaguicida de manera crónica.

Efectos del CPF sobre los niveles de especies oxidantes

Efectos del CPF sobre el contenido de ERO

Las ERO son uno de los principales factores que conducen al daño celular. Dado que hemos observado una inhibición de la proliferación cuando las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 fueron expuestas a CPF 50 μM , decidimos evaluar las alteraciones en el contenido de especies oxidantes presentes en estas células luego de la exposición a diferentes concentraciones de este compuesto durante 24 horas. El contenido intracelular de ERO fue evaluado utilizando la sonda fluorescente DCF-2DA y cuantificado mediante citometría de flujo. Como se observa en la figura III.1, la exposición a CPF 50 μM , produjo un aumento en el contenido de ERO en ambas líneas celulares. En las células MCF-7, este incremento fue del 58 % ($p < 0,05$) respecto al tratamiento control, mientras que en la línea MDA-MB-231 el mismo fue de 108 % ($p < 0,01$). Cuando se utilizaron concentraciones de CPF menores a 50 μM , no se observaron modificaciones significativas en el contenido celular de ERO en ninguna de las líneas celulares utilizadas.

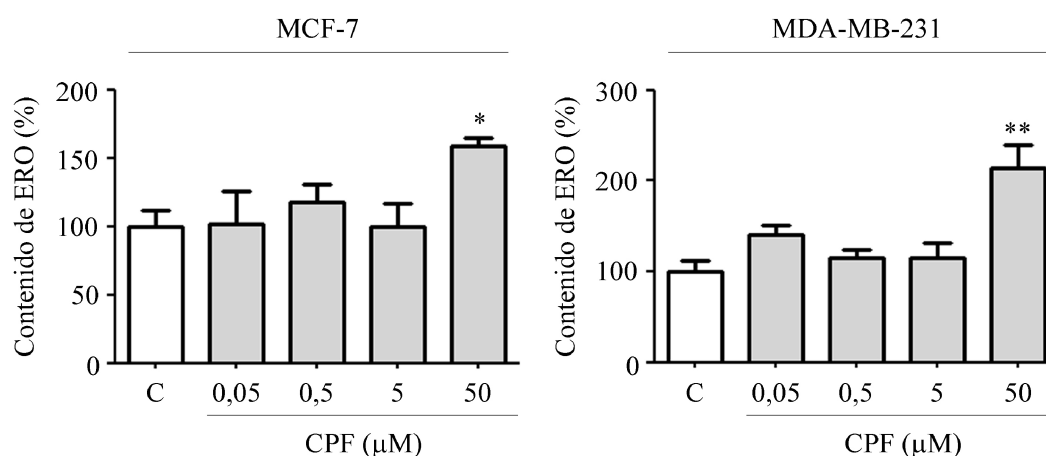


Figura III.1. Efecto del CPF sobre el contenido de ERO. Las células fueron cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de CPF o vehículo (C) durante 24 horas. El contenido de ERO fue determinado midiendo la intensidad de fluorescencia de DCF-2DA por citometría de flujo. En los gráficos se representa la intensidad de fluorescencia media, expresada como porcentaje respecto al control. Se representa la media \pm EEM de tres experimentos

independientes, cada uno realizado por duplicado (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ANOVA de un factor y Test de Dunnett a posteriori).

Contribución del peróxido de hidrogeno al aumento de ERO

La sonda utilizada para determinar los niveles de ERO, nos brinda información acerca de los niveles de todas las especies oxidantes presentes en el sistema sin discriminar entre las mismas. Por ese motivo, decidimos evaluar la contribución del H_2O_2 al aumento de fluorescencia observado previamente. Para ello, cultivamos a las células en presencia de 30 U/ml de enzima CAT durante 15 minutos antes de la incubación con DCF-2DA (Gao et al., 2012). Al igual que en el experimento anterior, las células habían sido cultivadas previamente frente a las diferentes concentraciones del plaguicida durante 24 horas. El agregado de CAT revirtió completamente el aumento en los niveles de ERO producido por el CPF 50 μM en la línea MCF-7, llevando los niveles de las especies oxidantes a valores comparables a los del tratamiento control. En la línea MDA-MB-231, el efecto del CPF 50 μM sobre los niveles de ERO no fue revertido completamente por el agregado de CAT exógena, observándose un incremento del 85,7 % ($p < 0,01$) respecto al control (Fig. III.2).

Debido a que la enzima CAT cataliza la degradación de H_2O_2 , nuestros resultados indican que esta especie química es la principal responsable del incremento de ERO observado en las células MCF-7, mientras que, en la línea celular MDA-MB-231, el CPF 50 μM incrementa los niveles de otras especies oxidantes que contribuyen al desbalance redox señalado previamente.

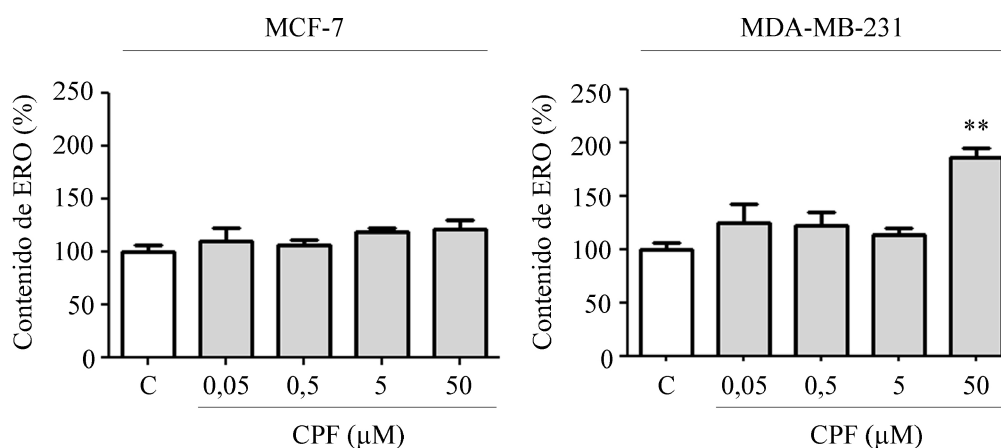


Figura III.2. Contribución del H₂O₂ al aumento de ERO. Las células fueron cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de CPF o vehículo (C) durante 24 horas. Para eliminar el H₂O₂ producido durante la intoxicación, se adicionaron 30 U/ml de CAT a cada pocillo y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C. El contenido intracelular de ERO fue determinado midiendo la intensidad de fluorescencia de DCF-2DA por citometría de flujo. En los gráficos se representa la intensidad de fluorescencia media, expresada como porcentaje respecto al control. Los datos corresponden al valor promedio ± EEM de dos experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado (**p<0,01; ANOVA de un factor y test de Dunnett a posteriori).

Efecto del CPF sobre los niveles del anión O₂^{•-}

Como describimos anteriormente, el CPF 50 μM incrementa los niveles de ERO en la línea celular MDA-MB-231 y este efecto no es revertido por la presencia de CAT en el medio de cultivo. Con el fin de comprobar la existencia de otras especies oxidantes, evaluamos la presencia O₂^{•-} en esta línea celular expuesta a CPF 50 μM o vehículo. Debido a la gran reactividad de esta molécula, su determinación fue realizada mediante la formación de un aducto utilizando un atrapador de espín como el DMPO. El aducto formado entre el DMPO-O₂^{•-} resulta inestable y rápidamente se transforma en el aducto DMPO-HO[•]. La presencia de este aducto fue posteriormente determinada mediante EPR como se indica en el apartado de materiales y métodos de este trabajo.

Debido a que el anión $O_2^{\cdot-}$ es una especie química altamente inestable (Boveris, 1998), decidimos evaluar su presencia siguiendo diferentes protocolos de trabajo, los cuales se detallan a continuación:

- A- Las células fueron expuestas a CPF 50 μ M en presencia de DMPO 50 mM durante 1 hora.
- B- Las células fueron expuestas a CPF 50 μ M durante 24 horas, y el DMPO 50 mM fue agregado al cultivo 1 hora antes de su medición.

Cabe mencionar, que las concentraciones de DMPO reportadas en la literatura resultaron sumamente tóxicas para las células utilizadas en este trabajo, causando la muerte de las mismas luego de 15 minutos de exposición. Por este motivo, decidimos realizar los experimentos utilizando concentraciones menores de DMPO que las recomendadas en la bibliografía. Como control positivo del experimento, se determinó la generación del aducto DMPO- HO^{\cdot} mediante la reacción de Fenton.

La formación del aducto DMPO- HO^{\cdot} queda evidenciada mediante el registro de su espectro característico de cuatriplete 1:2:2:1 con $a^N = a^H = 14,9$ gauss (Rosen and Freeman, 1984) (Fig. III.3.C), el cual no fue observado en las células MDA-MB-231 en ninguna de las condiciones experimentales evaluadas (Fig. III.3A y III.3.B).

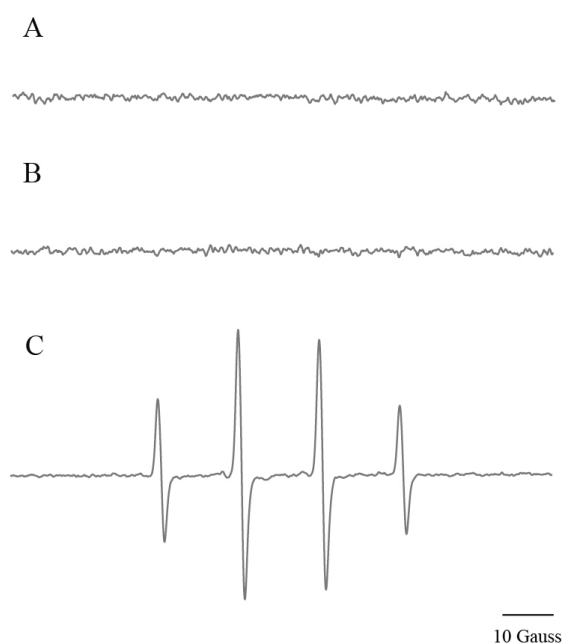


Figura III.3. Determinación de $O_2^{\cdot-}$. La determinación de $O_2^{\cdot-}$ fue realizada mediante EPR. Las determinaciones fueron realizadas a temperatura ambiente. Los espectros fueron medidos a 20 mW de potencia, 0,5 G de amplitud modulada, 1×10^5 de ganancia, tiempo de conversión 164 ms, constante de tiempo 164 ms. Número de barridos: 9. Volumen de muestra 100 μ l. **A)** células MDA-MB-231 previamente incubadas en presencia de CPF 50 μ M y DMPO 50 mM durante 1 hora. **B)** células MDA-MB-231 previamente incubadas en presencia de CPF 50 μ M durante 24 horas a las cuales se les adicionó DMPO 50 mM 1 hora antes de su medición. **C)** reacción de Fenton.

Efecto del CPF sobre los niveles de ERN

Como describimos anteriormente, las ERN son un grupo de compuestos químicos altamente reactivos derivados del óxido nítrico. En las células animales, la reacción del óxido nítrico con el anión $O_2^{\cdot-}$ da lugar a la formación de $ONOO^-$, una de las especies más oxidantes dentro de este grupo. Estas especies químicas actúan en conjunto con las ERO produciendo daño en las células y provocando estrés nitrosativo. Los niveles de ERN fueron determinados por citometría de flujo utilizando la sonda fluorescente DAF-2DA en ambas líneas celulares cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de CPF o vehículo durante 24 horas. Como se observa en la figura III.4 la exposición de las células MCF-7 a CPF 50 μ M no modificó los niveles de ERN respecto a los valores obtenidos en las células control. En cambio, en la línea MDA-MB-231, las células expuestas a CPF 50 μ M presentaron valores de ERN que superaron en 21,5 % ($p < 0,01$) los niveles obtenidos en las células expuestas al vehículo. El cultivo de ambas líneas celulares en presencia de concentraciones menores de CPF no produjo modificaciones en este parámetro.

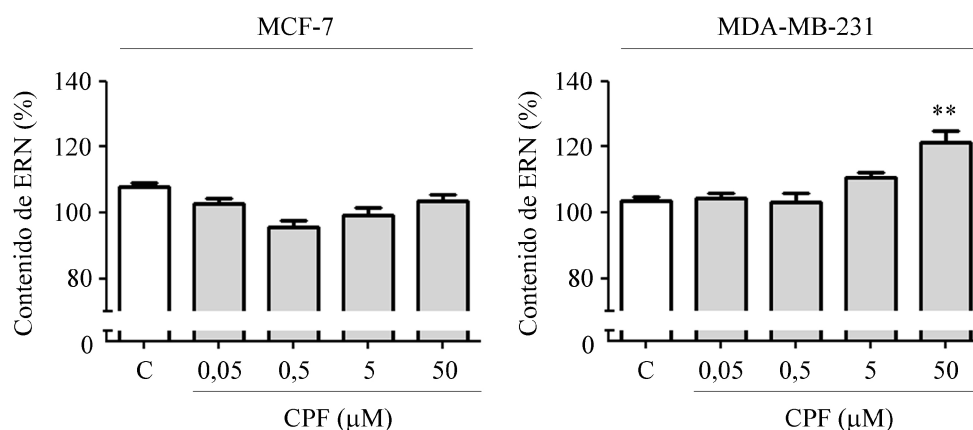


Figura III.4. Efecto del CPF sobre el contenido de ERN. Las células fueron cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de CPF o vehículo (C) durante 24 horas. El contenido de ERN fue determinado midiendo la intensidad de fluorescencia de DAF-2DA por citometría de flujo. En los gráficos se representa la intensidad de fluorescencia media, expresada como porcentaje respecto al control. Se representa el valor promedio \pm EEM de dos experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado (** $p < 0,01$; ANOVA de un factor y Test de Dunnett a posteriori).

Efectos del CPF sobre el sistema antioxidante celular

A lo largo de su historia evolutiva, los organismos aeróbicos han incorporado numerosos mecanismos de defensa ante el incremento intracelular de las ERO. Entre las diferentes estrategias se incluyen mecanismos preventivos, de reparación, defensas físicas y defensas antioxidantes. El sistema antioxidante celular incluye a los componentes enzimáticos, entre los que se encuentran las enzimas SOD y CAT, y a compuestos no enzimáticos entre los que se encuentra el GSH. En condiciones normales, existe un equilibrio entre las ERO y las defensas antioxidantes.

Debido a que hemos observado un incremento en los niveles de ERO celulares luego de la exposición a CPF 50 μM durante 24 horas, nos propusimos evaluar la actividad de los diferentes componentes antioxidantes en presencia del plaguicida.

Efecto sobre el contenido de la enzima CAT

La proteína CAT es un componente clave del sistema antioxidante celular. Esta enzima elimina el exceso de H_2O_2 que puede generar daño en los sistemas biológicos. La figura III.5 muestra el contenido de CAT en lisados celulares luego de la exposición a diferentes concentraciones de CPF durante 24 horas, determinado mediante western blot. Como puede observarse, el contenido de CAT no se vio afectado por la exposición al CPF en ninguna de las concentraciones evaluadas. Este resultado fue similar en ambas líneas celulares (Fig. III.5).

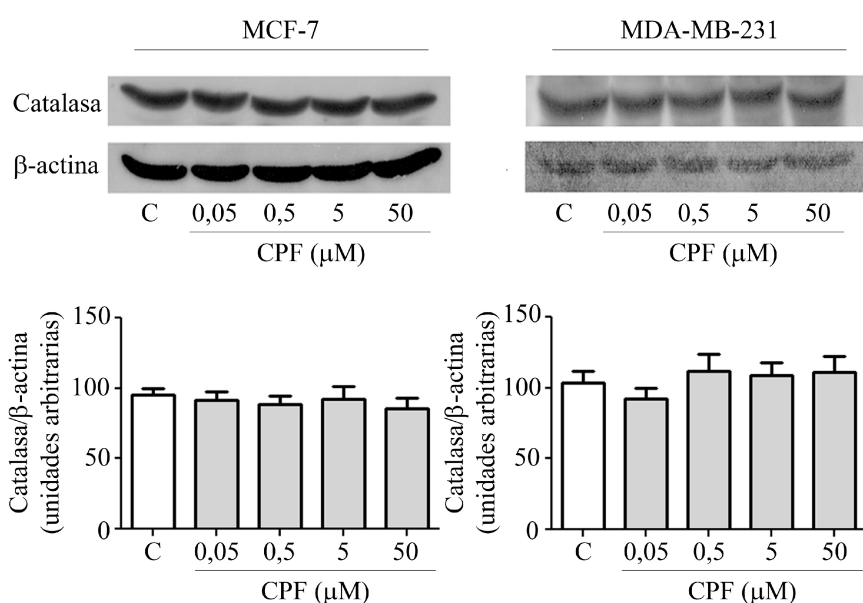


Figura III.5. Efecto sobre el contenido de la enzima CAT. Las células fueron cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de CPF o vehículo (C) durante 24 horas. La expresión de la enzima CAT se determinó por western blot. Se muestran las fotografías de un experimento representativo. Debajo de cada grupo de fotografías, se representa gráficamente la cuantificación densitométrica de la señal correspondiente a CAT normalizada respecto al contenido de β -actina en cada calle. Las barras representan la media \pm EEM de dos experimentos independientes (p:ns; ANOVA de un factor y Test de Dunnett a posteriori).

Efecto sobre la actividad CAT

Debido a que no observamos modificaciones en el contenido de la proteína CAT, decidimos investigar si el CPF modifica la actividad de dicha enzima en nuestro sistema de estudio. La actividad CAT fue evaluada siguiendo espectrofotométricamente la disminución de la concentración de H_2O_2 . Como se observa en la figura III.6, la exposición de las células MCF-7 a CPF 5 y 50 μM durante 24 horas resultó en un incremento de la actividad CAT respecto a la actividad presente en las células expuestas al vehículo durante el mismo tiempo. Este incremento fue del 75,4 % ($p < 0,01$) cuando las células fueron cultivadas en presencia de CPF 5 μM y 54,2 % ($p < 0,01$) cuando la concentración del plaguicida fue 50 μM . Concentraciones menores de CPF no modificaron la actividad de esta enzima respecto al tratamiento control. En la línea MDA-MB-231, la incubación de las células en presencia de CPF 0,5, 5 y 50 μM condujo a un incremento no significativo en la actividad CAT respecto al mismo parámetro evaluado en las células control. La menor concentración de CPF ensayada (0,05 μM) no produjo modificaciones en la actividad CAT de esta línea celular.

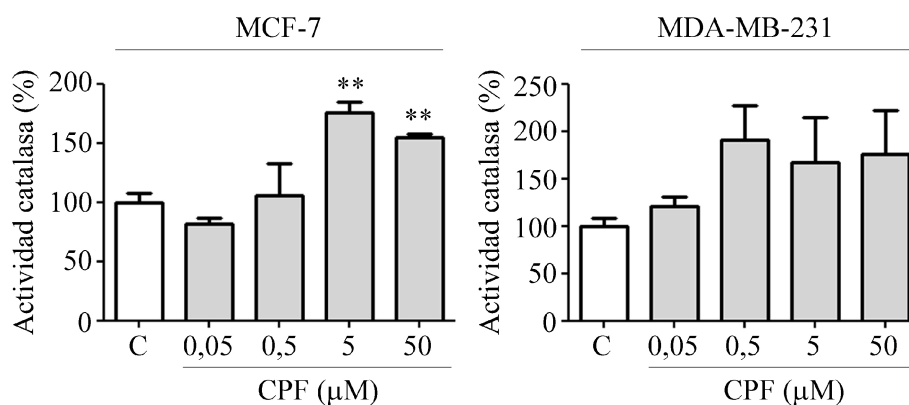


Figura III.6. Efecto sobre la actividad CAT. Las células fueron cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de CPF o vehículo (C) durante 24 horas. La actividad de la enzima CAT fue determinada espectrofotométricamente a 240 nm. En los gráficos se representa la actividad CAT presente en cada muestra como porcentaje respecto al control. Se muestra la media \pm EEM de tres experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado (** $p < 0,01$; ANOVA de un factor y Test de Dunnett a posteriori).

Efecto sobre la expresión de SOD

La SOD es una enzima que se encuentra presente en todos los tipos celulares y tiene un papel fundamental en la protección de las células y tejidos contra el estrés oxidativo. Si bien existen diferentes isoformas, todas catalizan la dismutación del radical $O_2^{\cdot-}$ generando H_2O_2 . Su actividad se encuentra regulada por los niveles de H_2O_2 y, por lo tanto, presenta mecanismos de retroalimentación con la enzima CAT (Gottfredsen et al., 2013; Tarhan and Tüzmen, 2000). La determinación del contenido celular de la isoforma citosólica, denominada CuZn SOD, fue realizada mediante western blot en lisados de células expuestas a diferentes concentraciones de CPF durante 24 horas. Como se muestra en la figura III.7, el contenido de esta proteína no se encontró afectado significativamente por la exposición al CPF en ninguna de las concentraciones evaluadas. Este resultado fue similar en ambas líneas celulares.

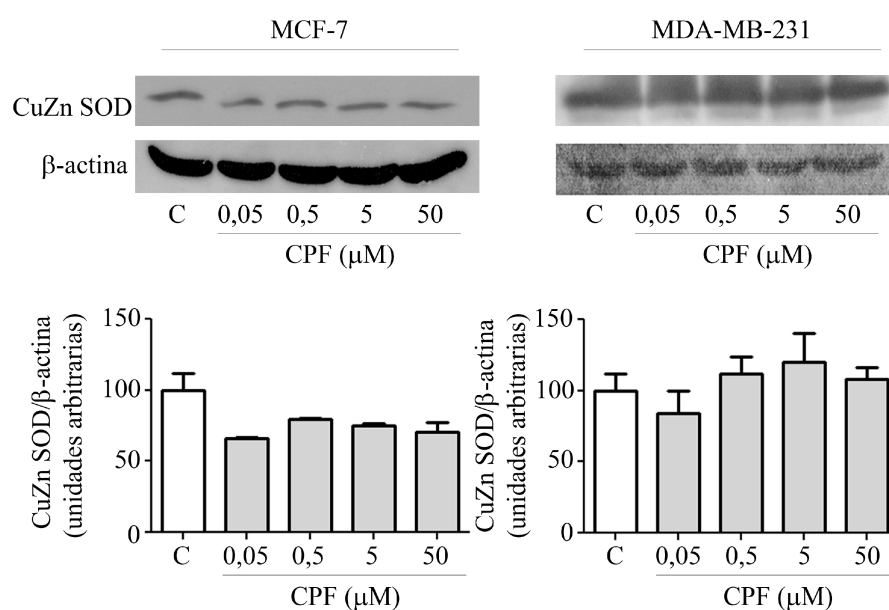


Figura III.7. Efecto sobre el contenido de la enzima CuZn SOD. Las células fueron cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de CPF o vehículo (C) durante 24 horas. La expresión de la enzima CuZn SOD fue determinada por western blot. Se muestran las fotografías de un experimento representativo. Debajo de cada grupo de fotografías se representa gráficamente la cuantificación densitométrica de la señal correspondiente a CuZn SOD normalizada respecto al contenido de β-actina en cada calle. Se representa la media ± EEM de dos experimentos independientes (p:ns; ANOVA de un factor y Test de Dunnett a posteriori).

Efecto sobre la actividad SOD

Debido a que no observamos modificaciones en la expresión de la proteína CuZn SOD, decidimos investigar si el CPF modifica la actividad de dicha enzima en nuestro sistema de estudio. La actividad SOD fue evaluada espectrofotométricamente como se detalló en los materiales y métodos. Como se observa en la figura III.8, la exposición de las células MCF-7 a CPF 5 y 50 μM condujo a una disminución en la actividad SOD celular. Si bien esta diferencia solo fue significativa cuando las células se cultivaron en presencia de CPF 50 μM (57,1 % por debajo del control, $p < 0,05$), también se encontró una tendencia a la disminución de la actividad SOD cuando las células fueron expuestas a CPF 5 μM (48,5 % por debajo del control, p :ns). La exposición de esta línea celular a CPF 0,5 y 0,05 μM no modificó la actividad enzimática. Por otra parte, en la línea celular MDA-MB-231, no encontramos diferencias respecto al tratamiento control con ninguna de las concentraciones de CPF utilizadas.

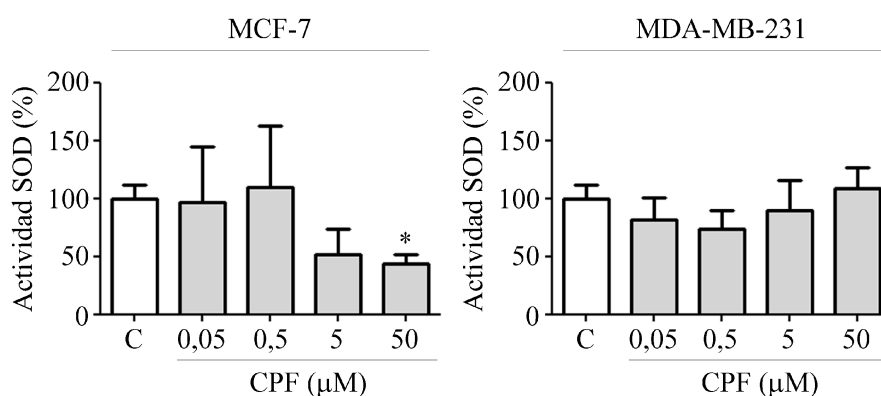


Figura III.8. Efecto sobre la actividad SOD. Las células fueron cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de CPF o vehículo (C) durante 24 horas. La actividad de la enzima SOD fue determinada espectrofotométricamente como se detalla en materiales y métodos. En los gráficos se representa la actividad SOD presente en cada muestra como porcentaje respecto al control. Se muestra el valor promedio \pm EEM de tres experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado (* $p < 0,05$; ANOVA de un factor y Test de Dunnett a posteriori).

Evaluación de la capacidad antioxidante basal de las líneas celulares

Debido a las diferencias observadas en la respuesta antioxidante de ambas líneas celulares frente al CPF 50 μ M, decidimos evaluar los niveles basales de las enzimas CAT y SOD de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231. Para ello, las células fueron cultivadas durante 24 horas en presencia de EtOH 0,5% (vehículo) y las actividades enzimáticas fueron evaluadas. Nuestros resultados mostraron que las células MDA-MB-231 presentan mayores niveles antioxidantes que la línea celular MCF-7. De esta manera, la línea celular MCF-7 muestra una actividad CAT media de $1,88 \pm 0,27$ U/mg proteína, mientras que las células MDA-MB-231 la actividad basal de esta enzima asciende a $5,75 \pm 1,76$ U/mg proteína. Por otra parte, la actividad media de la enzima SOD fue de $1,29 \pm 0,36$ y $5,9 \pm 0,97$ U/mg proteína en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 respectivamente (Fig. III.9). Como discutiremos próximamente, es posible que este hecho sea la causa de las diferencias observadas frente a la exposición a CPF 50 μ M en ambas líneas celulares.

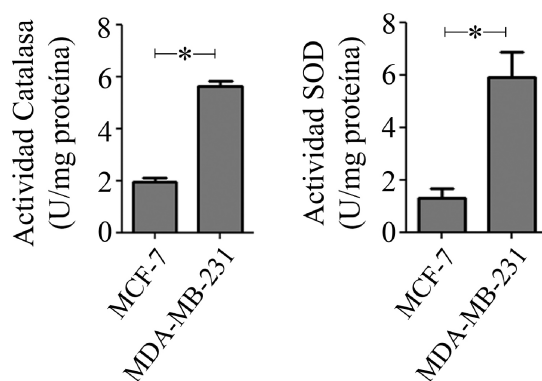


Figura III.9. Niveles basales de actividad CAT y SOD. Las células fueron cultivadas en presencia de EtOH 0,5 % durante 24 horas. La actividad de las enzimas CAT y SOD fue determinada espectrofotométricamente. En los gráficos se representan las actividades enzimáticas en ambas líneas celulares como unidades enzimáticas por mg de proteína. Se muestra la media \pm EEM de dos experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado (* $p < 0,05$; T-test para muestras no apareadas).

Efecto sobre el contenido de GSH

El GSH es el péptido más abundante de las células y presenta importantes funciones en la homeostasis celular. Además de participar directamente en la neutralización de ERO, actúa como cofactor de varias enzimas antioxidantes. Adicionalmente, el GSH participa en la eliminación de compuestos tóxicos a través de la conjugación catalizada por la enzima GST. La figura III.10 muestra los niveles de GSH presentes en ambas líneas celulares cultivadas en presencia del plaguicida durante 24 horas. Este parámetro fue evaluado espectrofotométricamente mediante la determinación del contenido de grupos -SH presentes en las células. La incubación de ambas líneas celulares con diferentes concentraciones de CPF no produjo cambios significativos en el contenido intracelular de GSH, indicando que este mecanismo no es importante en la defensa celular contra el estrés oxidativo inducido por el tóxico.

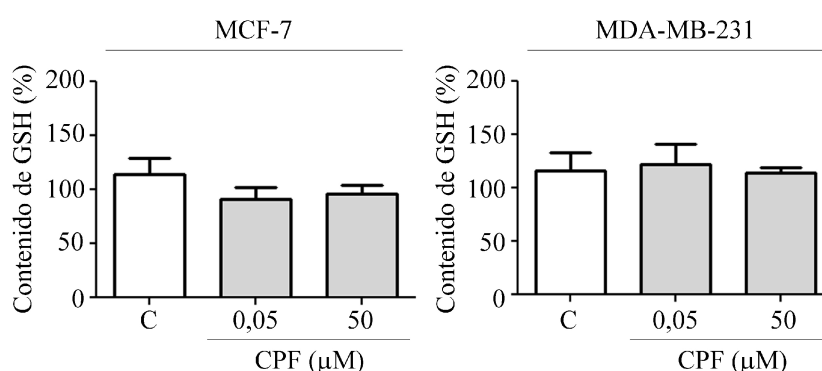


Figura III.10. Efecto sobre el contenido celular de GSH. Las células fueron cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de CPF o vehículo (C) durante 24 horas. El contenido de GSH fue determinado espectrofotométricamente. En los gráficos se representa el contenido de GSH presente en cada muestra como porcentaje respecto al control. Se muestra la media \pm EEM de dos experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado (p:ns; ANOVA de un factor y Test de Dunnett a posteriori).

Efectos sobre el daño oxidativo a macromoléculas

Como se describió anteriormente, el cultivo de ambas líneas celulares en presencia de CPF 50 μM durante 24 horas condujo a un incremento en los niveles de ERO junto con una respuesta por parte del sistema antioxidante enzimático. En el primer capítulo de esta tesis, describimos los efectos del CPF 50 μM sobre la proliferación celular, donde observamos una disminución en la capacidad clonogénica asociada a alteraciones del ciclo celular seguidas por un incremento de células necróticas. Con el fin de investigar la participación de las ERO y las ERN en estos procesos, decidimos evaluar el daño oxidativo a diferentes macromoléculas producido por el CPF. Específicamente, analizamos el efecto de este plaguicida sobre la peroxidación lipídica y la nitración de proteínas.

Efectos del CPF sobre el daño a lípidos

El daño a lípidos fue evaluado mediante la cuantificación de TBARS, luego de la exposición de las células a diferentes concentraciones de CPF o vehículo durante 24 horas. El MDA es uno de los principales productos generados a partir de la degradación oxidativa de los ácidos grasos insaturados de las membranas celulares. Este compuesto reacciona con el ácido tiobarbitúrico dando lugar a la aparición de un compuesto rosado cuantificable.

Como se observa en la figura III.11, la exposición de las células MCF-7 a CPF 50 μM incrementó la peroxidación lipídica en un 50,4 % ($p < 0,05$). Sin embargo, una menor concentración de CPF (0,05 μM) no produjo modificaciones en el daño a las membranas de estas células. En la línea celular MDA-MB-231, en cambio, ninguna de las concentraciones de CPF utilizadas modificó significativamente la peroxidación lipídica. Como discutiremos más adelante, este resultado podría relacionarse con los mayores niveles de enzimas antioxidantes CAT y SOD presentes en esta línea celular.

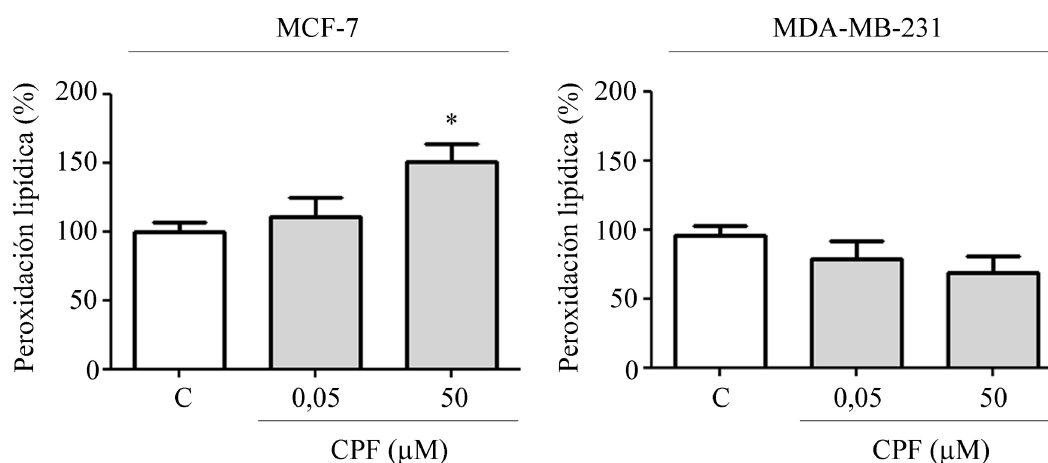


Figura III.11 Efecto sobre la peroxidación lipídica. Las células fueron cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de CPF o vehículo (C) durante 24 horas. La peroxidación lipídica fue evaluada por cuantificación de TBARS. En los gráficos se representan los niveles de peroxidación lipídica presentes en cada muestra como porcentaje respecto al control. Se muestra la media \pm EEM de tres experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado (* $p < 0,05$; ANOVA de un factor y Test de Dunnett a posteriori).

Daño oxidativo a proteínas

Como describimos en la introducción de este trabajo, las ERN constituyen un conjunto de moléculas altamente reactivas derivadas del óxido nítrico. El ONOO^- , producto de la reacción del óxido nítrico con el anión $\text{O}_2^{\cdot-}$, es una especie química altamente oxidante capaz de reaccionar con un gran número de moléculas. Entre ellas, la reacción con los residuos tirosínicos de diferentes proteínas ha sido muy estudiada y es utilizada como método de detección de daño celular causado por estrés nitrosativo.

Previamente describimos un incremento en los niveles de ERN en las células MDA-MB-231 expuestas a CPF 50 μM . Con el fin de estudiar el daño a proteínas inducido por estas especies, evaluamos la nitración de residuos tirosínicos en ambas líneas celulares cultivadas en presencia de CPF (0,05 y 50 μM) o vehículo durante 24 horas (Fig. III.12). Como puede observarse, el CPF no incrementó significativamente la

nitrosación proteica en ninguna de las líneas celulares estudiadas. Este resultado fue independiente de la concentración de plaguicida utilizada.

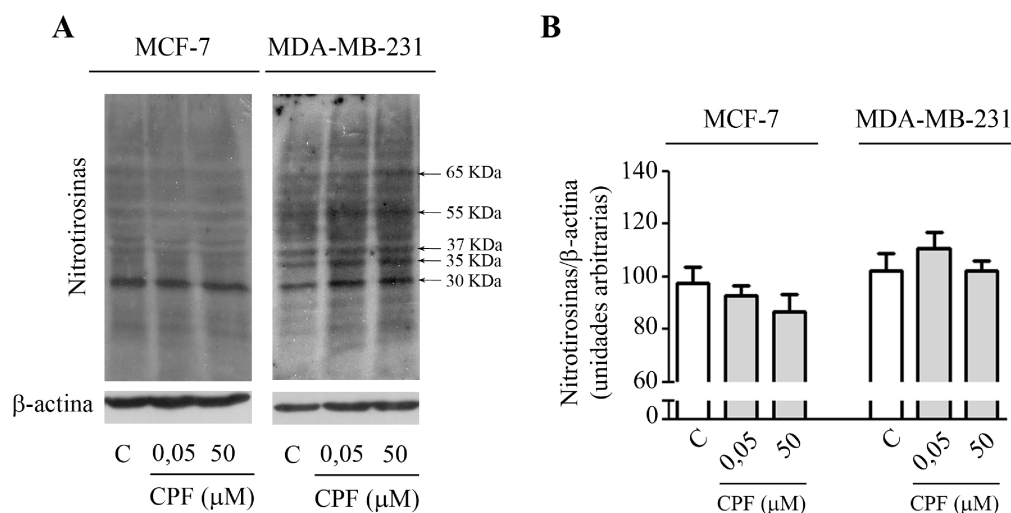


Figura III.12. Efecto del CPF sobre la nitrosación proteica. Las células fueron cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de CPF o vehículo (C) durante 24 horas. **A)** La presencia de nitrotirosinas fue determinada por western blot. Se muestran las fotografías de un experimento representativo. **B)** Representación gráfica de la cuantificación densitométrica de la señal correspondiente a las bandas señaladas (30, 35, 37, 55 y 65 KDa), normalizadas respecto al contenido de β -actina en cada calle. Se representa la media \pm EEM de dos experimentos independientes (p:ns; ANOVA de un factor y Test de Dunnett a posteriori).

Implicancias del desbalance redox sobre la capacidad clonogénica celular

En los ensayos descritos anteriormente, identificamos un incremento de las ERO en ambas líneas celulares cultivadas en presencia de CPF 50 μ M durante 24 horas. En las células MDA-MB-231, adicionalmente, observamos un leve incremento en las ERN sin alteraciones en los niveles de nitrotirosinas. Estos resultados podrían evidenciar un papel importante de las ERO en el efecto antiproliferativo causado por el plaguicida.

Con el fin de verificar la implicancia de las ERO sobre la disminución de la capacidad clonogénica producida por el CPF 50 μ M, decidimos evaluar la proliferación celular en presencia de la enzima CAT, la cual cataliza la descomposición del H_2O_2 , dando como resultado oxígeno y agua. En primer lugar, con el fin de seleccionar la actividad CAT que se utilizará en el experimento, investigamos el efecto de esta enzima sobre la proliferación en ambas líneas celulares. Las actividades evaluadas fueron 10, 30 y 60 U/ml, de acuerdo a experiencias previas de nuestro grupo de trabajo en otras líneas celulares. Como se observa en la figura III.13, la presencia de 60 U/ml de CAT redujo la capacidad clonogénica en las células MCF-7 en un 40,7 % ($p < 0,05$), mientras que no se observaron cambios en la capacidad clonogénica cuando utilizamos menores concentraciones de la enzima. En la línea MDA-MB-231, ninguna de las concentraciones enzimáticas modificó la formación de colonias.

Debido a que 30 U/ml de CAT no afectaron la capacidad clonogénica en ninguna de las líneas celulares, y dado que fue la concentración utilizada en la determinación de la contribución del H_2O_2 en el incremento de ERO producido por el CPF, esta fue la concentración enzimática seleccionada para los ensayos posteriores.

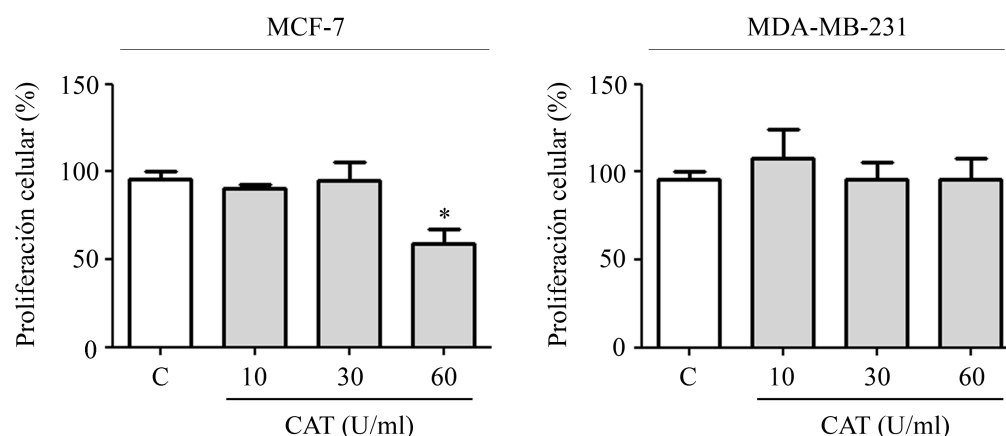


Figura III.13 Efecto de la CAT sobre la capacidad clonogénica. Las células fueron expuestas a concentraciones variables de CAT durante 10 días. En los gráficos se muestran los porcentajes de colonias formadas en ambas líneas celulares para cada concentración estudiada respecto al control. Las barras representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado (* $p < 0,05$; ANOVA de un factor y Test Dunnett a posteriori).

Una vez seleccionada la concentración de CAT, las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de CPF, en presencia y ausencia de 30 U/ml de CAT. Nuestros resultados mostraron que la presencia de CAT protege a las células frente a los efectos antiproliferativos inducidos por el CPF 50 μ M. Este resultado fue observado en ambas líneas celulares e indica un papel preponderante de las ERO en la disminución de la proliferación producida por el plaguicida (Fig. III.14).

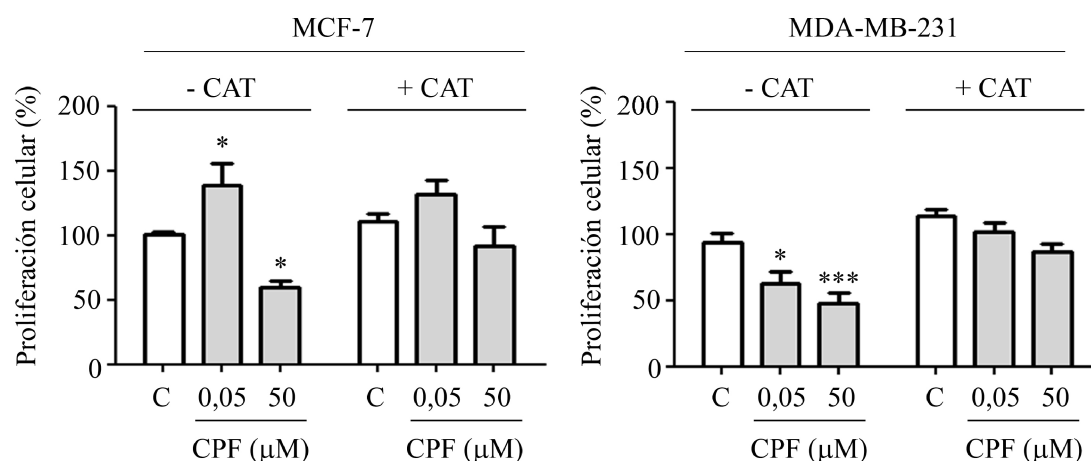


Figura III.14. Efecto de la enzima CAT sobre el efecto antiproliferativo inducido por el CPF. Las células fueron expuestas a CPF o vehículo (C), en presencia y ausencia de 30 U/ml de CAT durante 10 días. En los gráficos se muestran los porcentajes de colonias formadas en ambas líneas celulares para cada concentración estudiada respecto al correspondiente control. Las barras representan la media \pm EEM de dos experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; ANOVA de un factor y Test Dunnett a posteriori).

Vías de señalización implicadas en la muerte celular inducida por CPF

Un número importante de investigaciones coinciden en que el estrés oxidativo constituye un elemento clave en la activación de diferentes vías de transducción de señales (Afanas'ev, 2011; Kamata et al., 2005; Liu et al., 2008; Wu, 2006). Las MAPKs conforman una familia de quinasas encargadas de transferir señales extracelulares hacia el interior de las células, regulando una amplia variedad de procesos a través de la activación de diferentes proteínas. En células de mamíferos, se han descrito tres

proteínas: p38, JNK y ERK1/2 las cuales son activadas por estrés oxidativo (Cruickshanks et al., 2012; Kamata et al., 2005; Subramaniam and Unsicker, 2010; Torres, 2003; Wu, 2006). Por lo expuesto anteriormente, decidimos evaluar el efecto del CPF sobre la activación de las proteínas p38 y ERK1/2 en las diferentes líneas celulares y su relación con los efectos sobre el sistema redox observados previamente.

Efecto sobre la fosforilación de la proteína p38

Un importante miembro de la familia de las MAPKs es la proteína p38. Esta proteína es inducible por las ERO y su activación se encuentra relacionada con la muerte celular. Con el objetivo de investigar el efecto del CPF sobre la regulación de esta proteína, evaluamos su fosforilación en ambas líneas celulares expuestas a diferentes concentraciones de CPF durante 5 y 15 minutos. Como se observa en la figura III.15, la exposición de las células MCF-7 a ambas concentraciones de CPF no produjo modificaciones en la fosforilación de la proteína p38 en ninguno de los tiempos evaluados. Sin embargo, en la línea celular MDA-MB-231, evidenciamos un incremento significativo en los niveles de p-p38 respecto a los niveles presentes en el control cuando las células fueron expuestas a CPF 50 μ M durante 15 minutos.

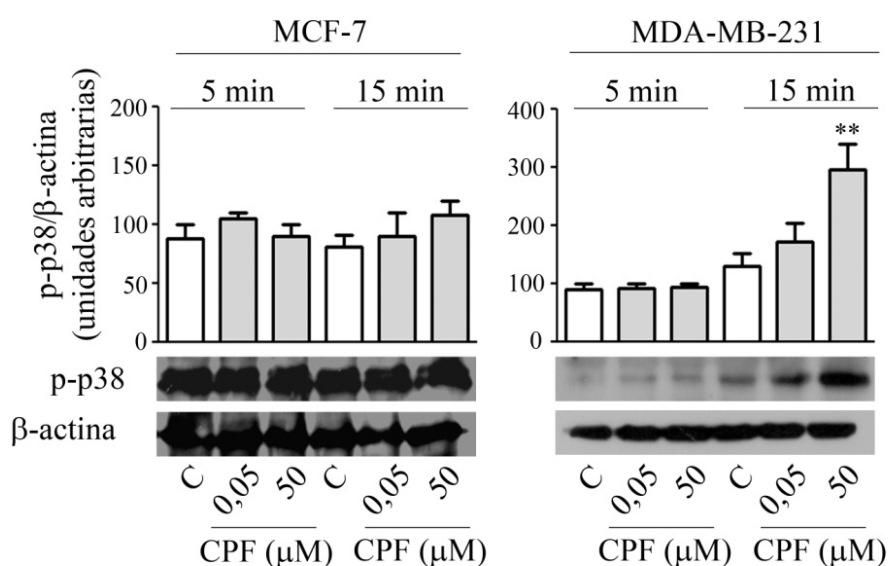


Figura III.15. Efecto del CPF sobre la fosforilación de p38. Las células fueron privadas de suero durante 24 horas y luego expuestas a diferentes concentraciones de CPF o vehículo (C) durante 5 y 15 minutos. La fosforilación de la proteína p38 fue determinada por western blot. Se muestran las fotografías de un experimento representativo. Sobre cada conjunto de fotografías se representan gráficamente la cuantificación densitométrica de la señal de p-p38 normalizada respecto al contenido de β -actina presente en cada calle. Se representa la media \pm EEM de dos experimentos independientes. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al tratamiento control para cada tiempo evaluado (** $p < 0,01$ vs. su respectivo control; ANOVA de un factor y Test Dunnett a posteriori).

Efecto sobre la fosforilación de la proteína ERK1/2

Otro miembro de la familia MAPKs es la quinasa ERK1/2. Como describimos anteriormente, el incremento en las ERO ha sido relacionado con la activación de varias vías de transducción de señales, incluyendo la proteína ERK1/2. El efecto del CPF sobre la activación de ERK1/2 fue evaluado mediante western blot, analizando su fosforilación en células expuestas a CPF (0,05 y 50 μ M) o vehículo durante diferentes tiempos. Como muestra la figura III.16, el plaguicida incrementó la fosforilación de ERK1/2 en ambas líneas celulares. En la línea MCF-7 (Fig. III.16.A), el CPF 50 μ M produjo un incremento en la fosforilación de esta quinasa luego de 15 minutos de exposición (50,0 %, $p < 0,05$) y la misma se mantuvo elevada hasta 1 hora posterior al agregado de CPF 50 μ M (92,3 %, $p < 0,01$).

En la línea celular MDA-MB-231 (Fig. III.16.B), observamos un incremento del 39,4 % ($p < 0,05$) en la fosforilación de ERK1/2 luego de 5 minutos de exposición al plaguicida (50 μ M). En estas células, también detectamos un incremento en los niveles de p-ERK1/2 cuando las células fueron cultivadas en presencia de CPF 50 μ M durante 15 minutos (76,9 %, $p < 0,01$). Luego de 1 hora de exposición al CPF, si bien se observó un leve incremento en los niveles de p-ERK1/2 respecto al tratamiento control, el mismo no fue significativo estadísticamente.

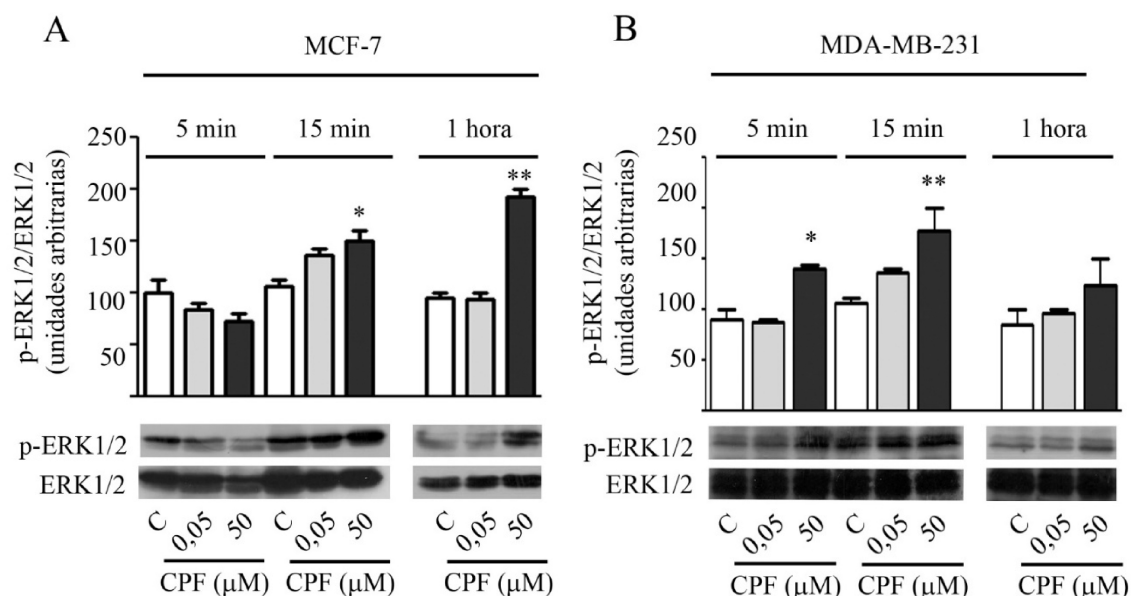


Figura III.16. Efecto del CPF sobre la fosforilación de ERK1/2. Las células (A) MCF-7 y (B) MDA-MB-231 fueron privadas de suero durante 24 horas y luego expuestas a CPF (0,05 y 50 μM) o vehículo (C) durante diferentes tiempos. La fosforilación de la proteína ERK1/2 fue determinada por western blot. Se muestran las fotografías de un experimento representativo. Sobre cada conjunto de fotografías se representan gráficamente la cuantificación densitométrica de la señal de p-ERK1/2 normalizada respecto al contenido de ERK1/2 total presente en cada calle. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al tratamiento control en cada tiempo evaluado. Se representa la media ± EEM de dos experimentos independientes (*p<0,05; **p<0,01 vs. su respectivo control; ANOVA de un factor y Test Dunnett a posteriori).

Efecto de la fosforilación de la proteína ERK1/2 y p38 sobre la proliferación celular

La activación de las proteínas p38 y ERK1/2 han sido ampliamente relacionadas con los procesos de muerte y proliferación celular. Como se discutirá más adelante en este trabajo, si bien la activación de ERK1/2 ha sido tradicionalmente relacionada con efectos proliferativos, en los últimos años se han publicado numerosos trabajos que documentan su papel en los procesos de muerte celular (Meng et al., 2012; Subramaniam and Unsicker, 2010).

Debido a que observamos un incremento en la fosforilación de dichas proteínas en las células expuestas a CPF 50 μM , decidimos evaluar si la disminución en la capacidad clonogénica observada anteriormente, se encuentra relacionada con la activación de estas quinasas. Para ello, evaluamos la proliferación celular en presencia y ausencia de diferentes inhibidores de las MAPK. Por un lado, utilizamos el compuesto SB203580, el cual inhibe específicamente la fosforilación de la proteína p38. Por otra parte, utilizamos el compuesto PD98059, el cual inhibe específicamente a la quinasa MEK1, impidiendo de esta manera la posterior fosforilación de ERK1/2.

La concentración utilizada de SB203580 fue seleccionada en base a la bibliografía, como se describió en el apartado de materiales y métodos de esta tesis. En cuanto al inhibidor de ERK1/2, estudiamos la capacidad clonogénica de ambas líneas celulares en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor PD98059 con el fin de determinar la concentración que usaríamos en los ensayos posteriores. Como se observa en la figura III.17, en la línea celular MCF-7, todas las concentraciones del inhibidor ensayadas afectaron la capacidad clonogénica, siendo esta reducción significativa cuando la concentración del inhibidor fue 10 μM (42,4 %, $p < 0,01$) y 30 μM (79,5 %, $p < 0,001$). En la línea celular MDA-MB-231, el inhibidor PD98059 en concentración 30 μM redujo significativamente la capacidad clonogénica de las células (59,5 %, $p < 0,05$), mientras que las concentraciones 5 y 10 μM no afectaron significativamente este parámetro. Por este motivo, decidimos utilizar la menor concentración de PD98059 (5 μM), con el fin de asegurar que la capacidad clonogénica no sea afectada.

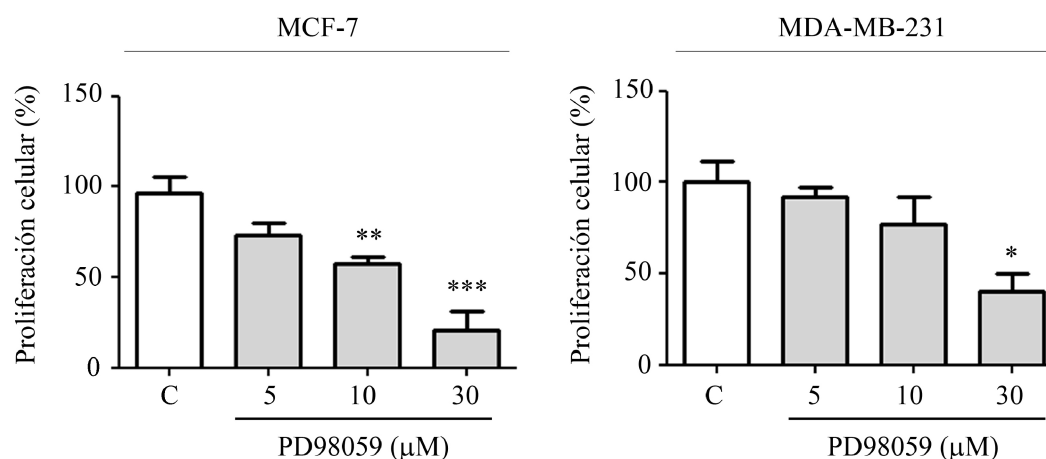


Figura III.17. Efecto del inhibidor PD98059 sobre la proliferación celular. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones del inhibidor de MEK1, PD98059, durante 10 días. En los gráficos se muestran los porcentajes de colonias formadas en ambas líneas celulares para cada concentración estudiada respecto al correspondiente control. Las barras representan la media \pm EEM de dos experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ANOVA de un factor y Test Dunnett a posteriori).

Una vez seleccionadas las concentraciones de los inhibidores, evaluamos su efecto sobre la proliferación celular en presencia de diferentes concentraciones de CPF. Debido a que observamos un incremento en la fosforilación de la proteína p38 en la línea celular MDA-MB-231 expuesta a CPF 50 μM , evaluamos la proliferación celular en estas células en presencia del inhibidor de p38. Como se observa en la figura III.18, el efecto antiproliferativo ejercido por el CPF no se encontró modificado en presencia de este inhibidor SB203580, indicando que la activación de esta vía de señalización no constituye un evento significativo en la inhibición de la capacidad clonogénica inducida por el tóxico.

Adicionalmente, dado el aumento de p-ERK1/2 en ambas líneas celulares expuestas a CPF 50 μM , analizamos el efecto del inhibidor de MEK1, PD98059, sobre la capacidad clonogénica en presencia de diferentes concentraciones del plaguicida. Como puede observarse, la inhibición de la fosforilación de ERK1/2 evitó la disminución en la capacidad clonogénica producida por el CPF 50 μM en las células

MDA-MB-231. Este ensayo solo fue realizado en la línea celular MDA-MB-231, dado que la exposición combinada de CPF y PD98059 no permitió el crecimiento de las células MCF-7.

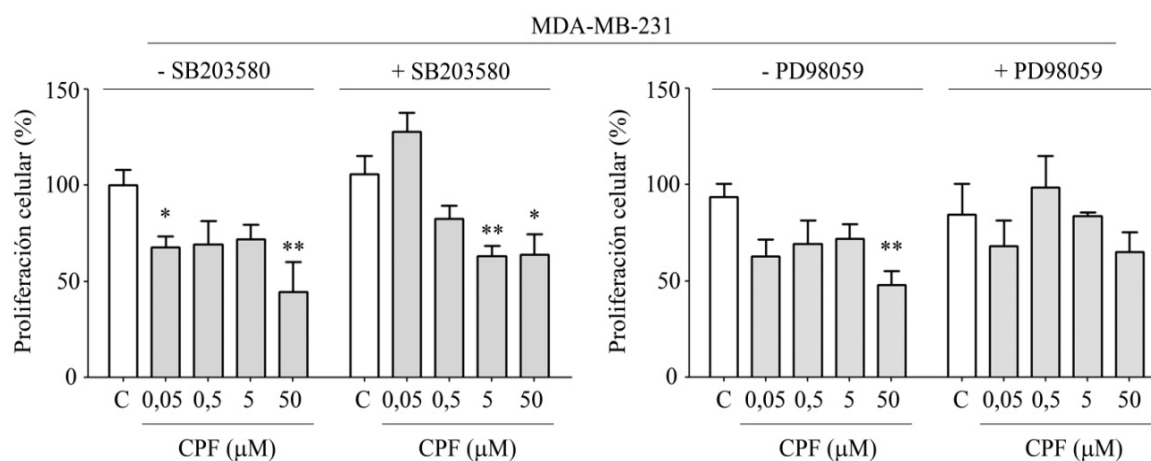


Figura III.18. Efecto de la fosforilación de las proteínas p38 y ERK1/2 sobre la proliferación celular. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de CPF o vehículo (C), en presencia y ausencia de SB203580 (10 μM) o PD98059 (5 μM) durante 10 días. En los gráficos se muestran los porcentajes de colonias formadas para cada concentración de CPF estudiada respecto al tratamiento control. Las barras representan la media ± EEM de dos experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado (*p<0,05; **p<0,01 vs. su respectivo control; ANOVA de un factor y Test Dunnett a posteriori).

Relación entre el estrés oxidativo y la fosforilación de ERK1/2

Muchos autores han demostrado una relación entre el incremento de especies oxidantes en las células y la activación de diferentes vías de señalización, entre ellas la vía de las MAPK (Torres, 2003; Yoon et al., 2002). Como mostramos anteriormente, la exposición a CPF 50 μM durante 15 minutos incrementó la fosforilación de ERK1/2 en ambas líneas celulares.

Debido a que el efecto inhibitorio producido por el CPF 50 μM sobre la capacidad clonogénica fue revertido tanto por la presencia de CAT como por el

inhibidor de ERK1/2, decidimos evaluar la relación entre el incremento de ERO y la fosforilación de esta quinasa. Para ello, analizamos la fosforilación de dicha proteína en células expuestas a CPF 50 μ M durante 15 minutos en presencia y ausencia de CAT. Adicionalmente, se evaluó la combinación del inhibidor de MEK1 y CPF 50 μ M como control. La exposición de ambas líneas celulares a CPF 50 μ M condujo a un incremento en la fosforilación de ERK1/2, el cual fue revertido completamente tanto por el agregado de CAT como de PD98059 (Fig. III.19).

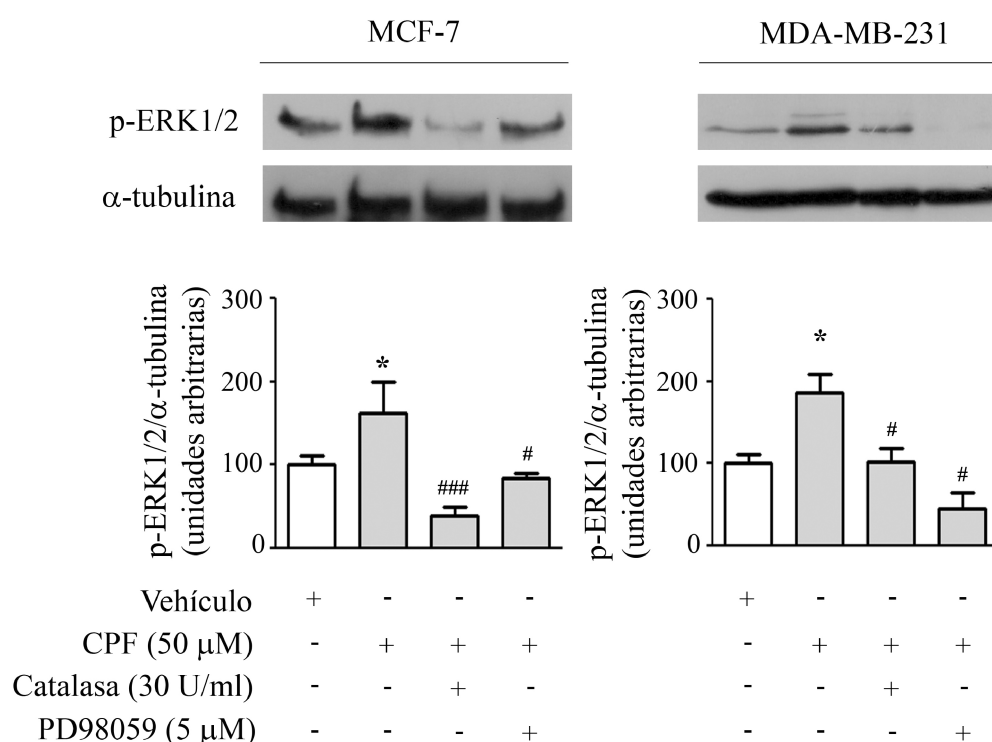


Figura III.19. Relación entre el estrés oxidativo y la fosforilación de ERK1/2. Las células fueron privadas de suero durante 24 horas y luego expuestas durante 15 minutos a: a) vehículo, b) CPF 50 μ M, c) CPF 50 μ M + catalasa 30 U/ml y d) CPF 50 μ M luego del pre-tratamiento con PD95058 (5 μ M). La fosforilación de la proteína ERK1/2 fue determinada por western blot. Se muestran las fotografías de un experimento representativo. Debajo de cada grupo de fotografías, se representa gráficamente la cuantificación densitométrica de la señal de p-ERK1/2 normalizada respecto al contenido de α -tubulina presente en cada calle. Se representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes (* p <0,05 vs. control, # p <0,05 vs. CPF 50 μ M, ### p <0,001 vs. CPF 50 μ M; ANOVA de un factor y Test de comparación múltiple de Tukey a posteriori).

Con el fin de confirmar el papel de las ERO en la activación de la quinasa ERK1/2, evaluamos los niveles de especies oxidantes en un tiempo previo al incremento de p-ERK1/2 observado. Para ello, ambas líneas celulares fueron expuestas a CPF (0,05 y 50 μM) o vehículo durante 10 minutos y la formación de ERO fue evaluada por citometría de flujo como se describió anteriormente. Como se observa en la figura III.20, el cultivo de ambas líneas celulares en presencia de CPF 50 μM durante 10 minutos condujo a un incremento en el contenido intracelular de ERO respecto al tratamiento control. Este incremento fue de un 46,4 % ($p < 0,05$) en las células MCF-7 y de 77,5 % ($p < 0,05$) en las células MDA-MB-231.

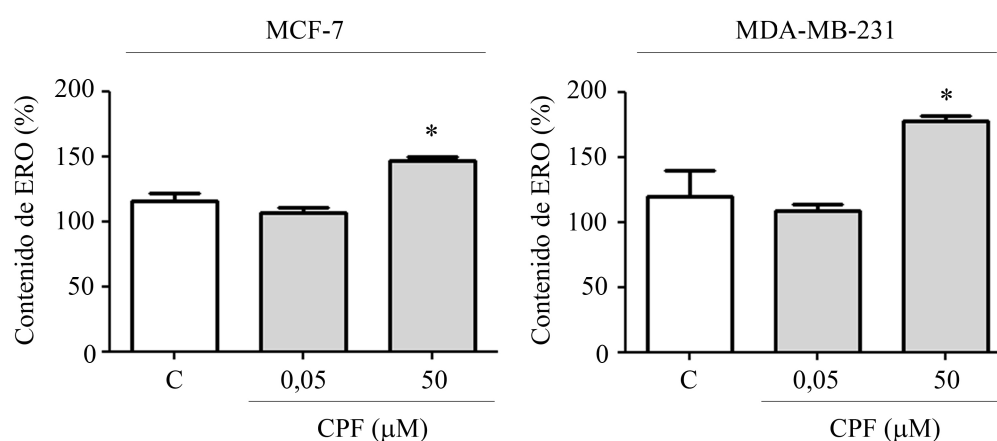


Figura III.20. Efectos del CPF sobre la generación rápida de ERO. Las células fueron cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de CPF o vehículo (C) durante 10 minutos. El contenido intracelular de ERO fue determinado midiendo la intensidad de fluorescencia de DCF-2DA por citometría de flujo. En los gráficos se representa la intensidad de fluorescencia media, expresada como porcentaje respecto al control. Se representa la media \pm EEM de dos experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado (* $p < 0,05$; ANOVA de un factor y test de Dunnett a posteriori).

Previamente observamos que la fosforilación de ERK1/2 inducida por el plaguicida no tiene lugar en presencia de enzima CAT, lo cual indica que el incremento de ERO precede a la activación de ERK1/2. Con el fin de confirmar estos estudios, evaluamos los niveles de ERO en las células expuestas a CPF 50 μ M durante 24 horas, en presencia y ausencia del inhibidor de ERK1/2. Como se observa en la figura III.21, la presencia de PD98059 no impidió el incremento de ERO producido por el CPF 50 μ M en ninguna de las líneas celulares estudiadas. Este resultado, indica que el incremento en los niveles de ERO inducido por el tóxico es un evento independiente de la fosforilación de ERK1/2.

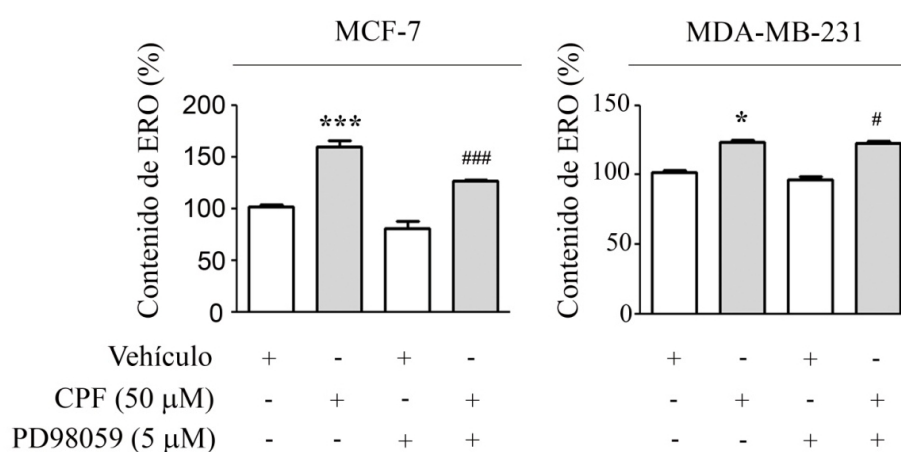


Figura III.21. Efecto de la fosforilación de ERK1/2 sobre la generación de ERO. Las células fueron expuestas a CPF 50 μ M o vehículo, en presencia y ausencia del inhibidor PD98059 durante 24 horas. El contenido de ERO fue determinado midiendo la intensidad de fluorescencia de DCF-2DA por citometría de flujo. En los gráficos se representa la intensidad de fluorescencia media, expresada como porcentaje respecto al control. Se representa la media \pm EEM de tres experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado (* p <0,05 vs. control; *** p <0,001 vs. control; # p <0,05 vs. Control + PD98059; ### p <0,001 vs. Control + PD98059. ANOVA de un factor y test de Tukey a posteriori).

Efecto del CPF sobre el balance redox en la glándula mamaria. Estudios *ex vivo*.

Hasta el momento, describimos los efectos del CPF sobre el balance redox en líneas celulares carcinogénicas humanas. Nuestros resultados mostraron que este

plaguicida incrementa los niveles de especies oxidantes y modifica los componentes antioxidantes enzimáticos celulares. Con el fin de estudiar el estado redox en la glándula mamaria de los animales expuestos de forma prolongada a CPF, evaluamos componentes del sistema antioxidante enzimático y no enzimático, y el daño celular producido por estrés oxidativo. Para ello, utilizamos ratas de la cepa Sprague Dawley, las cuales fueron intoxicadas con CPF (0,01 y 1 mg/Kg/día) o vehículo, como describimos anteriormente.

Efectos del CPF sobre el sistema antioxidante enzimático

La catalasa representa uno de los componentes más importantes de este sistema, dado que cataliza la descomposición de H_2O_2 dentro de las células dando como resultado la producción de agua y oxígeno. La actividad de esta enzima fue evaluada espectrofotométricamente siguiendo la descomposición de H_2O_2 a 240 nm. Como se observa en la figura III.22, en el tejido mamario de las ratas expuestas a ambas dosis de CPF se detectó un leve incremento en la actividad de la enzima CAT, aunque el mismo no resultó significativo.

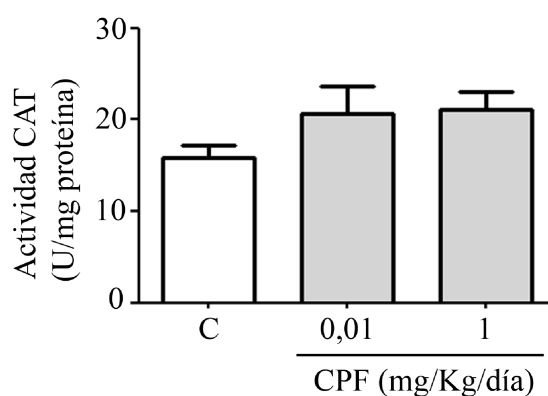


Figura III.22. Efecto sobre la actividad CAT. La actividad de la enzima CAT fue determinada por espectrofotometría a 240 nm a partir del homogenato total de la glándula mamaria de ratas expuestas a CPF (0,01 y 1 mg/kg/día) o vehículo (C) durante 100 días. En el gráfico se muestra la actividad CAT presente en cada muestra como unidades de CAT por mg de proteína. Los valores representan la media \pm EEM de cada grupo (N=6), de dos experimentos independientes (p:ns; ANOVA de un factor).

Efecto del CPF sobre el sistema antioxidante no enzimático

El glutatión es un antioxidante no enzimático que participa directamente en la neutralización de radicales libres y ERO. Con el fin de evaluar el efecto del plaguicida CPF sobre el sistema antioxidante no enzimático, determinamos el contenido de GSH en la glándula mamaria de ratas expuestas a diferentes dosis de CPF o vehículo durante 100 días. Como se muestra en la figura III.23, el contenido de GSH presente en el tejido mamario de ratas expuestas a CPF 1 mg/Kg/día fue significativamente superior al encontrado en el grupo control ($0,74 \pm 0,07$ vs. $0,53 \pm 0,06$ $\mu\text{moles -SH/g}$ de tejido respectivamente, $p < 0,01$). Sin embargo, en la glándula mamaria de las ratas expuestas a CPF 0,01 mg/Kg/día no se encontraron cambios en el contenido de tioles totales (Fig. III.23).

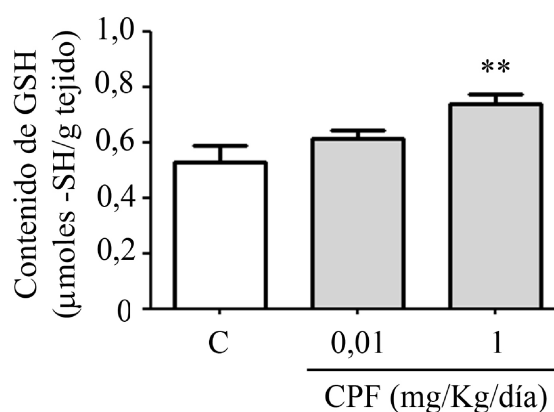


Figura III.23. Efecto sobre el contenido celular de GSH. El contenido de GSH fue determinado espectrofotométricamente en homogenatos de glándula mamaria de ratas expuestas de forma crónica a CPF (0,01 y 1 mg/Kg/día) o vehículo (C). En los gráficos se representa el contenido de GSH de cada grupo (N=6) como micromoles de grupos -SH por gramo de tejido. Se muestra la media \pm DE de cada grupo de un experimento representativo (** $p < 0,01$; ANOVA de un factor y Test de Dunnett a posteriori).

Efecto del CPF sobre el daño celular

El incremento observado en la actividad CAT y en el contenido de GSH podría relacionarse con un incremento en los niveles de ERO inducidos por el tóxico. Como describimos anteriormente, el CPF incrementa las especies oxidantes en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231. El incremento de ERO puede derivar en el daño de diferentes componentes celulares. Con el fin de evaluar el daño celular, realizamos la determinación de TBARS en la glándula mamaria de los animales intoxicados con diferentes dosis de CPF o vehículo. Como se mencionó previamente, mediante esta técnica es posible cuantificar el daño celular, debido a que durante la peroxidación lipídica se produce la alteración de la estructura de los lípidos de las membranas, además de generar metabolitos activos como los radicales $LO\cdot$ y $LOO\cdot$. Como se muestra en la figura III.24, la intoxicación de los animales con el plaguicida no afectó la peroxidación lipídica en la glándula mamaria de las ratas expuestas a CPF en ninguna de las dosis evaluadas en este trabajo.

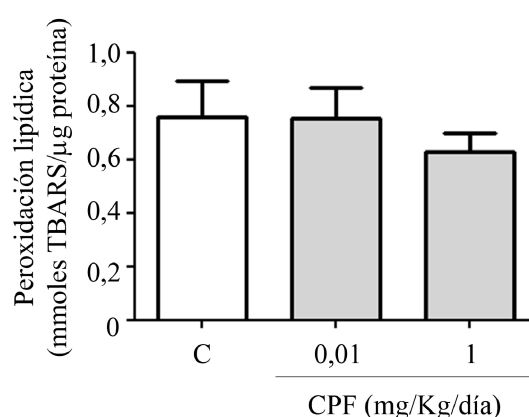


Figura III.24. Efecto del CPF sobre la peroxidación lipídica. La peroxidación lipídica fue evaluada mediante la técnica de TBARS. En los gráficos se representan los niveles de peroxidación lipídica presentes en el tejido mamario de ratas expuestas durante a CPF (0,01 y 1 mg/kg/día) o vehículo (C) durante 100 días. Los resultados se expresan como milimoles de TBARS por microgramo de proteínas. Se muestra la media \pm DE de cada grupo de animales de un experimento representativo, N=6 (p:ns; ANOVA de un factor).

Discusión. *Tercera parte*

En el primer capítulo de esta tesis, describimos los efectos del plaguicida organofosforado clorpirifos sobre la proliferación celular en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231. En ese capítulo, describimos un efecto proliferativo inducido por el CPF 0,05 μM en las células MCF-7, el cual fue mediado por la activación del RE. Sin embargo, una mayor concentración de este plaguicida (50 μM), condujo a una disminución en la capacidad clonogénica en ambas líneas celulares. Si bien el efecto antiproliferativo fue observado luego de 10 días de exposición al tóxico, durante las primeras 24 horas de cultivo observamos modificaciones en el ciclo celular y, posteriormente, un incremento en el porcentaje de células necróticas.

Las ERO son especies químicas fundamentales en el metabolismo celular, debido a que actúan como segundos mensajeros, modificando la expresión génica mediante la activación de diferentes vías de transducción de señales. Sin embargo, como mencionamos en la introducción de este trabajo, un incremento en los niveles de ERO puede derivar en un daño a nivel macromolecular. Por este motivo, las células cuentan con un minucioso sistema de regulación que les permite mantener constantes los niveles de especies oxidantes intracelulares (Trachootham et al., 2008).

Muchos tóxicos ambientales ejercen su efecto mediante el desbalance del equilibrio redox celular (Grosicka-maci g, 2011; Itziou et al., 2011; Olgun and Misra, 2006; Soltaninejad and Abdollahi, 2009). En particular, diversos estudios informan un incremento en los niveles de ERO inducido por la exposición a plaguicidas organofosforados, entre los que se encuentra el CPF (Chiapella et al., 2013; Giordano et al., 2007). Gupta y colaboradores, informaron que el CPF induce estrés oxidativo y modifica la estructura del ADN en larvas de *Drosophila* (Gupta et al., 2010). En el mismo sentido, en este trabajo describimos un incremento en los niveles de ERO inducido por el plaguicida CPF 50 μM , en células tumorales mamarias humanas.

En las células MCF-7, la presencia de CAT en el medio de cultivo abolió el incremento de ERO inducido por el plaguicida, sugiriendo que la acumulación de H_2O_2 es la causa principal de este incremento. Previamente en este trabajo, observamos que el CPF 50 μM incrementa el porcentaje de células en la fase S del ciclo en las células MCF-7. Debido a que la presencia de especies oxidantes se encuentra estrechamente vinculada con un incremento en el daño del material genético en diferentes modelos

experimentales (Dizdaroglu, 1991; Itziou et al., 2011), nuestros resultados sugieren que el incremento en los niveles de ERO podría derivar en el daño del material genético y el consecuente retraso en la finalización de fase S del ciclo.

Por otra parte, en la línea celular MDA-MB-231, el incremento en los niveles de ERO inducido por el plaguicida fue disminuido parcialmente tras la incorporación de CAT al medio de cultivo, lo cual indica que podrían existir otras especies oxidantes que contribuyan al desbalance redox. Con el fin de analizar esta posibilidad, investigamos la presencia del anión $O_2^{\cdot-}$ en las células MDA-MB-231. Como describimos anteriormente, la presencia de esta especie química no pudo ser detectada en nuestro sistema de estudio. Este hecho podría deberse al uso de una concentración no óptima del atrapador, ya que la concentración recomendada de DMPO resultó citotóxica para la línea celular utilizada en este trabajo. Sin embargo, la detección de ésta y otras ERO ha sido posible en otras líneas celulares cultivadas en presencia de CPF (Ojha and Srivastava, 2014).

Además de las ERO, la exposición a tóxicos ambientales puede derivar en un incremento de las ERN, generando estrés nitrosativo. Recientes investigaciones han demostrado el incremento en los niveles de ERN inducido por el CPF en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* (Wang et al., 2013; Yildirim et al., 2013). A diferencia de estas investigaciones, si bien en nuestros experimentos evidenciamos incremento en los niveles de ERN en las células MDA-MB-231, este hecho no fue acompañado por un aumento significativo en el daño nitrosativo de proteínas. Estos resultados indican que el incremento en las ERN observado no constituye un factor importante en el efecto antiproliferativo inducido por el plaguicida en nuestro sistema de estudio.

Las células cuentan con un estricto sistema de defensa que les permite mantener la homeostasis en situaciones de estrés oxidativo. Como describimos anteriormente, este sistema incluye componentes enzimáticos y no enzimáticos. Entre los componentes enzimáticos, se encuentran las enzimas CAT, SOD, GPX y GR. En este trabajo, evaluamos los efectos del CPF sobre el contenido y la actividad de las enzimas CAT y SOD en células derivadas de adenocarcinomas mamarios humanos luego de 24 horas de tratamiento con el plaguicida.

De acuerdo a nuestros resultados, el plaguicida CPF no altera la expresión de las enzimas CAT y SOD en ninguna de las concentraciones evaluadas. En el mismo sentido, Chiapella y sus colaboradores, recientemente demostraron que este plaguicida, en concentraciones de 50 y 100 μM , no altera los niveles de RNA mensajero de la proteína SOD en células derivadas de un coriocarcinoma (Chiapella et al., 2013). Sin embargo, otros investigadores informaron que concentraciones similares de CPF, disminuyen la expresión de esta enzima en células neuronales (Lee et al., 2012). La aparente contradicción de estos resultados, indica que los efectos del plaguicida dependen fundamentalmente de la sensibilidad y de la capacidad de respuesta presente en cada tipo celular frente al desbalance redox producido por el tóxico.

Además de la expresión proteica, en este trabajo evaluamos las actividades de las enzimas antioxidantes CAT y SOD en las líneas celulares expuestas a CPF. Como describimos anteriormente, la exposición de las células a CPF 50 μM condujo a un incremento en la actividad de la enzima CAT. La enzima CAT es responsable de la descomposición del H_2O_2 , dando lugar a la aparición de H_2O y O_2 . El incremento en la actividad CAT inducido por el CPF ha sido descrito por numerosos investigadores (Chiapella et al., 2013; Gupta et al., 2010; Kumar et al., 2014; Mandal and Das, 2012; Narra, 2014; J. Wang et al., 2014b). Narra y sus colaboradores, evaluaron la actividad de esta y otras enzimas antioxidantes en cangrejos expuestos a concentraciones subletales de CPF, y encontraron un incremento en la actividad CAT en el grupo cultivado en presencia del tóxico (Narra, 2014). En el mismo sentido, Chiapella y sus colaboradores observaron un incremento de la actividad CAT en células tumorales expuestas al plaguicida (Chiapella et al., 2013).

El incremento en la actividad CAT fue observado cuando las células fueron cultivadas con altas concentraciones de plaguicida. En estas mismas condiciones, observamos un incremento en los niveles de ERO inducido por el tóxico. De acuerdo a estos resultados, el incremento en la actividad CAT, podría constituir una respuesta celular frente al incremento de ERO inducido por el CPF.

Si bien un gran número de investigaciones indican que el CPF incrementa la actividad CAT en los sistemas estudiados, otros trabajos describen una reducción en la actividad de esta enzima frente a la presencia del tóxico (Barski et al., 2011; Hassani et

al., 2014; Umosen et al., 2012). En este sentido, Barski y sus colaboradores describieron una disminución en la actividad CAT presente en eritrocitos de ratas expuestas a CPF. Cabe destacar, que estos investigadores observaron un incremento en la actividad de la enzima GPX en este sistema, la cual, al igual que CAT, cataliza la descomposición del H_2O_2 (Barski et al., 2011).

Por otra parte, en nuestros experimentos observamos una disminución en la actividad SOD en las células MCF-7 expuestas a CPF 50 μ M. Esta enzima cataliza la dismutación del anión $O_2^{\cdot-}$ dando lugar a la generación de H_2O_2 y O_2 . Muchas investigaciones describen la inhibición de SOD en presencia de H_2O_2 , indicando que esta enzima es regulada negativamente por el producto de la reacción que cataliza (Gottfredsen et al., 2013; Tarhan and Tüzmen, 2000).

En nuestro trabajo, describimos una disminución en la actividad SOD inducida por el CPF 50 μ M en la línea celular MCF-7. Sin embargo, este efecto no fue observado en las células MDA-MB-231 expuestas al plaguicida. En vista de estos resultados, y teniendo en cuenta que los niveles basales de actividad SOD fueron superiores en la línea celular MDA-MB-231, consideramos que el incremento en los niveles de ERO inducido por el plaguicida es responsable de la inhibición de esta enzima en las células MCF-7. En cambio, en las células MDA-MB-231, el incremento de especies oxidantes no sería suficiente para causar una inhibición significativa en la actividad SOD.

Resultados similares fueron descritos por otros investigadores (Barski et al., 2011; Hassani et al., 2014; Narra, 2014; Umosen et al., 2012), quienes describieron una inhibición de la actividad SOD en presencia del plaguicida CPF. Sin embargo, otros estudios demuestran que este plaguicida es capaz de inducir la actividad SOD (Gupta et al., 2010; J. Wang et al., 2014b). Estos resultados evidencian la alta complejidad en la regulación del sistema redox, la cual es altamente dependiente del sistema u organismo evaluado, y de las concentraciones de plaguicida utilizadas en los ensayos. No obstante, en conjunto, estos datos sugieren que el CPF altera el sistema antioxidante a causa de un incremento en los niveles de ERO. En este sentido, se ha reportado que la actividad de las enzimas antioxidantes puede ser inducida o inhibida por los xenobioticos en función de la intensidad de la exposición y los niveles basales de enzimas antioxidantes presentes en el sistema evaluado (Oruç and Usta, 2007).

El sistema antioxidante celular se encuentra integrado por componentes enzimáticos, entre los que se encuentran las enzimas CAT y SOD descritas previamente, y por componentes no enzimáticos, como el GSH. En nuestros experimentos, no observamos modificaciones significativas en los niveles de GSH cuando las células fueron cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de CPF.

Los datos bibliográficos en torno al efecto del CPF sobre los niveles de GSH resultan muy variados, dependiendo del sistema experimental y las concentraciones de CPF utilizadas. Giordano y sus colaboradores no observaron diferencias significativas en los niveles de GSH en células neuronales provenientes de ratón, sin embargo, la presencia de CPF incrementó significativamente los niveles de GSSG en ese modelo (Giordano et al., 2007). Por otra parte, Gupta y sus colaboradores describieron una disminución en los niveles de GSH en *Drosophila melanogaster* (Gupta et al., 2010). Resultados similares a estos fueron obtenidos en experimentos realizados en trofoblastos humanos (Chiapella et al., 2013).

Como describimos en la introducción de este trabajo, el incremento en los niveles de especies oxidantes puede derivar en el daño de diferentes componentes celulares. El daño celular, evaluado mediante la determinación de la peroxidación lipídica, sólo fue evidenciado en la línea celular MCF-7 mientras que, en las células MDA-MB-231, no se encontraron diferencias en este parámetro con respecto al tratamiento control.

Además de diferenciarse por su capacidad de respuesta a hormonas esteroideas, las líneas celulares utilizadas en este trabajo, difieren en los niveles basales de enzimas antioxidantes CAT y SOD. Muchos investigadores han indicado que las células tumorales exhiben elevados niveles de ERO, lo cual es compensado con un aumento de la capacidad antioxidante celular (Gorrini et al., 2013). Este hecho justifica los mayores niveles de CAT y SOD encontrados en la línea MDA-MB-231, más indiferenciada y metastásica, en relación a las células MCF-7, las cuales presentan un mayor grado de diferenciación. Por este motivo, no resulta extraño que el incremento en las ERO inducido por el plaguicida genere diferentes niveles de daño en ambos tipos de células. En este sentido, el daño solo fue evidente en la línea celular MCF-7, la cual presenta menores niveles de defensas antioxidantes en relación a las células MDA-MB-231.

El daño oxidativo de los lípidos se ha correlacionado con modificaciones en otras macromoléculas y con alteraciones en la membrana plasmática, lo cual puede derivar en la muerte celular (Ziech et al., 2010). Un gran número de investigaciones informan acerca del incremento en el daño celular, en especial en la peroxidación lipídica, inducido por el CPF en diferentes modelos experimentales (Giordano et al., 2007; Gupta et al., 2010; Hassani et al., 2014; Mandal and Das, 2012; Narra, 2014; Umosen et al., 2012).

En el primer capítulo de este trabajo, describimos los efectos del CPF 50 μM sobre la proliferación celular, evidenciando alteraciones en el ciclo celular dentro de las primeras 24 horas de exposición al tóxico, seguido de un incremento en el porcentaje de células necróticas. En conjunto, estos efectos derivan en una disminución de la capacidad clonogénica celular luego de 10 días de cultivo en presencia del plaguicida.

Los resultados que describimos en este capítulo, nos brindan una mayor información acerca de los mecanismos mediante los cuales el CPF ejerce su acción antiproliferativa en estas líneas celulares. En este sentido, el desbalance en el equilibrio redox y el daño a diferentes macromoléculas podrían contribuir a las alteraciones en el ciclo y la muerte celular descriptas anteriormente.

Con el fin de investigar el papel de las ERO en la disminución de la capacidad clonogénica producida por el CPF 50 μM , evaluamos este parámetro en presencia de 30 U/ml de enzima CAT. La adición de esta enzima a los cultivos celulares revirtió el efecto antiproliferativo inducido por el plaguicida en ambas líneas celulares. Un gran número de investigaciones han demostrado el efecto de diferentes compuestos antioxidantes sobre los efectos producidos por el CPF. En este sentido, Hassani y sus colaboradores informaron que el tratamiento combinado de CPF y diferentes antioxidantes naturales como la vitamina E y la curcumina, revierten los efectos producidos por el CPF en el pulmón de ratas. Entre estos efectos, se encuentra el incremento de la peroxidación lipídica (Hassani et al., 2014). Como discutimos anteriormente, otros investigadores han informado resultados similares en testículo y en la glándula pituitaria de ratas macho a las cuales se les administró CPF y melatonina en forma combinada durante 28 días (Umosen et al., 2012). En el mismo sentido, Lee y sus colaboradores describieron un incremento en la muerte celular programada inducida

por CPF en células neuronales, el cual fue revertido por el agregado del antioxidante N-acetil-cisteína (NAC) en el medio de cultivo (Lee et al., 2012). En conjunto, estos y otros resultados indican que el desbalance redox inducido por el CPF es de fundamental importancia en los efectos antiproliferativos inducidos por el tóxico en diferentes modelos experimentales.

El incremento en las especies oxidantes ha sido ampliamente relacionado con la activación de diferentes vías de transducción de señales (Afanas'ev, 2011; Kamata et al., 2005; Liu et al., 2008; Mehdi et al., 2007; Wu, 2006). Debido a que estas vías regulan diferentes respuestas celulares como la migración, la proliferación y la muerte, se ha sugerido que la incorrecta activación de estas vías inducida por un incremento en las ERO, podría derivar en diferentes patologías, incluyendo la carcinogénesis (Klaunig et al., 2010).

Entre las vías activadas por las ERO, se encuentra la fosforilación de la proteína p38, miembro de la vías de las MAPKs. En nuestros experimentos, observamos un incremento en la fosforilación de p38 en las células MDA-MB-231 luego de 15 minutos de exposición al tóxico, sin embargo este efecto no fue observado en la línea celular MCF-7. Si bien la activación de la proteína p38 ha sido ampliamente relacionada con la inhibición de la proliferación celular, el papel de esta fosforilación en la disminución de la capacidad clonogénica inducida por el CPF no pudo ser confirmado en nuestros ensayos. De esta forma, la inhibición de la fosforilación de p38 en las células MDA-MB-231, no fue suficiente para impedir el efecto antiproliferativo inducido por el CPF. En el mismo sentido, Caughlan y sus colaboradores evidenciaron un incremento en la activación de p38 en células ováricas cultivadas en presencia de CPF, sin embargo, este hecho no se encontró relacionado con la muerte celular inducida por el tóxico (Caughlan et al., 2004).

Otro miembro de la familia MAPK regulado por las ERO, es la quinasa ERK1/2. Si bien la activación de esta proteína ha sido tradicionalmente relacionada con los estímulos proliferativos, en los últimos años ha cobrado importancia el estudio de esta quinasa en relación a la muerte celular, debido a su activación inducida por ERO (Dong et al., 2004).

En nuestros experimentos, encontramos un rápido incremento en la fosforilación de la proteína ERK1/2 cuando las células fueron expuestas a CPF 50 μ M. Este incremento fue evidenciado incluso luego de una hora de exposición al plaguicida. En el mismo sentido, Bomser y sus colaboradores describieron un incremento en la fosforilación de ERK1/2 en células ováricas cultivadas en presencia de CPF (Bomser et al., 2002). Otros investigadores relacionaron la disminución de la proliferación celular inducida por el CPF con el incremento en la fosforilación de ERK1/2 en células neuronales de rata cultivadas en presencia de CPF (Caughlan et al., 2004). Adicionalmente, Lee y sus colaboradores demostraron que el CPF inhibe la proliferación celular mediante el incremento de la fosforilación de ERK1/2, la cual a su vez se relaciona con un incremento en los niveles de ERO (Lee et al., 2012).

La participación de p-ERK1/2 en la disminución de la capacidad clonogénica inducida por el CPF, fue confirmada mediante la evaluación de este parámetro en presencia de un inhibidor específico de la fosforilación de ERK1/2. A diferencia de lo ocurrido con el inhibidor de p38, el cultivo de las células en presencia de PD98059 impidió el efecto antiproliferativo ocasionado por el CPF 50 μ M. Este resultado indica que la fosforilación de la quinasa ERK1/2 constituye un paso clave en el efecto deletéreo producido por el plaguicida.

Debido a que la activación de ERK1/2 inducida por CPF 50 μ M no se produce en presencia de CAT, concluimos que el incremento en los niveles de ERO es un paso clave que antecede a la fosforilación de esta quinasa, la cual conduce a la muerte celular. Adicionalmente, el hecho de que los niveles de ERO se encuentren elevados luego de 10 minutos de exposición de las células al tóxico, apoya la secuencia cronológica propuesta anteriormente.

Resultados similares han sido publicados recientemente en células neuronales expuestas a CPF. En este sentido, Lee y sus colaboradores demostraron que el CPF induce la fosforilación de las proteínas p38, JNK y ERK1/2, y que este efecto es impedido por la presencia del antioxidante NAC, indicando que el incremento de especies oxidantes es un evento que precede temporalmente a la fosforilación de estas quinasas. Sin embargo, estos investigadores también observaron que la inhibición de las MAPKs, impide el incremento de ERO inducido por el CPF, indicando la existencia de un circuito de retroalimentación entre ambos procesos (Lee et al., 2012).

En el primer capítulo de este trabajo, describimos el efecto del CPF sobre la fosforilación de Gsk-3 en su serina 9, lo cual conduce a la inactivación de la quinasa. Como indicamos, este efecto fue observado cuando las células fueron expuestas a CPF 50 μ M. Muchos investigadores han descrito la inactivación de la proteína Gsk-3 en condiciones de hipoxia o estrés oxidativo (Son et al., 2013, 2012; Wang et al., 2009).

Adicionalmente, a raíz de nuevas investigaciones que se están realizando en nuestro laboratorio, hemos evidenciado que el CPF induce un incremento en la capacidad invasiva de las células MCF-7. Debido a que este efecto fue observado al utilizar la concentración de CPF 50 μ M, el mismo debe ser analizado en forma conjunta con la disminución de la capacidad clonogénica y el incremento en los niveles de ERO descritos en esta tesis. El vínculo entre estos efectos puede entenderse considerando a la condición de estrés oxidativo como una presión de selección en nuestro sistema de estudio. Una amplia cantidad de investigaciones demuestran que la presencia de ERO constituye un factor clave en la transición epitelio-mesenquimática (Cannito et al., 2008; Jiang et al., 2011; Zhang et al., 2013). De esta manera, las células que prosperan en un medio con altos niveles de ERO, presentan un fenotipo más agresivo evidenciado por una mayor capacidad invasiva.

En resumen, en este capítulo hemos descrito el mecanismo por el cual el CPF 50 μ M disminuye la capacidad clonogénica de las células MCF-7 y MDA-MB-231. En primer lugar, el plaguicida produce un rápido incremento en los niveles de especies oxidantes intracelulares, lo cual fue evidenciado en ambas líneas celulares luego de 10 minutos de exposición. Este incremento en las ERO induce la fosforilación de la quinasa ERK1/2. Ambos procesos son necesarios para que el CPF produzca la disminución de la capacidad clonogénica en las líneas celulares estudiadas. Entre estos eventos y la disminución en la proliferación celular observada luego de 10 días de exposición al plaguicida, las células sufren una desregulación en su ciclo celular. Adicionalmente, durante este proceso se evidencian elevados niveles de ERO, independientemente de la actividad de la quinasa ERK1/2. La sumatoria de estos procesos deriva en la disminución de la capacidad clonogénica en ambas líneas celulares cultivadas en presencia de CPF 50 μ M.

Por otra parte, en este trabajo evaluamos los efectos del CPF sobre el sistema redox en la glándula mamaria de la rata mediante el estudio de la actividad de la enzima catalasa, el contenido de grupos tioles y el daño lipídico presente en ese tejido. A partir de los resultados obtenidos se puede observar que la exposición de las ratas a CPF 1 mg/Kg/día condujo a un leve incremento en las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas en la glándula mamaria respecto a los encontrados en los animales control. Por otra parte, en las ratas expuestas a CPF 0,01 mg/Kg/día, se observó un incremento en la actividad de la enzima catalasa, sin modificaciones en los niveles de GSH. Estas alteraciones en los componentes antioxidantes podrían interpretarse como un intento de las células para contrabalancear el incremento de ERO posiblemente generadas por el CPF. Finalmente, la medición del daño celular, a través de la peroxidación lipídica, no mostró cambios entre los animales expuestos a CPF y los animales controles.

En conjunto, estos resultados indican que, si bien el CPF podría inducir un desbalance en el sistema redox de la glándula mamaria, este efecto no conduciría a un incremento en el daño oxidativo de los lípidos presentes en este tejido. Sin embargo, un gran número de investigaciones han demostrado el daño oxidativo causado por el CPF en diferentes tejidos (Das et al., 2014; Muftau et al., 2014; Umosen & Chidiebere, 2014). Debemos destacar, que las dosis utilizadas en esos estudios se encuentran entre 5,4 y 10,6 mg/Kg/día, superando las dosis seleccionadas para esta tesis.

Conclusiones y perspectivas

El cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer entre las mujeres, tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo, y su incidencia continúa en aumento. La exposición a contaminantes ambientales, como los plaguicidas, constituye un factor de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad.

En este trabajo, estudiamos los efectos del plaguicida organofosforado CPF sobre la proliferación en líneas celulares derivadas de adenocarcinomas mamarios humanos, así como su efecto sobre el desarrollo de la glándula mamaria de rata y la carcinogénesis.

Nuestros resultados indicaron que el CPF 0,05 μM induce la proliferación de las células MCF-7 y que esta acción es mediada por el RE. A su vez, el tóxico induce la activación de la vía Gsk-3 / -catenina, la cual se encuentra estrechamente relacionada con la inducción de la transcripción de genes involucrados en la proliferación y la invasión celular.

En el mismo sentido, la intoxicación crónica de ratas hembras con CPF indujo cambios proliferativos en la glándula mamaria de los animales. Por otra parte, los estudios realizados utilizando un modelo de carcinogénesis química, evidenciaron los efectos del plaguicida sobre la tumorigénesis mamaria, los cuales podrían relacionarse con el incremento en el porcentaje de lesiones proliferativas inducidas por el tóxico en esta glándula. Asimismo, el CPF alteró los niveles circulantes de hormonas esteroideas e hipofisarias y la esteroidogénesis ovárica en los animales.

En conjunto, esos resultados dan cuenta de los efectos del CPF como DE en diferentes modelos experimentales, tanto *in vitro* como *in vivo*. La investigación de los efectos de este plaguicida sobre otros órganos cuyo desarrollo se encuentra regulado por las hormonas esteroideas, como el útero o el ovario, contribuirá al esclarecimiento de los efectos de este plaguicida como DE. Asimismo, consideramos necesario profundizar los estudios sobre los efectos del CPF en el desarrollo de la glándula mamaria, analizando sus efectos en diferentes etapas del proceso, desde el nacimiento hasta la preñez.

Si bien bajas concentraciones de CPF (0,05 μM) indujeron la proliferación de las células MCF-7, una mayor concentración de este tóxico (50 μM) derivó en la disminución de la capacidad clonogénica, mediada por un incremento en los niveles de ERO y la fosforilación de la proteína ERK1/2. Estos cambios fueron acompañados por alteraciones en el ciclo celular y el incremento de la muerte por necrosis.

Debido a que el incremento de ERO se encuentra íntimamente vinculado con diferentes procesos que subyacen al desarrollo neoplásico, creemos relevante el estudio de los efectos producidos por antioxidantes naturales sobre las acciones inducidas por el plaguicida en nuestro modelo experimental.

En resumen, nuestros resultados aportan nueva información acerca de los mecanismos de acción del plaguicida CPF en las células mamarias. Además de interferir con el metabolismo redox, el CPF regula la activación de diferentes vías de señalización, desregula el sistema endócrino, modifica la histología del tejido mamario y afecta la carcinogénesis en este tejido. Estos resultados, advierten sobre los efectos adversos de este plaguicida para la salud humana y su papel como factor de riesgo en la carcinogénesis mamaria. Una menor exposición a estos factores requiere la modificación de diferentes hábitos de vida y pautas culturales que involucran un largo proceso y la intervención de diferentes actores de la sociedad.

En este sentido, el control de la aplicación de plaguicidas, incluyendo las concentraciones utilizadas, los momentos y lugares de aplicación y la protección adecuada de los trabajadores, constituye un factor clave en la reducción de la exposición a estos compuestos. Consideramos que el control del cumplimiento de las normativas vigentes debe constituir una práctica rutinaria, realizada de manera estricta y periódica por profesionales idóneos.

Por otra parte, la revisión de los valores de referencia que determinan las dosis ambientalmente seguras debe ser revisada teniendo en cuenta las investigaciones y estudios epidemiológicos realizados por profesionales y expertos. En relación a esto, en los últimos años se ha discutido ampliamente la pertinencia del estudio de los efectos producidos por plaguicidas y otros contaminantes en dosis inferiores a los límites establecidos por la IDA y el NOAEL. En vista de nuestros resultados, y teniendo en

cuenta la extensa bibliografía existente, queda demostrada la importancia de estos estudios, teniendo en cuenta, en particular, que los efectos sobre el sistema endócrino se observan a dosis considerablemente menores a las establecidas como límites seguros. Esta visión constituye un cambio paradigmático en el campo de la toxicología, cuya aceptación dependerá del esfuerzo integrado de los profesionales de diferentes áreas.

Otro aspecto que debemos señalar, refiere a que, en la mayoría de los estudios toxicológicos, se detallan los efectos de un plaguicida en particular. Si bien nuestros resultados aportan una valiosa información sobre las acciones del CPF sobre la salud de los individuos expuestos, existe una distancia considerable entre los modelos experimentales y la realidad en la que viven los habitantes de poblaciones cercanas a sitios de fumigación. En este sentido, la aplicación de diferentes insecticidas, herbicidas y otras sustancias conlleva a la existencia de múltiples compuestos en el ambiente, los cuales podrían actuar de forma sinérgica afectando a la salud de los habitantes.

Finalmente, no podemos dejar de destacar el papel fundamental de la capacitación e instrucción del personal que manipula estos compuestos, y de los pobladores de regiones cercanas, con el fin de alertarlos sobre los efectos deletéreos de los plaguicidas sobre su salud y la de las generaciones futuras. En este sentido, nuestra función como miembros de la comunidad universitaria radica en la difusión de los resultados obtenidos, no sólo en prestigiosas revistas internacionales, sino también en medios de comunicación local, congresos científicos nacionales, y charlas informativas a las cuales puedan acceder los individuos afectados.

Resumen

El cáncer de mama es la patología maligna más común entre las mujeres de todo el mundo y los factores ambientales mantienen una estrecha relación con la etiología de esta enfermedad. A pesar de que las evidencias son cada vez más contundentes, la relación entre la incidencia de cáncer de mama y la exposición a los plaguicidas aplicados en las zonas agrícolas aún permanece sin resolver.

El estudio de estos compuestos ha despertado el interés de la comunidad científica, debido a que muchos plaguicidas son capaces actuar como DEs a través de numerosos mecanismos que convergen en la desregulación del sistema hormonal.

El CPF es un plaguicida organofosforado ampliamente utilizado en nuestro país y el mundo para el control de plagas en diferentes cultivos. Su principal mecanismo de acción, lo constituye la inhibición de la enzima AChE presente en el sistema nervioso central y periférico. Sin embargo, se ha demostrado que este plaguicida adicionalmente interfiere en la síntesis de macromoléculas, interacciona con receptores celulares, modula diferentes vías de transducción de señales y modifica el balance redox celular.

En este trabajo, evaluamos los diferentes mecanismos de acción del CPF que puedan interferir en el desarrollo de la glándula mamaria y/o en la transformación maligna de este tejido, con especial interés en el estudio de sus efectos como DE y en la alteración del balance redox.

En primer lugar, evaluamos los efectos del CPF sobre la proliferación y el ciclo celular en líneas celulares derivadas de adenocarcinomas mamarios humanos con diferente grado de diferenciación. Utilizamos la línea celular MCF-7, la cual expresa el RE y responde a los estímulos estrogénicos y la línea celular MDA-MB-231, la cual carece de dicho receptor. Las concentraciones de CPF utilizadas, comprendidas entre 0 y 50 μM , fueron seleccionadas de acuerdo a los niveles comúnmente hallados en el agua y el suelo de áreas cercanas a sitios de aplicación.

Nuestros resultados indicaron que el CPF (0,05 μM) induce la proliferación de las células MCF-7 a través del RE. Adicionalmente, esta concentración del tóxico indujo la inactivación de Gsk-3, la translocación nuclear de β -catenina y el incremento

en la expresión de ciclina D₁. Estos efectos, solo fueron observados en la línea celular MCF-7.

Por otra parte, la exposición de las células a una mayor concentración del plaguicida (50 µM) derivó en una disminución de la capacidad clonogénica en ambas líneas celulares. Este efecto, fue acompañado por la acumulación de células en diferentes fases del ciclo y por la alteración de la expresión de las proteínas que lo regulan, lo cual condujo a un incremento de la necrosis celular.

Con el fin de profundizar nuestros estudios sobre la acción del CPF como un posible DE, evaluamos el efecto de este plaguicida sobre el desarrollo de la glándula mamaria de rata. Para ello, utilizamos ratas hembras de la cepa Sprague Dawley, las cuales fueron intoxicadas con diferentes dosis de CPF. La intoxicación comenzó a los 40 días de vida de los animales, durante la etapa de desarrollo puberal de la glándula mamaria y se prolongó durante 100 días, momento en el que los animales alcanzan su madurez.

Las dosis utilizadas fueron seleccionadas de acuerdo a los límites internacionales, los cuales establecen una ingesta diaria admisible de 0,01 mg/Kg/día y un NOAEL (máximo nivel al cual no se observan efectos adversos) de 1,00 mg/Kg/día.

En este modelo, observamos un incremento en el número de ductos y brotes alveolares en la glándula mamaria de los animales intoxicados con el plaguicida, lo cual fue acompañado por un incremento en el porcentaje de lesiones proliferativas benignas como la adenosis y la hiperplasia ductal en este tejido. Adicionalmente, el CPF incrementó la expresión del RPg y disminuyó la fosforilación del RE .

En este trabajo, demostramos que el CPF afecta el sistema endócrino modificando los niveles circulantes de la gonadotropina LH y alterando la esteroidogénesis ovárica, lo cual condujo a una disminución en los niveles séricos de hormonas esteroideas.

Adicionalmente, evaluamos el efecto del CPF sobre la carcinogénesis mamaria, utilizando un modelo tumorigénesis inducida químicamente. Entre los resultados más

relevantes obtenidos en este modelo experimental, se encuentran la disminución del período de latencia tumoral y el incremento del número de tumores por rata. Además, el CPF disminuyó la expresión de los receptores RE y RPg en los tumores.

Por último, los eventos sobre el sistema redox desencadenados por la exposición de las células a CPF 50 μ M fueron observados en ambas líneas celulares empleadas, en las cuales los niveles de ERO se encontraron incrementados. Adicionalmente, observamos modificaciones en los componentes del sistema antioxidante celular, fundamentalmente en la actividad de las enzimas CAT y SOD. En las células MCF-7, las cuales presentan menores niveles de enzimas antioxidantes, estos eventos derivaron en un incremento del daño celular.

Finalmente, el efecto del CPF sobre el sistema redox se encontró vinculado a la fosforilación de la quinasa ERK1/2. En este trabajo, demostramos que tanto la desregulación del balance redox como la fosforilación de ERK1/2, se encuentran involucrados en la disminución de la capacidad clonogénica inducida por el CPF.

En conjunto, estos resultados aportan nueva información acerca de los mecanismos de acción del plaguicida CPF en las células mamarias. Además de interferir con el metabolismo redox, el CPF regula la activación de diferentes vías de señalización, desregula el sistema endócrino, modifica la histología del tejido mamario y afecta la carcinogénesis en este tejido. Estos resultados, advierten sobre los efectos adversos de este plaguicida sobre la salud humana y su papel como factor de riesgo para la carcinogénesis mamaria.

Bibliografía

- Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., Rezaie, A., 2004. Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit* 10, 141–148.
- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., Kemler, R., 1997. β -Catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 16, 3797–3804. doi:10.1093/emboj/16.13.3797
- Acevedo, N., Davis, B., Schaeberle, C.M., Sonnenschein, C., Soto, A.M., 2013. Perinatally Administered Bisphenol A as a Potential Mammary Gland Carcinogen in Rats. *Environ. Health Perspect.* 121, 1040–1046.
- Actis, M., Cocca, C.M., Gutierrez, A., Croci, M., Rivera, E.S., Bergoc, R.M., 2004. Estrogen receptor profiles: changes in mouse and rat mammary tumors by treatment with selective estrogen receptor modifiers. *Med. Princ. Pract.* 13, 220–226. doi:10.1159/000078320
- Afanas'ev, I., 2011. Reactive oxygen species signaling in cancer: comparison with aging. *Aging Dis.* 2, 219–230.
- Alavanja, M.C.R., Dosemeci, M., Samanic, C., Lubin, J., Lynch, C.F., Knott, C., Barker, J., Hoppin, J., Sandler, D.P., Coble, J., Thomas, K., Blair, A., 2004. Pesticides and lung cancer risk in the agricultural health study cohort. *Am. J. Epidemiol.* 160, 876–885. doi:10.1093/aje/kwh290
- Albini, A., Sporn, M.B., 2007. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nat. Rev. Cancer* 7, 139–147. doi:10.1038/nrc2066
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., Clarke, M.F., 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 3983–3988. doi:10.1073/pnas.0530291100
- American Type Culture Collection, 2014a. MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) [WWW Document]. URL <http://www.atcc.org/products/all/HTB-26.aspx#characteristics> (accessed 10.26.14).
- American Type Culture Collection, 2014b. MCF7 (ATCC® HTB-22™) [WWW Document]. URL <http://www.atcc.org/products/all/HTB-22.aspx> (accessed 10.26.14).
- Amitai, G., Moorad, D., Adani, R., Doctor, B.P., 1998. Inhibition of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase by Chlorpyrifos-oxon. *Biochem. Pharmacol.* 56, 293–299. doi:10.1016/S0006-2952(98)00035-5
- Amutha, C., Subramanian, P., 2013. Cadmium alters the reproductive endocrine disruption and enhancement of growth in the early and adult stages of *Oreochromis mossambicus*. *Fish Physiol. Biochem.* 39, 351–361. doi:10.1007/s10695-012-9704-3
- Anand, M., Singh, J., Taneja, A., Patel, D., Mahotra, P., 2013. Organochlorine Pesticides in the Females Suffering from Breast Cancer and its Relation to Estrogen Receptor Status. *J. Drug Metab. Toxicol.* 4, 156. doi:10.4172/2157-7609.1000156

- Andersen, H.R., Vinggaard, A.M., Rasmussen, T.H., Gjermandsen, I.M., Bonefeld-Jørgensen, E.C., 2002. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 179, 1–12. doi:10.1006/taap.2001.9347
- Anderson, E., Clarke, R.B., 2004. Steroid receptors and cell cycle in normal mammary epithelium. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 9, 3–13. doi:10.1023/B:JOMG.0000023584.01750.16
- Anderson, S.M., Rudolph, M.C., McManaman, J.L., Neville, M.C., 2007. Secretory activation in the mammary gland: it's not just about milk protein synthesis! *Breast cancer Res.* 9, 204. doi:10.1186/bcr1653
- Andrew Clayton, C., Pellizzari, E.D., Whitmore, R.W., Quackenboss, J.J., Adgate, J., Sefton, K., 2003. Distributions, associations, and partial aggregate exposure of pesticides and polynuclear aromatic hydrocarbons in the Minnesota Children's Pesticide Exposure Study (MNCPEs). *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* 13, 100–111. doi:10.1038/sj.jea.7500261
- ANMAT, 2008. Disposición 2659/2008. Buenos Aires.
- Ariazi, J.L., Haag, J.D., Lindstrom, M.J., Gould, M.N., 2005. Mammary glands of sexually immature rats are more susceptible than those of mature rats to the carcinogenic, lethal, and mutagenic effects of N-nitroso-N-methylurea. *Mol. Carcinog.* 43, 155–164. doi:10.1002/mc.20104
- Armanious, H., Deschenes, J., Gelebart, P., Ghosh, S., Mackey, J., Lai, R., 2010. Clinical and biological significance of GSK-3 inactivation in breast cancer-an immunohistochemical study. *Hum. Pathol.* 41, 1657–1663. doi:10.1016/j.humpath.2010.04.015
- Arnold, S.F., Obourn, J.D., Jaffe, H., Notides, A.C., 1995a. Phosphorylation of the human estrogen receptor on tyrosine 537 in vivo and by src family tyrosine kinases in vitro. *Mol. Endocrinol.* 9, 24–33. doi:10.1210/mend.9.1.7539106
- Arnold, S.F., Vorojeikina, D.P., Notides, A.C., 1995b. Phosphorylation of tyrosine 537 on the human estrogen receptor is required for binding to an estrogen response element. *J. Biol. Chem.* 270, 30205–30212.
- Asakawa, T., Matsushita, S., 1979. Thiobarbituric acid test for detecting lipid peroxides. *Lipids* 14, 401–406. doi:10.1007/BF02533425
- Ascenzi, P., Bocedi, A., Marino, M., 2006. Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol. Aspects Med.* 27, 299–402. doi:10.1016/j.mam.2006.07.001
- Ashrafi, M., Bathaie, S.Z., Abroun, S., 2012. High Expression of Cyclin D1 and p21 in N-Nitroso-N-Methylurea-Induced Breast Cancer in Wistar Albino Female Rats. *Cell J.* 14, 193–202.

- Atwood, C.S., Hovey, R.C., Glover, J.P., Chepko, G., Ginsburg, E., Robison, W.G., Vonderhaar, B.K., 2000. Progesterone induces side-branching of the ductal epithelium in the mammary glands of peripubertal mice. *J. Endocrinol.* 167, 39–52.
- Ayyanan, A., Laribi, O., Schuepbach-Mallepell, S., Schrick, C., Gutierrez, M., Tanos, T., Lefebvre, G., Rougemont, J., Yalcin-Ozuysal, O., Brisken, C., 2011. Perinatal exposure to bisphenol A increases adult mammary gland progesterone response and cell number. *Mol. Endocrinol.* 25, 1915–1923. doi:10.1210/me.2011-1129
- Banerjee, K., Ganguly, A., Chakraborty, P., Sarkar, A., Singh, S., Chatterjee, M., Bhattacharya, S., Choudhuri, S.K., 2014. ROS and RNS induced apoptosis through p53 and iNOS mediated pathway by a dibasic hydroxamic acid molecule in leukemia cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* 52, 146–164. doi:10.1016/j.ejps.2013.11.009
- Barr, D.B., Olsson, A.O., Wong, L.-Y., Udunka, S., Baker, S.E., Whitehead, R.D., Magsumbol, M.S., Williams, B.L., Needham, L.L., 2010. Urinary concentrations of metabolites of pyrethroid insecticides in the general U.S. population: National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002. *Environ. Health Perspect.* 118, 742–748. doi:10.1289/ehp.0901275
- Barrera, G., 2012. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncol.* 2012, 137289. doi:10.5402/2012/137289
- Barski, D., Spodniewska, a., Zasadowski, a., 2011. Activity of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in rats exposed to chlorpyrifos and erofloxacin. *Pol. J. Vet. Sci.* 14, 523–529. doi:10.2478/v10181-011-0078-8
- Behrens, J., Lustig, B., 2004. The Wnt connection to tumorigenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 48, 477–487. doi:10.1387/ijdb.041815jb
- Bell, H.S., Ryan, K.M., 2005. Intracellular signalling and cancer: complex pathways lead to multiple targets. *Eur. J. Cancer* 41, 206–215. doi:10.1016/j.ejca.2004.10.022
- Bernardos, J., Zaccagnini, M.E., 2011. El uso de insecticidas en cultivos agrícolas y su riesgo potencial para las aves en la reegión pampeana. *Hornero* 26, 55–64.
- Bertout, J. a, Patel, S. a, Simon, M.C., 2008. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8, 967–975. doi:10.1038/nrc2540
- Bhukhai, K., Suksen, K., Bhummaphan, N., Janjorn, K., Thongon, N., Tantikanlayaporn, D., Piyachaturawat, P., Suksamrarn, A., Chairoungdua, A., 2012. A phytoestrogen diarylheptanoid mediates estrogen receptor/Akt/glycogen synthase kinase 3 protein-dependent activation of the Wnt/ -catenin signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 287, 36168–36178. doi:10.1074/jbc.M112.344747
- Björnström, L., Sjöberg, M., 2005. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol. Endocrinol.* 19, 833–842. doi:10.1210/me.2004-0486

- Bomser, J. a, Quistad, G.B., Casida, J.E., 2002. Chlorpyrifos oxon potentiates diacylglycerol-induced extracellular signal-regulated kinase (ERK 44/42) activation, possibly by diacylglycerol lipase inhibition. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 178, 29–36. doi:10.1006/taap.2001.9324
- Bonefeld-Jørgensen, E.C., Long, M., Hofmeister, M. V, Vinggaard, A.M., 2007. Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: new data and a brief review. *Environ. Health Perspect.* 115 Suppl , 69–76. doi:10.1289/ehp.9368
- Boulogne, R., Jouglu, E., Breem, Y., Kunst, A.E., Rey, G., 2012. Mortality differences between the foreign-born and locally-born population in France (2004-2007). *Soc. Sci. Med.* 74, 1213–123. doi:10.1016/j.socscimed.2012.01.002
- Boveri, T., 2014. The nature of cancer, in: *The Biology of Cancer*. Garland Science, Teylos and Francis Group, New York, pp. 25–56.
- Boveris, A., 1998. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina (B. Aires)*. 58, 350–356.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann. Biochem.* 72, 248–254.
- Braun, L., Mietzsch, F., Seibold, P., Schneeweiss, A., Schirmacher, P., Chang-Claude, J., Peter Sinn, H., Aulmann, S., 2013. Intrinsic breast cancer subtypes defined by estrogen receptor signalling-prognostic relevance of progesterone receptor loss. *Mod. Pathol.* 26, 1161–1171. doi:10.1038/modpathol.2013.60
- Brisken, C., 2002. Hormonal control of alveolar development and its implications for breast carcinogenesis. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 7, 39–48.
- Brisken, C., Kaur, S., Chavarria, T.E., Binart, N., Sutherland, R.L., Weinberg, R. a, Kelly, P. a, Ormandy, C.J., 1999. Prolactin controls mammary gland development via direct and indirect mechanisms. *Dev. Biol.* 210, 96–106. doi:10.1006/dbio.1999.9271
- Brisken, C., O'Malley, B., 2010. Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, 1–15. doi:10.1101/cshperspect.a013086
- Cabello, G., Valenzuela, M., Vilaxa, a, Durán, V., Rudolph, I., Hrepic, N., Calaf, G., 2001. A rat mammary tumor model induced by the organophosphorous pesticides parathion and malathion, possibly through acetylcholinesterase inhibition. *Environ. Health Perspect.* 109, 471–479.
- Cadenas, E., 1997. Basic mechanisms of antioxidant activity. *BioFactors* 6, 391–397.
- Cailleau, R., Olive, M., Cruciger, Q.V.J., 1978. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro* 14, 911–915.

- Calaf, G.M., Echiburú-Chau, C., 2012. Synergistic effect of malathion and estrogen on mammary gland carcinogenesis. *Oncol. Rep.* 28, 640–646. doi:10.3892/or.2012.1817
- Calaf, G.M., Parra, E., Garrido, F., 2007. Cell proliferation and tumor formation induced by eserine, an acetylcholinesterase inhibitor, in rat mammary gland. *Oncol. Rep.* 17, 25–33.
- Calafat, A.M., Ye, X., Wong, L.-Y., Bishop, A.M., Needham, L.L., 2010. Urinary concentrations of four parabens in the U.S. population: NHANES 2005-2006. *Environ. Health Perspect.* 118, 679–685. doi:10.1289/ehp.0901560
- Calafat, A.M., Ye, X., Wong, L.-Y., Reidy, J.A., Needham, L.L., 2008. Urinary concentrations of triclosan in the U.S. population: 2003-2004. *Environ. Health Perspect.* 116, 303–307. doi:10.1289/ehp.10768
- Camarillo, I.G., Thordarson, G., Moffat, J.G., Van Horn, K.M., Binart, N., Kelly, P.A., Talamantes, F., 2001. Prolactin receptor expression in the epithelia and stroma of the rat mammary gland. *J. Endocrinol.* 171, 85–95.
- Campbell, L.L., Polyak, K., 2007. Breast Tumor Heterogeneity. *Cancer Stem Cells or Clonal Evolution? Cell Cycle* 6, 2332–2338.
- Cannito, S., Novo, E., Compagnone, A., Valfrè di Bonzo, L., Busletta, C., Zamara, E., Paternostro, C., Povero, D., Bandino, A., Bozzo, F., Cravanzola, C., Bravoco, V., Colombatto, S., Parola, M., 2008. Redox mechanisms switch on hypoxia-dependent epithelial-mesenchymal transition in cancer cells. *Carcinogenesis* 29, 2267–2278. doi:10.1093/carcin/bgn216
- Cardona-Gomez, P., Perez, M., Avila, J., Garcia-Segura, L.M., Wandosell, F., 2004. Estradiol inhibits GSK3 and regulates interaction of estrogen receptors, GSK3, and beta-catenin in the hippocampus. *Mol. Cell. Neurosci.* 25, 363–373. doi:10.1016/j.mcn.2003.10.008
- Carod Benedico, E., 2002. Insecticidas organofosforados. “De la guerra química al riesgo laboral y doméstico”. *Medifarm* 12, 333–340.
- Castoria, G., Giovannelli, P., Lombardi, M., De Rosa, C., Giraldi, T., de Falco, A., Barone, M. V., Abbondanza, C., Migliaccio, A., Auricchio, F., 2012. Tyrosine phosphorylation of estradiol receptor by Src regulates its hormone-dependent nuclear export and cell cycle progression in breast cancer cells. *Oncogene* 31, 4868–4877. doi:10.1038/onc.2011.642
- Castoria, G., Migliaccio, A., Green, S., Di Domenico, M., Chambon, P., Auricchio, F., 1993. Properties of a purified estradiol-dependent calf uterus tyrosine kinase. *Biochemistry* 32, 1740–1750.
- Caughlan, A., Newhouse, K., Namgung, U., Xia, Z., 2004. Chlorpyrifos induces apoptosis in rat cortical neurons that is regulated by a balance between p38 and ERK/JNK MAP kinases. *Toxicol. Sci.* 78, 125–134. doi:10.1093/toxsci/kfh038

- Chaffin, C.L., Vandevoort, C. a, 2013. Follicle growth, ovulation, and luteal formation in primates and rodents: a comparative perspective. *Exp. Biol. Med.* 238, 539–548. doi:10.1177/1535370213489437
- Chan, M.M., Lu, X., Merchant, F.M., Iglehart, J.D., Miron, P.L., 2005. Gene expression profiling of NMU-induced rat mammary tumors: cross species comparison with human breast cancer. *Carcinogenesis* 26, 1343–1353. doi:10.1093/carcin/bgi100
- Chang, H.-H., Chang, M.-C., Lin, L.-D., Lee, J.-J., Wang, T.-M., Huang, C.-H., Yang, T.-T., Lin, H.-J., Jeng, J.-H., 2010. The mechanisms of cytotoxicity of urethane dimethacrylate to Chinese hamster ovary cells. *Biomaterials* 31, 6917–6925. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.05.059
- Chang, H.-H., Guo, M.-K., Kasten, F.H., Chang, M.-C., Huang, G.-F., Wang, Y.-L., Wang, R.-S., Jeng, J.-H., 2005. Stimulation of glutathione depletion, ROS production and cell cycle arrest of dental pulp cells and gingival epithelial cells by HEMA. *Biomaterials* 26, 745–753. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.03.021
- Chen, W.-Q., Ma, H., Bian, J.-M., Zhang, Y.-Z., Li, J., 2012. Hyper-phosphorylation of GSK-3 : Possible roles in chlorpyrifos-induced behavioral alterations in animal model of depression. *Neurosci. Lett.* 528, 148–152. doi:10.1016/j.neulet.2012.08.084
- Cheng, G., Weihua, Z., Warner, M., Gustafsson, J.A., 2004. Estrogen receptors ERa and ERb in proliferation in the rodent mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3739–3746.
- Chiappella, G., Flores-Martín, J., Ridano, M.E., Reyna, L., Magnarelli de Potas, G., Panzetta-Dutari, G.M., Genti-Raimondi, S., 2013. The organophosphate chlorpyrifos disturbs redox balance and triggers antioxidant defense mechanisms in JEG-3 cells. *Placenta* 34, 792–798. doi:10.1016/j.placenta.2013.06.007
- Cho, R.W., Clarke, M.F., 2008. Recent advances in cancer stem cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18, 48–53. doi:10.1016/j.gde.2008.01.017
- Clanton, T.L., 2007. Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 102, 2379–2388. doi:10.1152/jappphysiol.01298.2006
- Clarke, R.B., 2003. Steroid receptors and proliferation in the human breast. *Steroids* 68, 789–794. doi:10.1016/S0039-128X(03)00122-3
- Clarke, R.B., 2006. Ovarian steroids and the human breast: regulation of stem cells and cell proliferation. *Maturitas* 54, 327–334. doi:10.1016/j.maturitas.2006.06.002
- Cocca, C., Dorado, J., Calvo, E., López, J.A., Santos, A., Perez-Castillo, A., 2009. 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 is a tubulin-binding agent that destabilizes microtubules and induces mitotic arrest. *Biochem. Pharmacol.* 78, 1330–1339. doi:10.1016/j.bcp.2009.06.100

- Cocca, C., Martin, G., Rivera, E., Davio, C., Cricco, G., Lemos, B., Fitzsimons, C., Gutierrez, A., Levin, E., Levin, R., Croci, M., Bergoc, R.M., 1998. An experimental model of diabetes and cancer in rats. *Eur. J. Cancer* 34, 889–894.
- Cocca, C., Randi, A., Gutiérrez, A., Núñez, M., Croci, M., Martín, G., Cricco, G., Medina, V., Mohamad, N., Rivera, E., Kleiman, D., Bergoc, R., 2005. Insulin-like growth factor-I receptor expression and localization in benign and malignant rat mammary tumors. *Anticancer Res.* 25, 4305–12.
- Costa, L.G., 2006. Current issues in organophosphate toxicology. *Clin. Chim. Acta.* 366, 1–13. doi:10.1016/j.cca.2005.10.008
- Craig, Z.R., Wang, W., Flaws, J.A., 2011. Endocrine-disrupting chemicals in ovarian function: effects on steroidogenesis, metabolism and nuclear receptor signaling. *Reproduction* 142, 633–646. doi:10.1530/REP-11-0136
- Croce, C.M., 2008. Oncogenes and cancer. *N. Engl. J. Med.* 358, 502–511. doi:10.1056/NEJMra072367
- Cruikshanks, N., Tang, Y., Booth, L., Hamed, H., Grant, S., Dent, P., 2012. Lapatinib and obatoclox kill breast cancer cells through reactive oxygen species-dependent endoplasmic reticulum stress. *Mol. Pharmacol.* 82, 1217–1229. doi:10.1124/mol.112.081539
- Cuaspué, J., Vargas, B., 2010. Determinación de Colinesterasa Eritrocitaria en Trabajadores Agrícolas Expuestos a Plaguicidas Organofosforados y Carbamatos. *Química Cent.* 01, 71–82.
- Das, K., Sarkar, K., Tarafder, P., Nath, P.P., Poul, G., 2014. Chlorpyrifos suppresses reproductive function in rat. *Int. J. Pharma Bio Sci.* 5, 810–818.
- De Coster, S., van Larebeke, N., 2012. Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action. *J. Environ. Public Health* 2012, 713696. doi:10.1155/2012/713696
- De Servi, B., Hermani, A., Medunjanin, S., Mayer, D., 2005. Impact of PKCdelta on estrogen receptor localization and activity in breast cancer cells. *Oncogene* 24, 4946–4955. doi:10.1038/sj.onc.1208676
- Del Prado Lu, J.L., 2010. Multipesticide residue assessment of agricultural soil and water in major farming areas in Benguet, Philippines. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 59, 175–181. doi:10.1007/s00244-010-9478-5
- Delfino, R.T., Ribeiro, T.S., Figueroa-villar, J.D., 2009. Organophosphorus Compounds as Chemical Warfare Agents: a Review. *J. Braz. Chem. Soc.* 20, 407–428.
- Desireddi, J.R., Farrow, K.N., Marks, J.D., 2010. Hypoxia increases ROS signaling and cytosolic Ca²⁺ in pulmonary artery smooth muscle cells. *Antioxid. Redox Signal.* 12, 595–602. doi:10.1089/ars.2009.2862

- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.-P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, R.T., Gore, A.C., 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr. Rev.* 30, 293–342. doi:10.1210/er.2009-0002
- Dizdaroglu, M., 1991. Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic. Biol. Med.* 10, 225–242.
- Dolapsakis, G., Vlachonikolis, I., Varveris, C., Tsatsakis, a. ., 2001. Mammographic findings and occupational exposure to pesticides currently in use on Crete. *Eur. J. Cancer* 37, 1531–1536. doi:10.1016/S0959-8049(01)00159-9
- Dong, J., Ramachandiran, S., Tikoo, K., Jia, Z., Lau, S.S., Monks, T.J., 2004. EGFR-independent activation of p38 MAPK and EGFR-dependent activation of ERK1/2 are required for ROS-induced renal cell death. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 287, F1049–F1058. doi:10.1152/ajprenal.00132.2004
- Durando, M., Kass, L., Perdomo, V., Bosquiazzo, V.L., Luque, E.H., Muñoz-de-Toro, M., 2011. Prenatal exposure to bisphenol A promotes angiogenesis and alters steroid-mediated responses in the mammary glands of cycling rats. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127, 35–43. doi:10.1016/j.jsbmb.2011.04.001
- Dzul-Caamal, R., Domínguez-López, M.L., Olivares-Rubio, H.F., García-Latorre, E., Vega-López, A., 2014. The relationship between the bioactivation and detoxification of diazinon and chlorpyrifos, and the inhibition of acetylcholinesterase activity in *Chirostoma jordani* from three lakes with low to high organophosphate pesticides contamination. *Ecotoxicology* 23, 779–790. doi:10.1007/s10646-014-1216-8
- Eaton, D.L., Daroff, R.B., Autrup, H., Bridges, J., Buffler, P., Costa, L.G., Coyle, J., McKhann, G., Mobley, W.C., Nadel, L., Neubert, D., Schulte-Hermann, R., Spencer, P.S., 2008. Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. *Crit. Rev. Toxicol.* 38 Suppl 2, 1–125. doi:10.1080/10408440802272158
- Egeghy, P.P., Cohen Hubal, E.A., Tulse, N.S., Melnyk, L.J., Morgan, M.K., Fortmann, R.C., Sheldon, L.S., 2011. Review of pesticide urinary biomarker measurements from selected US EPA children's observational exposure studies. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 8, 1727–1754. doi:10.3390/ijerph8051727
- Emburgh, B.O. Van, Hu, J.J., Levine, E.A., Mosley, L.J., Case, L.D., Lin, H., Knight, S.N., Perrier, N.D., Rubin, P., Sherrill, G.B., Shaw, C.S., Carey, L.A., Sawyer, L.R., Allen, G.O., Milikowski, C., Willingham, M.C., Miller, M.S., 2008. Polymorphisms in drug metabolism genes, smoking, and p53 mutations in breast cancer. *Mol. Carcinog.* 47, 88–99. doi:10.1002/mc.20365
- Eskenazi, B., 2002. Serum Dioxin Concentrations and Menstrual Cycle Characteristics. *Am. J. Epidemiol.* 156, 383–392. doi:10.1093/aje/kwf046

- Eskenazi, B., Mocarelli, P., Warner, M., Needham, L., Patterson, D.G., Samuels, S., Turner, W., Gerthoux, P.M., Brambilla, P., 2003. Relationship of Serum TCDD Concentrations and Age at Exposure of Female Residents of Seveso, Italy. *Environ. Health Perspect.* 112, 22–27. doi:10.1289/ehp.6573
- Eskenazi, B., Mocarelli, P., Warner, M., Samuels, S., Vercellini, P., Olive, D., Needham, L.L., Patterson, D.G., Brambilla, P., Gavoni, N., Casalini, S., Panazza, S., Turner, W., Gerthoux, P.M., 2002. Serum dioxin concentrations and endometriosis: a cohort study in Seveso, Italy. *Environ. Health Perspect.* 110, 629–634.
- European Food Safety Authority, 2005. Review report for the active substance chlorpyrifos.
- European Food Safety Authority, 2014. Conclusion on the peer review of the pesticide human health risk assessment of the active substance chlorpyrifos. *EFSA J.* 12, 34. doi:10.2903/j.efsa.2014.3640
- Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D.M., 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer.* 127, 2893–2917. doi:10.1002/ijc.25516
- Fernández, M., Bourguignon, N., Lux-Lantos, V., Libertun, C., 2010. Neonatal exposure to bisphenol a and reproductive and endocrine alterations resembling the polycystic ovarian syndrome in adult rats. *Environ. Health Perspect.* 118, 1217–1222. doi:10.1289/ehp.0901257
- Fernandez, R., Miranda, C., Everett, B., 2011. Prevalence of obesity among migrant Asian Indians: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Evid. Based. Healthc.* 9, 420–428. doi:10.1111/j.1744-1609.2011.00243.x
- Ferrari, A., Anguiano, L., Lascano, C., Sotomayor, V., Rosenbaum, E., Venturino, A., 2008. Changes in the antioxidant metabolism in the embryonic development of the common South American toad *Bufo arenarum*: differential responses to pesticide in early embryos and autonomous-feeding larvae. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 22, 259–267. doi:10.1002/jbt.20236
- Flint, A.P., Abayasekara, D.R., Wheeler-Jones, C.P., Riley, P., Kaluz, S., Kaluzova, M., Sheldrick, E.L.R., Fisher, P.A., 2000. Acute effects of interferon on estrogen receptor function do not involve the extracellular signal-regulated kinases p42mapk and p44mapk. *J. Interf. cytokine Res.* 233, 225–233.
- Foradori, C.D., Hinds, L.R., Quihuis, A.M., Lacagnina, A.F., Breckenridge, C.B., Handa, R.J., 2011. The differential effect of atrazine on luteinizing hormone release in adrenalectomized adult female Wistar rats. *Biol. Reprod.* 85, 684–689. doi:10.1095/biolreprod.111.092452
- Franken, N.A.P., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., Van Bree, C., 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat. Protoc.* 1, 2315–2319. doi:10.1038/nprot.2006.339

- Franks, L.M., Knowles, M.A., 2005. What is cancer?, in: Knowles, M.A., Selby, P.J. (Eds.), *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*. Oxford University Press, Oxford, p. 532.
- Frasor, J., Gibori, G., 2003. Prolactin regulation of estrogen receptor expression. *Trends Endocrinol. Metab.* 14, 118–123. doi:10.1016/S1043-2760(03)00030-4
- Fujioka, K., Casida, J.E., 2007. Glutathione S-transferase conjugation of organophosphorus pesticides yields S-phospho-, S-aryl-, and S-alkylglutathione derivatives. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 1211–1217. doi:10.1021/tx700133c
- Gao, F.-H., Liu, F., Wei, W., Liu, L.-B., Xu, M.-H., Guo, Z.-Y., Li, W., Jiang, B., Wu, Y.-L., 2012. Oridonin induces apoptosis and senescence by increasing hydrogen peroxide and glutathione depletion in colorectal cancer cells. *Int. J. Mol. Med.* 29, 649–655. doi:10.3892/ijmm.2012.895
- García, M.A., Peña, D., Alvarez, L., Cocca, C., Pontillo, C., Bergoc, R., de Pisarev, D.K., Randi, A., 2010. Hexachlorobenzene induces cell proliferation and IGF-I signaling pathway in an estrogen receptor alpha-dependent manner in MCF-7 breast cancer cell line. *Toxicol. Lett.* 192, 195–205. doi:10.1016/j.toxlet.2009.10.026
- Gearhart, D. a, Sickles, D.W., Buccafusco, J.J., Prendergast, M. a, Terry, A. V, 2007. Chlorpyrifos, chlorpyrifos-oxon, and diisopropylfluorophosphate inhibit kinesin-dependent microtubule motility. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 218, 20–29. doi:10.1016/j.taap.2006.10.008
- Gil, J.M., Soto, A.M., Usma, J.I., Gutiérrez, O.D., 2012. Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Prod. + limpia* 7, 52–73.
- Giordano, G., Afsharinejad, Z., Guizzetti, M., Vitalone, A., Kavanagh, T.J., Costa, L.G., 2007. Organophosphorus insecticides chlorpyrifos and diazinon and oxidative stress in neuronal cells in a genetic model of glutathione deficiency. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 219, 181–189. doi:10.1016/j.taap.2006.09.016
- Giulianelli, S., Molinolo, A., Lanari, C., 2013. Targeting progesterone receptors in breast cancer., in: *Vitamins and Hormones*. Elsevier Inc., pp. 161–184. doi:10.1016/B978-0-12-416673-8.00009-5
- Goel, A., Chauhan, D.P., Dhawan, D.K., 2000. Protective Effects of Zinc in Chlorpyrifos Induced Hepatotoxicity A Biochemical and Trace Elemental Study. *Biol. Trace Elem. Res.* 74, 171–183.
- Gore, A.C., 2010. Neuroendocrine targets of endocrine disruptors Andrea. *Horm.* 9, 16–27.
- Gorrini, C., Harris, I.S., Mak, T.W., 2013. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat. Rev.* 12, 931–947. doi:10.1038/nrd4002

- Gottfredsen, R.H., Larsen, U.G., Enghild, J.J., Petersen, S. V, 2013. Hydrogen peroxide induce modifications of human extracellular superoxide dismutase that results in enzyme inhibition. *Redox Biol.* 1, 24–31. doi:10.1016/j.redox.2012.12.004
- Greaves, M., Maley, C.C., 2012. Clonal evolution in cancer. *Nature* 481, 306–313. doi:10.1038/nature10762.CLONAL
- Grigoryan, H., Lockridge, O., 2009. Nanoimages show disruption of tubulin polymerization by chlorpyrifos oxon: implications for neurotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 240, 143–148. doi:10.1016/j.taap.2009.07.015
- Grigoryan, H., Schopfer, L.M., Peeples, E.S., Duysen, E.G., Grigoryan, M., Thompson, C.M., Lockridge, O., 2009. Mass spectrometry identifies multiple organophosphorylated sites on tubulin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 240, 149–158. doi:10.1016/j.taap.2009.07.020
- Grisouard, J., Mayer, D., 2009. Specific involvement of glycogen synthase kinase-3 in the function and activity of sex steroid hormone receptors reveals the complexity of their regulation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 117, 87–92. doi:10.1016/j.jsbmb.2009.08.002
- Grosicka-maci g, E., 2011. Biological consequences of oxidative stress induced by pesticides. *Postep. Hig Med Dosw* 65, 357–366.
- Gullino, P.M., Pettigrew, H.M., Grantham, F.H., 1975. N-nitrosomethylurea as mammary gland carcinogen in rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 54, 401–414.
- Gupta, S.C., Mishra, M., Sharma, A., Deepak Balaji, T.G.R., Kumar, R., Mishra, R.K., Chowdhuri, D.K., 2010. Chlorpyrifos induces apoptosis and DNA damage in *Drosophila* through generation of reactive oxygen species. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1415–1423. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.05.013
- Guray, M., Sahin, A.A., 2006. Benign breast diseases: classification, diagnosis, and management. *Oncologist* 11, 435–449. doi:10.1634/theoncologist.11-5-435
- Hammes, S.R., Levin, E.R., 2007. Extranuclear Steroid Receptors: Nature and Actions. *Endocr. Rev.* 28, 726–741. doi:10.1210/er.2007-0022
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Harnpicharnchai, K., Chaiear, N., Charerntanyarak, L., 2013. Residues of organophosphate pesticides used in vegetable cultivation in ambient air, surface water and soil in Bueng Niam Subdistrict, Khon Kaen, Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 44, 1088–1097.
- Harrington, W.R., Sheng, S., Barnett, D.H., Petz, L.N., Katzenellenbogen, J.A., Katzenellenbogen, B.S., 2003. Activities of estrogen receptor alpha- and beta-selective

- ligands at diverse estrogen responsive gene sites mediating transactivation or transrepression. *Mol. Cell. Endocrinol.* 206, 13–22. doi:10.1016/S0303-7207(03)00255-7
- Haslam, S.Z., Shyamala, G., 1979. Effect of oestradiol on progesterone receptors in normal mammary glands and its relationship with lactation. *Biochem. J.* 182, 127–131.
- Hassani, S., Sepand, M., Jafari, A., Jaafari, J., Rezaee, R., Zeinali, M., Tavakoli, F., Razavi-Azarkhiavi, K., 2014. Protective effects of curcumin and vitamin E against chlorpyrifos-induced lung oxidative damage. *Hum. Exp. Toxicol.* 1–9. doi:10.1177/0960327114550888
- Hens, J.R., Wysolmerski, J.J., 2005. Molecular mechanisms involved in the formation of the embryonic mammary gland. *Breast cancer Res.* 7, 220–224. doi:10.1186/bcr1306
- Herbst, A.L., Ulfelder, H., Poskanzer, D., 1971. Adenocarcinoma of the vagina. *N. Engl. J. Med.* 284, 878–881.
- Heuberger, B., Fitzka, I., Wasner, G., Kratochwil, K., 1982. Induction of androgen receptor formation by epithelium-mesenchyme interaction in embryonic mouse mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 2957–2961.
- Hinck, L., Silberstein, G.B., 2005. The mammary end bud as a motile organ. *Breast cancer Res.* 7, 245–251. doi:10.1186/bcr1331
- Hodgson, E., Rose, R.L., 2006. Organophosphorus chemicals: potent inhibitors of the human metabolism of steroid hormones and xenobiotics. *Drug Metab. Rev.* 38, 149–162. doi:10.1080/03602530600569984
- Hofmann, P., Abernathy, T.G., 1993. Prognostic Significance of Benign Proliferative Breast Disease. *Cancer* 71, 3896–3907.
- Hovey, R.C., Trott, J.F., Ginsburg, E., Goldhar, A., Sasaki, M.M., Fountain, S.J., Sundararajan, K., Vonderhaar, B.K., 2001. Transcriptional and spatiotemporal regulation of prolactin receptor mRNA and cooperativity with progesterone receptor function during ductal branch growth in the mammary gland. *Dev. Dyn.* 222, 192–205. doi:10.1002/dvdy.1179
- Howard, M.D., Pope, C.N., 2002. In vitro effects of chlorpyrifos, parathion, methyl parathion and their oxons on cardiac muscarinic receptor binding in neonatal and adult rats. *Toxicology* 170, 1–10.
- Ikeda, S., Kishida, S., Yamamoto, H., Murai, H., Koyama, S., Kikuchi, A., 1998. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 and β -catenin and promotes GSK-3-dependent phosphorylation of β -catenin. *EMBO J.* 17, 1371–1384.
- International Agency of Research on Cancer, 1978. Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: some N-Nitroso compounds. *IARC Monogr.* 17, 227–255.

- International Agency of Research on Cancer, 2014. GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012 [WWW Document]. URL <http://globocan.iarc.fr/ia/World/atlas.html> (accessed 8.27.14).
- Irigaray, P., Newby, J.A., Clapp, R., Hardell, L., Howard, V., Montagnier, L., Epstein, S., Belpomme, D., 2007. Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview. *Biomed. Pharmacother.* 61, 640–658. doi:10.1016/j.biopha.2007.10.006
- Irshad, M., Chaudhuri, P.S., 2002. Oxidant-antioxidant system: role and significance in human body. *Indian J. Exp. Biol.* 40, 1233–1239.
- Itziou, A., Kaloyianni, M., Dimitriadis, V.K., 2011. Effects of organic contaminants in reactive oxygen species, protein carbonylation and DNA damage on digestive gland and haemolymph of land snails. *Chemosphere* 85, 1101–1107. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.07.043
- Jaipieam, S., Visuthismajarn, P., Siriwong, W., Borjan, M., Robson, M.G., 2009. Inhalation exposure of organophosphate pesticides by vegetable growers in the Bang-Rieng subdistrict in Thailand. *J. Environ. Public Health* 2009, 452373. doi:10.1155/2009/452373
- Jawahar, B.S., Jone, A.S., Rajendran, A.P., Paulraj, S., Maria, S.S., 2011. Gestational cadmium exposure-induced ovotoxicity delays puberty through oxidative stress and impaired steroid hormone levels. *J. Med. Toxicol.* 7, 195–204. doi:10.1007/s13181-011-0143-9
- Jemal, A., Bray, F., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D., 2011. Global Cancer Statistics. *CA. Cancer J. Clin.* 61, 69–90. doi:10.3322/caac.20107
- Jenkins, S., Raghuraman, N., Eltoum, I., Carpenter, M., Russo, J., Lamartiniere, C.A., 2009. Oral exposure to bisphenol a increases dimethylbenzanthracene-induced mammary cancer in rats. *Environ. Health Perspect.* 117, 910–915. doi:10.1289/ehp.11751
- Jensen, R.A., Page, D.L., Dupont, W.D., Rogers, L.W., 1989. Invasive breast cancer risk in women with sclerosing adenosis. *Cancer* 64, 1977–1983.
- Jergentz, S., Mugni, H., Bonetto, C., Schulz, R., 2005. Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina. *Chemosphere* 61, 817–826. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.04.036
- Jiang, J., Tang, Y., Liang, X., 2011. EMT: A new vision of hypoxia promoting cancer progression. *Cancer Biol. Ther.* 11, 714–723. doi:10.4161/cbt.11.8.15274
- John, E.M., Phipps, A.I., Davis, A., Koo, J., 2005. Migration history, acculturation, and breast cancer risk in Hispanic women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14, 2905–2913. doi:10.1158/1055-9965.EPI-05-0483
- Jordan, M.A., Wilson, L., 2004. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* 4, 253–265. doi:10.1038/nr1317

- Kabat, G.C., Jones, J.G., Rohan, T.E., 2011. A multi-center prospective cohort study of benign breast disease and risk of subsequent breast cancer. *Cancer causes Control* 21, 821–828. doi:10.1007/s10552-010-9508-7
- Kamata, H., Honda, S.-I., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H., Karin, M., 2005. Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* 120, 649–661. doi:10.1016/j.cell.2004.12.041
- Kammon, A.M., Brar, R.S., Banga, H.S., Sodhi, S., 2010. Patho-biochemical studies on hepatotoxicity and nephrotoxicity on exposure to chlorpyrifos and imidacloprid in layer chickens. *Vet. Arh.* 80, 663–672.
- Kawada, K., Yonei, T., Ueoka, H., Kiura, K., Tabata, M., Takigawa, N., Harada, M., Tanimoto, M., 2002. Comparison of chemosensitivity tests: clonogenic assay versus MTT assay. *Acta Med. Okayama* 56, 129–134.
- Kelman, Z., 1997. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* 14, 629–640. doi:10.1038/sj.onc.1200886
- Kim, H., Laing, M., Muller, W., 2005. c-Src-null mice exhibit defects in normal mammary gland development and ER α signaling. *Oncogene* 24, 5629–5636. doi:10.1038/sj.onc.1208718
- Kim, Y., Ryu, J.C., Choi, H.-S., Lee, K., 2011. Effect of 2,2',4,4'-tetrahydroxybenzophenone (BP2) on steroidogenesis in testicular Leydig cells. *Toxicology* 288, 18–26. doi:10.1016/j.tox.2011.06.013
- Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M., Hocevar, B.A., 2010. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol. Pathol.* 38, 96–109. doi:10.1177/0192623309356453
- Kojima, H., Katsura, E., Takeuchi, S., Niiyama, K., Kobayashi, K., 2003. Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in vitro reporter gene assays using Chinese Hamster Ovary Cells. *Environ. Health Perspect.* 112, 524–531. doi:10.1289/ehp.6649
- Kumar, M.S., Praveenkumar, R., Jeon, B.-H., Thajuddin, N., 2014. Chlorpyrifos-induced changes in the antioxidants and fatty acid compositions of *Chroococcus turgidus* NTMS12. *Lett. Appl. Microbiol.* 1–7. doi:10.1111/lam.12311
- Kumar, S., 2011. Occupational, environmental and lifestyle factors associated with spontaneous abortion. *Reprod. Sci.* 18, 915–930. doi:10.1177/1933719111413298
- Laban, C., Bustin, S.A., Jenkins, P.J., 2003. The GH-IGF-I axis and breast cancer. *Trends Endocrinol. Metab.* 14, 28–34.
- Lamartiniere, C.A., Jenkins, S., Betancourt, A.M., Wang, J., Russo, J., 2011. Exposure to the Endocrine Disruptor Bisphenol A Alters Susceptibility for Mammary Cancer. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* 5, 45–52. doi:10.1515/HMBCI.2010.075

- Lann, D., LeRoith, D., 2008. The role of endocrine insulin-like growth factor-I and insulin in breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 13, 371–379. doi:10.1007/s10911-008-9100-x
- Latuszynska, J., Luty, S., Raszewski, G., Tokarska-Rodak, M., Przebirowska, D., Przylepa, E., Haratym-maj, A., 2001. Neurotoxic effect of dermally-applied Chlorpyrifos and Cypermethrin in Wistar Rats. *Ann Agric Env. Med* 8, 163–170.
- Le Romancer, M., Poulard, C., Cohen, P., Sentis, S., Renoir, J.-M., Corbo, L., 2011. Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. *Endocr. Rev.* 32, 597–622. doi:10.1210/er.2010-0016
- Lee, D.-H., Lind, P.M., Jacobs, D.R., Salihovic, S., van Bavel, B., Lind, L., 2011. Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in plasma predict development of type 2 diabetes in the elderly. *Diabetes Care* 34, 1778–1784. doi:10.2337/dc10-2116
- Lee, J.E., Park, J.H., Shin, I.C., Koh, H.C., 2012. Reactive oxygen species regulated mitochondria-mediated apoptosis in PC12 cells exposed to chlorpyrifos. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 263, 148–162. doi:10.1016/j.taap.2012.06.005
- Lee, W.J., Blair, A., Hoppin, J. a, Lubin, J.H., Rusiecki, J. a, Sandler, D.P., Dosemeci, M., Alavanja, M.C.R., 2004. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to chlorpyrifos in the Agricultural Health Study. *J. Natl. Cancer Inst.* 96, 1781–1789. doi:10.1093/jnci/djh324
- Lee, W.J., Colt, J.S., Heineman, E.F., McComb, R., Weisenburger, D.D., Lijinsky, W., Ward, M.H., 2005. Agricultural pesticide use and risk of glioma in Nebraska, United States. *Occup. Environ. Med.* 62, 786–792. doi:10.1136/oem.2005.020230
- Lee, W.J., Sandler, D.P., Blair, A., Samanic, C., Cross, A.J., Alavanja, M.C.R., 2007. Pesticide use and colorectal cancer risk in the Agricultural Health Study. *Int J Cancer* 121, 339–346. doi:10.1002/ijc.22635
- León Goñi, A.C., Blanco, D., Peña, A., Ronda, M., González, B.O., Arteaga, M.E., Bada, A.M., González, Y., Mancebo, A., 2011. Hematological and biochemical parameters in Sprague Dawley laboratory rats breed in CENPALAB, Cemp: SPRD. *Rev. Electrónica Vet.* 12, 1–10.
- Li, D., Zhou, Z., Qing, D., He, Y., Wu, T., Miao, M., Wang, J., Weng, X., Ferber, J.R., Herrinton, L.J., Zhu, Q., Gao, E., Checkoway, H., Yuan, W., 2010. Occupational exposure to bisphenol-A (BPA) and the risk of self-reported male sexual dysfunction. *Hum. Reprod.* 25, 519–527. doi:10.1093/humrep/dep381
- Li, Q., Kobayashi, M., Kawada, T., 2009. Chlorpyrifos induces apoptosis in human T cells. *Toxicology* 255, 53–57. doi:10.1016/j.tox.2008.10.003
- Litterio, M.C., Jagers, G., Sagdicoglu Celep, G., Adamo, A.M., Costa, M.A., Oteiza, P.I., Fraga, C.G., Galleano, M., 2012. Blood pressure-lowering effect of dietary (-)-epicatechin

- administration in L-NAME-treated rats is associated with restored nitric oxide levels. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 1894–1902. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.585
- Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G.H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X., He, X., 2002. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108, 837–847.
- Liu, L., Wise, D.R., Diehl, J.A., Simon, M.C., 2008. Hypoxic reactive oxygen species regulate the integrated stress response and cell survival. *J. Biol. Chem.* 283, 31153–31162. doi:10.1074/jbc.M805056200
- Liu, M.-M., Albanese, C., Anderson, C.M., Hilty, K., Webb, P., Uht, R.M., Price, R.H., Pestell, R.G., Kushner, P.J., 2002. Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression. *J. Biol. Chem.* 277, 24353–24360. doi:10.1074/jbc.M201829200
- Lobo, N.A., Shimono, Y., Qian, D., Clarke, M.F., 2007. The biology of cancer stem cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23, 675–699. doi:10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104154
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Zipursky, S.L., Darnell, J., 2004. *Molecular Cell Biology*, 5th ed.
- Loewy, M., Kirs, V., Carvajal, G., Venturino, A., Pechen de D'Angelo, M., 1999. Groundwater contamination by azinphos methyl in the northern Patagonic Region (Argentina). *Sci. Total Environ.* 225, 211–218.
- Loewy, R.M., Monza, L.B., Kirs, V.E., Savini, M.C., 2011. Pesticide distribution in an agricultural environment in Argentina. *J. Environ. Science Heal.* 46, 662–670. doi:10.1080/03601234.2011.592051
- Lotito, S.B., Fraga, C.G., 1998. (+)-Catechin prevents human plasma oxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 24, 435–441.
- Lydon, J.P., DeMayo, F.J., Conneely, O.M., O'Malley, B.W., 1996. Reproductive phenotypes of the progesterone receptor null mutant mouse. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 56, 67–77. doi:10.1016/0960-0760(95)00254-5
- Lydon, J.P., DeMayo, F.J., Funk, C.R., Mani, S.K., Hughes, A.R., Montgomery, C.A., Shyamala, G., Conneely, O.M., O'Malley, B.W., 1995. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev.* 9, 2266–2278. doi:10.1101/gad.9.18.2266
- Lydon, J.P., Ge, G., Kittrell, F.S., Medina, D., Malley, B.W.O., 1999. Murine mammary gland carcinogenesis is critically dependent on progesterone receptor function. *Cancer Res.* 59, 4276–4284.
- Ma, P., Wu, Y., Zeng, Q., Gan, Y., Chen, J., Ye, X., Yang, X., 2013. Oxidative damage induced by chlorpyrifos in the hepatic and renal tissue of Kunming mice and the antioxidant role of vitamin E. *Food Chem. Toxicol.* 58, 177–183. doi:10.1016/j.fct.2013.04.032

- Mandal, T.K., Das, N.S., 2012. Testicular gametogenic and steroidogenic activities in chlorpyrifos insecticide-treated rats: a correlation study with testicular oxidative stress and role of antioxidant enzyme defence systems in Sprague-Dawley rats. *Andrologia* 44, 102–115. doi:10.1111/j.1439-0272.2010.01110.x
- Mansour, S.A., Mossa, A.H., 2010. Adverse effects of lactational exposure to chlorpyrifos in suckling rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 29, 77–92. doi:10.1177/0960327109357276
- Marino, D., Ronco, A., 2005. Cypermethrin and Chlorpyrifos Concentration Levels in Surface Water Bodies of the Pampa Ondulada, Argentina. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75, 820–826. doi:10.1007/s00128-005-0824-7
- Martín, G., Cricco, G., Davio, C., Engel, N., Cocca, C., Rivera, E., Bergoc, R., 1998. Epidermal growth factor in NMU-induced mammary tumors in rats. *Breast Cancer Res. Treat.* 48, 175–185.
- Martín, G., Davio, C., Rivera, E., Melito, G., Cricco, G., Andrade, N., Caro, R., Bergoc, R., 1997. Hormone dependence of mammary tumors induced in rats by intraperitoneal NMU injection. *Cancer Invest.* 15, 8–17.
- Martín, G., Melito, G., Rivera, E., Levin, E., Davio, C., Cricco, G., Andrade, N., Caro, R., Bergoc, R., 1996a. Effect of tamoxifen on intraperitoneal N-nitroso-N-methylurea induced tumors. *Cancer Lett.* 100, 227–234.
- Martín, G., Rivera, E.S., Davio, C., Cricco, G., Levin, E., Cocca, C., Andrade, N., Caro, R., Bergoc, R.M., 1996b. Receptors characterization of intraperitoneally N-nitroso-N-methylurea-induced mammary tumors in rats. *Cancer Lett.* 101, 1–8.
- Massari, N. a, Medina, V. a, Cricco, G.P., Martinel Lamas, D.J., Sambuco, L., Pagotto, R., Ventura, C., Ciruolo, P.J., Pignataro, O., Bergoc, R.M., Rivera, E.S., 2013. Antitumor activity of histamine and clozapine in a mouse experimental model of human melanoma. *J. Dermatol. Sci.* 72, 252–262. doi:10.1016/j.jdermsci.2013.07.012
- McLachlan, J.A., 2001. Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. *Endocr. Rev.* 22, 319–341. doi:10.1210/edrv.22.3.0432
- McLachlan, J.A., 2006. Commentary: prenatal exposure to diethylstilbestrol (DES): a continuing story. *Int. J. Epidemiol.* 35, 868–870. doi:10.1093/ije/dyl140
- Mebratu, Y., Tesfaigzi, Y., 2010. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death is subcellular localization the answer? *Cell Cycle* 8, 1168–1175.
- Medunjanin, S., Hermani, A., De Servi, B., Grisouard, J., Rincke, G., Mayer, D., 2005. Glycogen synthase kinase-3 interacts with and phosphorylates estrogen receptor alpha and is involved in the regulation of receptor activity. *J. Biol. Chem.* 280, 33006–33014. doi:10.1074/jbc.M506758200

- Mehdi, M.Z., Azar, Z.M., Srivastava, A.K., 2007. Role of receptor and nonreceptor protein tyrosine kinases in H₂O₂-induced PKB and ERK1/2 signaling. *Cell Biochem. Biophys.* 47, 1–10.
- Mehrara, E., Forssell-Aronsson, E., Ahlman, H., Bernhardt, P., 2007. Specific growth rate versus doubling time for quantitative characterization of tumor growth rate. *Cancer Res.* 67, 3970–3975. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3822
- Meng, L., Tao, H., Dong, G., Yang, T., Zhang, W., Zhu, W., Huang, C., 2012. ERK1/2 and Akt pathway activated during (3R,6R)-bassiatin(1)-induced apoptosis in MCF-7 cells. *Cell Biol. Int.* 36, 345–348. doi:10.1042/CBI20110388
- Micevych, P., Soma, K.K., Sinchak, K., 2009. Neuroprogesterone: key to estrogen positive feedback? *Paul. Brain Res. Rev.* 57, 470–480. doi:10.1016/j.brainresrev.2007.06.009.Neuroprogesterone
- Ministerio de Salud, 2009. Resolución 456/2009. Ministerio de Salud, Buenos Aires.
- Moore, M.M., Hargett, C.W., Hanks, J.B., Fajardo, L.L., Harvey, J.A., Frierson, H.F., Slingluff, C.L., 1997. Association of Breast Cancer with the Finding of Atypical Ductal Hyperplasia at Core Breast Biopsy. *Ann. Surg.* 225, 726–731.
- Muftau, S., Aisha, O.O., Ambali, S.F., Oyedepo, I.T., Umaru, K.M., Yusuf, P.O., Ishaku, K.P., Isa, H.I., 2014. Ameliorative effect of hibiscus sabdariffa linn of subchronic chlorpyrifos-induced alterations in sex and thyroid hormones in male wistar rats. *Am. J. Pharmacol. Toxicol.* 9, 96–106. doi:10.3844/ajtp.2014.96.106
- Mulac-Jericevic, B., Conneely, O.M., 2004. Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction* 128, 139–146. doi:10.1530/rep.1.00189
- Muñoz de Toro, M., Markey, C.M., Wadia, P.R., Luque, E.H., Rubin, S., Sonnenschein, C., Soto, A.M., 2010. Perinatal exposure to bisphenol-A alters peripubertal mammary gland development in mice. *Endocrinology* 146, 4138–4147. doi:10.1210/en.2005-0340
- Muñoz-Quezada, M.T., Lucero, B., Iglesias, V., Muñoz, M.P., 2014. Vías de exposición a plaguicidas en escolares de la Provincia de Talca, Chile. *Gac. Sanit.* 28, 190–195. doi:dx.doi.org/10.1016/j.gaceta.2014.01.003
- Murphy, L.C., Leygue, E., 2012. The Role of Estrogen Receptor- in Breast Cancer. *Semin. Reprod. Med.* 30, 5–13.
- Murphy, L.C., Seekallu, S. V, Watson, P.H., 2011. Clinical significance of estrogen receptor phosphorylation. *Endocr. Relat. Cancer* 18, R1–14. doi:10.1677/ERC-10-0070
- Nakadai, A., Li, Q., Kawada, T., 2006. Chlorpyrifos induces apoptosis in human monocyte cell line U937. *Toxicology* 224, 202–209. doi:10.1016/j.tox.2006.04.055

- Narra, M.R., 2014. Tissue-specific recovery of oxidative and antioxidant effects of chlorpyrifos in the freshwater crab, *Barytelphusa guerini*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 67, 158–166. doi:10.1007/s00244-014-0010-1
- Nasseri, K., Moulton, L.H., 2011. Patterns of death in the first and second generation immigrants from selected Middle Eastern countries in California. *J. Immigr. Minor. Heal.* 13, 361–370. doi:10.1007/s10903-009-9270-7
- National Institutes of Health, 2013. Guidelines for endpoints in animal study proposals [WWW Document]. Natl. Institutes Heal. URL http://oacu.od.nih.gov/ARAC/documents/ASP_Endpoints.pdf (accessed 11.1.14).
- Nikhil, K., Sharan, S., Singh, A.K., Chakraborty, A., Roy, P., 2014. Anticancer activities of pterostilbene-isothiocyanate conjugate in breast cancer cells: involvement of PPAR. *PLoS One* 9, e104592. doi:10.1371/journal.pone.0104592
- Nishi, K., Hundal, S.S., 2013. Chlorpyrifos induced toxicity in reproductive organs of female Wistar rats. *Food Chem. Toxicol.* 62, 732–738. doi:10.1016/j.fct.2013.10.006
- Núñez, M., Martín, G., Cocca, C., Mohamad, N., Gutiérrez, A., Cricco, G., Medina, V., Rivera, E., Croci, M., Crescenti, E., Bergoc, R., 2006. Effect of rosiglitazone on N-nitroso-N-methylurea-induced mammary tumors in rat. *Anticancer Res.* 26, 2113–2122.
- Oakes, S.R., Hilton, H.N., Ormandy, C.J., 2006. The alveolar switch: coordinating the proliferative cues and cell fate decisions that drive the formation of lobuloalveoli from ductal epithelium. *Breast cancer Res.* 8, 207. doi:10.1186/bcr1411
- Ochoa Hernandez, A.B., Juárez Vásquez, C.I., Rosales Reynoso, M.A., Barros-núñez, P., 2012. La vía de señalización Wnt- β -catenina y su relación con cáncer. *Cir. Cir.* 80, 389–398.
- Ohtani, K., Yanagiba, Y., Ashimori, A., Takeuchi, A., Takada, N., Togawa, M., Hasegawa, T., Ikeda, M., Miura, N., 2013. Influence of injection timing on severity of cadmium-induced testicular toxicity in mice. *J. Toxicol. Sci.* 38, 145–150.
- Ojha, A., Srivastava, N., 2014. In vitro studies on organophosphate pesticides induced oxidative DNA damage in rat lymphocytes. *Mutat Res Genet Toxicol Env. Mutagen* 761, 10–17. doi:10.1016/j.mrgentox.2014.01.007
- Olgun, S., Misra, H.P., 2006. Pesticides induced oxidative stress in thymocytes. *Mol. Cell. Biochem.* 290, 137–144. doi:10.1007/s11010-006-9178-7
- Orabi, S.H., Elbially, B.E., Shawky, S.M., 2013. Ameliorating and hypoglycemic effects of zinc against acute hepatotoxic effect of chlorpyrifos. *Glob. Vet.* 10, 439–446. doi:10.5829/idosi.gv.2013.10.4.7318
- Orb, A., Edwards, D.P., 2013. The biology of progesterone receptor in the normal mammary gland and in breast cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* 357, 4–17. doi:10.1016/j.mce.2011.10.030

- Oruç, E.Ö., Usta, D., 2007. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23, 48–55. doi:10.1016/j.etap.2006.06.005
- Osborne, C.K., Zhao, H., Fuqua, S.A., 2000. Selective estrogen receptor modulators: structure, function, and clinical use. *J. Clin. Oncol.* 18, 3172–3186.
- Palmer, J.R., Wise, L.A., Hatch, E.E., Troisi, R., Titus-Ernstoff, L., Strohsnitter, W., Kaufman, R., Herbst, A.L., Noller, K.L., Hyer, M., Hoover, R.N., 2006. Prenatal diethylstilbestrol exposure and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15, 1509–1514. doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-0109
- Palmieri, C., Cheng, G., Saji, S., Zelada-Hedman, M., Wärrri, A., Weihua, Z., Van Noorden, S., Wahlstrom, T., Coombes, R., Warner, M., Gustafsson, J., 2002. Estrogen receptor beta in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 9, 1–13. doi:10.1016/j.mce.2013.08.005
- Paoletti, F., Aldinucci, D., Mocali, A., Caparrini, A., 1986. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Anal. Biochem.* 154, 536–541. doi:10.1002/0471684228.egp11726
- Peluffo, G., Calcerrada, P., Piacenza, L., Pizzano, N., Radi, R., 2009. Superoxide-mediated inactivation of nitric oxide and peroxynitrite formation by tobacco smoke in vascular endothelium: studies in cultured cells and smokers. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 296, H1781–H1792. doi:10.1152/ajpheart.00930.2008
- Peña, D., Pontillo, C., García, M.A., Cocca, C., Alvarez, L., Chiappini, F., Bourguignon, N., Frahm, I., Bergoc, R., Kleiman de Pisarev, D., Randi, A., 2012. Alterations in c-Src/HER1 and estrogen receptor signaling pathways in mammary gland and tumors of hexachlorobenzene-treated rats. *Toxicology* 293, 68–77. doi:10.1016/j.tox.2011.12.012
- Perou, C.M., Sørli, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S.X., Lønning, P.E., Børresen-Dale, A.L., Brown, P.O., Botstein, D., 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747–752. doi:10.1038/35021093
- Pesatori, A.C., Consonni, D., Bachetti, S., Zocchetti, C., Bonzini, M., Baccarelli, A., Bertazzi, P.A., 2003. Short- and long-term morbidity and mortality in the population exposed to dioxin after the “Seveso accident”. *Ind. Health* 41, 127–138.
- Petrelli, G., Figà-Talamanca, I., Lauria, L., Mantovani, A., 2003. Spontaneous abortion in spouses of greenhouse workers exposed to pesticides. *Environ. Health Prev. Med.* 8, 77–81. doi:10.1007/BF02897919
- Plant, T.M., 2012. A comparison of the neuroendocrine mechanisms underlying the initiation of the preovulatory LH surge in the human, Old World monkey and rodent. *Front. Neuroendocrinol.* 33, 160–168. doi:10.1016/j.yfrne.2012.02.002

- Plíšková, M., Vondráček, J., Canton, R.F., Nera, J., Kočan, A., Petřík, J., Trnovec, T., Sanderson, T., van den Berg, M., Machala, M., 2005. Impact of Polychlorinated Biphenyls Contamination on Estrogenic Activity in Human Male Serum. *Environ. Health Perspect.* 113, 1277–1284. doi:10.1289/ehp.7745
- Pórfido, O.D., 2013. *Los Plaguicidas en la República Argentina*, Primer. ed. Buenos Aires.
- Prendergast, M., Self, R., Smith, K., Ghayoumi, L., Mullins, M., Butler, T., Buccafusco, J., Gearhart, D., Terry Jr, A., 2008. Microtubule-associated targets in chlorpyrifos oxon hippocampal neurotoxicity. *Neuroscience* 146, 330–339.
- Qiao, D., Seidler, F.J., Slotkin, T.A., 2001. Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos modeled in vitro: comparative effects of metabolites and other cholinesterase inhibitors on DNA synthesis in PC12 and C6 cells. *Environ. Health Perspect.* 109, 909–913.
- Qin, X.-Y., Fukuda, T., Yang, L., Zaha, H., Akanuma, H., Zeng, Q., Yoshinaga, J., Sone, H., 2012. Effects of bisphenol A exposure on the proliferation and senescence of normal human mammary epithelial cells. *Cancer Biol. Ther.* 13, 296–306.
- Randi, A.S., Cocca, C., Carbone, V., Nuñez, M., Croci, M., Gutiérrez, A., Bergoc, R., Kleiman de Pisarev, D.L., 2006. Hexachlorobenzene is a tumor co-carcinogen and induces alterations in insulin-growth factors signaling pathway in the rat mammary gland. *Toxicol. Sci.* 89, 83–92. doi:10.1093/toxsci/kfj023
- Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., Aggarwal, B.B., 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* 49, 1603–16. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006
- Rich, J.D., Gabriel, S.M., Schultz-Norton, J.R., 2012. In vitro effects of herbicides and insecticides on human breast cells. *ISRN Toxicol.* 2012, 232461. doi:10.5402/2012/232461
- Rivera, E.S., Andrade, N., Martin, G., Melito, G., Cricco, G., Mohamad, N., Davio, C., Caro, R., Bergoc, R.M., 1994. Induction of mammary tumors in rat by intraperitoneal injection of NMU: histopathology and estral cycle influence. *Cancer Lett.* 86, 223–228.
- Rosen, G.M., Freeman, B.A., 1984. Detection of superoxide generated by endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 7269–7273.
- Ruan, W., Monaco, M.E., Kleinberg, D.L., 2005. Progesterone stimulates mammary gland ductal morphogenesis by synergizing with and enhancing insulin-like growth factor-I action. *Endocrinology* 146, 1170–1178. doi:10.1210/en.2004-1360
- Rudolph, M., Döcke, W.-D., Müller, A., Menning, A., Röse, L., Zollner, T.M., Gashaw, I., 2012. Induction of overt menstruation in intact mice. *PLoS One* 7, e32922. doi:10.1371/journal.pone.0032922

- Rush, T., Liu, X.Q., Hjelmhaug, J., Lobner, D., 2010. Mechanisms of chlorpyrifos and diazinon induced neurotoxicity in cortical culture. *Neuroscience* 166, 899–906. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.01.025
- Russo, I.H., Russo, J., 1996. Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environ. Health Perspect.* 104, 938–967.
- Russo, J., Hu, Y.-F., Yang, X., Russo, I.H., 2000. Developmental, Cellular, and Molecular Basis of Human Breast Cancer. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 2000, 17–37. doi:10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a024241
- Russo, J., Russo, I.H., 1996. Experimentally induced mammary tumors in rats. *Breast Cancer Res. Treat.* 39, 7–20.
- Russo, J., Russo, I.H., 2008. Breast development, hormones and cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 630, 52–56.
- Sachana, M., Flaskos, J., Sidiropoulou, E., Yavari, C.A., Hargreaves, A.J., 2008. Inhibition of extension outgrowth in differentiating rat C6 glioma cells by chlorpyrifos and chlorpyrifos oxon: effects on microtubule proteins. *Toxicol. Vitro.* 22, 1387–1391. doi:10.1016/j.tiv.2008.02.022
- Salmon, S.E., Hamburger, A.W., Soehnen, B., Durie, B.G.M., Alberts, D.S., Moon, T.E., 1978. Quantitation of differential sensitivity of human-tumor stem cells to anticancer drugs. *N. Engl. J. Med.* 298, 1321–1327.
- Sanghi, R., Pillai, M.K.K., Jayalekshmi, T.R., Nair, A., 2003. Organochlorine and organophosphorus pesticide residues in breast milk from Bhopal, Madhya Pradesh, India. *Hum. Exp. Toxicol.* 22, 73–76. doi:10.1191/0960327103ht321oa
- Schrader, M., Fahimi, H.D., 2006. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 1755–1766. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.09.006
- Scully, K.M., Gleiberman, A.S., Lindzey, J., Lubahn, D.B., Korach, K.S., Rosenfeld, M.G., 1997. Role of estrogen receptor-alpha in the anterior pituitary gland. *Mol. Endocrinol.* 11, 674–681. doi:10.1210/mend.11.6.0019
- Shenouda, J., Green, P., Sultatos, L., 2009. An evaluation of the inhibition of human butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase by the organophosphate chlorpyrifos oxon. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 241, 135–142. doi:10.1016/j.taap.2009.08.014
- Shi, C., Wu, F., Zhu, X.C., Xu, J., 2013. Incorporation of β -sitosterol into the membrane increases resistance to oxidative stress and lipid peroxidation via estrogen receptor-mediated PI3K/GSK3 β signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 2538–2544. doi:10.1016/j.bbagen.2012.12.012
- Shishodia, S., Sethi, G., Ahn, K.S., Aggarwal, B.B., 2007. Guggulsterone inhibits tumor cell proliferation, induces S-phase arrest, and promotes apoptosis through activation of c-Jun

- N-Terminal kinase, suppression of Akt pathway, and downregulation of antiapoptotic gene products. *Biochem. Pharmacol.* 74, 118–130. doi:10.1016/j.bcp.2007.03.026
- Shupnik, M.A., 2004. Crosstalk between steroid receptors and the c-Src-receptor tyrosine kinase pathways: implications for cell proliferation. *Oncogene* 23, 7979–7989. doi:10.1038/sj.onc.1208076
- Silveyra, P., Lux-lantos, V., Libertun, C., 2007. Both orexin receptors are expressed in rat ovaries and fluctuate with the estrous cycle: effects of orexin receptor antagonists on gonadotropins and ovulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, 977–985. doi:10.1152/ajpendo.00179.2007.
- Smith, M.S., Freeman, M.E., Neill, J.D., 1975. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 96, 219–226. doi:10.1210/endo-96-1-219
- Snedeker, S.M., 2001. Pesticides and breast cancer risk: a review of DDT, DDE, and Dieldrin. *Environ. Health Perspect.* 109, 35–47.
- Snijder, C.A., Roeleveld, N., Te Velde, E., Steegers, E.A.P., Raat, H., Hofman, A., Jaddoe, V.W. V., Burdorf, A., 2012. Occupational exposure to chemicals and fetal growth: the Generation R study. *Hum. Reprod.* 27, 910–920. doi:10.1093/humrep/der437
- Soltaninejad, K., Abdollahi, M., 2009. Current opinion on the science of organophosphate pesticides and toxic stress: a systematic review. *Med Sci Monit* 15, 75–90.
- Son, Y.-O., Pratheeshkumar, P., Lei, W., Wang, X., Kim, D.-H., Lee, J.-Y., Zhang, Z., Lee, J.-C., Shi, X., 2013. Reactive oxygen species mediate Cr(VI)-induced carcinogenesis through PI3K/AKT-dependent activation of GSK-3 / -catenin signaling. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 271, 239–248. doi:10.1016/j.taap.2013.04.036.Reactive
- Son, Y.-O., Wang, L., Poyil, P., Budhraj, A., Hitron, J.A., Zhang, Z., Lee, J.-C., Shi, X., 2012. Cadmium induces carcinogenesis in BEAS-2B cells through ROS-dependent activation of PI3K/AKT/GSK-3 / -catenin signaling. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 264, 153–160. doi:10.1016/j.taap.2012.07.028
- Song, X., Seidler, F.J., Saleh, J.L., Zhang, J., Padilla, S., Slotkin, T. a, 1997. Cellular mechanisms for developmental toxicity of chlorpyrifos: targeting the adenylyl cyclase signaling cascade. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 145, 158–174. doi:10.1006/taap.1997.8171
- Sørli, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J.C., Brown, P.O., Botstein, D., Lønning, P.E., Børresen-Dale, A.L., 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 10869–10874. doi:10.1073/pnas.191367098

- Sørbye, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J.S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., Demeter, J., Perou, C.M., Lønning, P.E., Brown, P.O., Børresen-Dale, A.-L., Botstein, D., 2003. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 8418–8423. doi:10.1073/pnas.0932692100
- Sotiriou, C., Neo, S.-Y., McShane, L.M., Korn, E.L., Long, P.M., Jazaeri, A., Martiat, P., Fox, S.B., Harris, A.L., Liu, E.T., 2003. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10393–10398. doi:10.1073/pnas.1732912100
- Soto-Cerrato, V., Llagostera, E., Montaner, B., Scheffer, G.L., Perez-Tomas, R., 2004. Mitochondria-mediated apoptosis operating irrespective of multidrug resistance in breast cancer cells by the anticancer agent prodigiosin. *Biochem. Pharmacol.* 68, 1345–1352. doi:10.1016/j.bcp.2004.05.056
- Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., Brennan, M., 1973. A Human Cell Line From a Pleural Effusion Derived From a Breast Carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 51, 1409–1416.
- Speirs, V., Skliris, G.P., Burdall, S.E., Carder, P.J., 2002. Distinct expression patterns of ER and ER in normal human mammary gland. *J. Clin. Patol.* 55, 371–374.
- Speirs, V., Walker, R.A., 2007. New perspectives into the biological and clinical relevance of oestrogen receptors in the human breast. *J. Pathol.* 211, 499–506. doi:10.1002/path
- Stanford University School of Medicine, 2006. Surgical Pathology Criteria [WWW Document]. Stanford Univ. Sch. Med. URL <http://surgpathcriteria.stanford.edu/> (accessed 11.1.14).
- Stapleton, A.R., Chan, V.T., 2009. Subtoxic chlorpyrifos treatment resulted in differential expression of genes implicated in neurological functions and development. *Arch. Toxicol.* 83, 319–333. doi:10.1007/s00204-008-0346-2
- Sternlicht, M.D., 2006. The cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast cancer Res.* 8, 201. doi:10.1186/bcr1368
- Sternlicht, M.D., Kouros-mehr, H., Lu, P., Werb, Z., 2006. Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis. *Differentiation* 74, 365–381. doi:10.1111/j.1432-0436.2006.00105.x
- Stirbu, I., Kunst, A.E., Vleems, F. a, Visser, O., Bos, V., Deville, W., Nijhuis, H.G.J., Coebergh, J.W., 2006. Cancer mortality rates among first and second generation migrants in the Netherlands: convergence toward the rates of the native dutch population. *Int. J. cancer* 119, 2665–2672. doi:10.1002/ijc.22200
- Stocco, C., Telleria, C., Gibori, G., 2007. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr. Rev.* 28, 117–149. doi:10.1210/er.2006-0022

- St-Pierre, J., Buckingham, J. a, Roebuck, S.J., Brand, M.D., 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.* 277, 44784–44790. doi:10.1074/jbc.M207217200
- Stumpf, W.E., Narbaitz, R., Sar, M., 1980. Estrogen receptors in the fetal mouse. *J. Steroid Biochem.* 12, 55–64.
- Subramaniam, S., Unsicker, K., 2010. ERK and cell death: ERK1/2 in neuronal death. *FEBS J.* 277, 22–29. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07367.x
- Tan, D.H., Peng, S.Q., Wu, Y.L., Wang, Y.M., Lu, C.F., Ding, W., Wang, Q.X., Yan, C.H., 2009. Chlorpyrifos induces delayed cytotoxicity after withdrawal in primary hippocampal neurons through extracellular signal-regulated kinase inhibition. *Biol. Pharm. Bull.* 32, 1649–1655.
- Tarhan, L., Tüzmen, M.N., 2000. Some properties of Cu,Zn-superoxide dismutase from sheep erythrocyte. *Turkish J. Chem.* 24, 109–116.
- Terracjini, B., Testa, M.C., 1970. Carcinogenicity of a single administration of N-Nitrosomethylurea: a comparison between new-born and 5-week-old mice and rats. *Br. J. Cancer* 24, 588–598.
- Tetsu, O., McCormick, F., 1999. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422–6. doi:10.1038/18884
- Tollefsen, K.-E., 2007. Binding of alkylphenols and alkylated non-phenolics to the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) plasma sex steroid-binding protein. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 68, 40–48. doi:10.1016/j.ecoenv.2006.07.002
- Torres, M., 2003. Mitogen-activated protein kinase pathways in redox signaling. *Front. Biosci.* 8, 369–391.
- Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M. a, Nilsa, R.-D.V., Huang, P., 2008. Redox regulation of cell survival. *Antioxid. Redox Signal.* 10, 1343–1374. doi:10.1089/ars.2007.1957
- U.S. National Academy of Sciences, 2011. Guide for the care and use of laboratory animals, Eighth. ed. U.S. National Academy of Sciences, Washington, D.C.
- Umosen, A.J., Ambali, S.F., Ayo, J.O., Mohammed, B., Uchendu, C., 2012. Alleviating effects of melatonin on oxidative changes in the testes and pituitary glands evoked by subacute chlorpyrifos administration in Wistar rats. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2, 645–650. doi:10.1016/S2221-1691(12)60113-0
- Umosen, A.J., Chidiebere, U., 2014. Effect of melatonin on chlorpyrifos-induced alterations in reproductive hormones and semen characteristics in Wistar rats. *Am. J. Phytomedicine Clin. Ther.* 2, 742–753.

- US Environmental Protection Agency, 2011a. Pesticides Industry Sales and Usage 2006 and 2007 Market Estimates. Washington D.C.
- US Environmental Protection Agency, 2011b. Chlorpyrifos: Preliminary human health risk assessment for registration. Review. Washington, D.C.
- Uzun, F.G., Kalender, Y., 2013. Chlorpyrifos induced hepatotoxic and hematologic changes in rats: the role of quercetin and catechin. *Food Chem. Toxicol.* 55, 549–556. doi:10.1016/j.fct.2013.01.056
- Vandenberg, L.N., 2014. Low-dose effects of hormones and endocrine disruptors., 1st ed, Vitamins and hormones. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-800095-3.00005-5
- Varea, O., Arevalo, M.-A., Garrido, J.J., Garcia-Segura, L.M., Wandosell, F., Mendez, P., 2010. Interaction of estrogen receptors with insulin-like growth factor-I and Wnt signaling in the nervous system. *Steroids* 75, 565–9. doi:10.1016/j.steroids.2009.09.006
- Vargo-Gogola, T., Rosen, J.M., 2007. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nat. Rev. Cancer* 7, 659–672. doi:10.1038/nrc2193
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-nakken, H., Reutelingsperger, C., 1995. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* 184, 39–51.
- Viniegra, M., Paolino, M., Arrossi, S., 2010. Cáncer de mama en Argentina: organización, cobertura y calidad de las acciones de prevención y control, Primera. ed, ... OPS/OMS Argentina. Organización Panamericana de la Salud, Buenos Aires.
- Visscher, D.W., Nassar, A., Degnim, A.C., Frost, M.H., Vierkant, R. a, Frank, R.D., Tarabishy, Y., Radisky, D.C., Hartmann, L.C., 2014. Sclerosing adenosis and risk of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 144, 205–212. doi:10.1007/s10549-014-2862-5
- Viswanath, G., Chatterjee, S., Dabral, S., Nanguneri, S.R., Divya, G., Roy, P., 2010. Anti-androgenic endocrine disrupting activities of chlorpyrifos and piperophos. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 120, 22–29. doi:10.1016/j.jsbmb.2010.02.032
- Walmer, D., Wrona, M., Hughes, C., Nelson, K., 1992. Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone. *Endocrinology* 131, 1458–1466.
- Wang, D., Gao, H., Bandyopadhyay, A., Wu, A., Yeh, I.-T., Chen, Y., Zou, Y., Huang, C., Walter, C.A., Dong, Q., Sun, L.-Z., 2014. Pubertal bisphenol A exposure alters murine mammary stem cell function leading to early neoplasia in regenerated glands. *Cancer Prev. Res.* 7, 445–455. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-13-0260
- Wang, J., Jenkins, S., Lamartiniere, C. a, 2014a. Cell proliferation and apoptosis in rat mammary glands following combinational exposure to bisphenol A and genistein. *BMC Cancer* 14, 379. doi:10.1186/1471-2407-14-379

- Wang, J., Wang, J., Zhu, L., Xie, H., Shao, B., Hou, X., 2014b. The enzyme toxicity and genotoxicity of chlorpyrifos and its toxic metabolite TCP to zebrafish *Danio rerio*. *Ecotoxicology* En prensa. doi:10.1007/s10646-014-1321-8
- Wang, L.-L., Liu, T., Wang, C., Zhao, F.-Q., Zhang, Z.-W., Yao, H.-D., Xing, H.-J., Xu, S.-W., 2013. Effects of atrazine and chlorpyrifos on the production of nitric oxide and expression of inducible nitric oxide synthase in the brain of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 93, 7–12. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.03.007
- Wang, S.-H., Shih, Y.-L., Kuo, T.-C., Ko, W.-C., Shih, C.-M., 2009. Cadmium toxicity toward autophagy through ROS-activated GSK-3 β in mesangial cells. *Toxicol. Sci.* 108, 124–131. doi:10.1093/toxsci/kfn266
- Ward, R.D., Weigel, N.L., 2010. Steroid Receptor Phosphorylation: Assigning Function to Site-Specific Phosphorylation. *BioFactors* 35, 528–536. doi:10.1002/biof.66.Steroid
- Waring, R.H., Ayers, S., Gescher, A.J., Glatt, H.-R., Meinel, W., Jarratt, P., Kirk, C.J., Pettitt, T., Rea, D., Harris, R.M., 2008. Phytoestrogens and xenoestrogens: the contribution of diet and environment to endocrine disruption. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 108, 213–220. doi:10.1016/j.jsbmb.2007.09.007
- Warner, M., Eskenazi, B., Mocarelli, P., Gerthoux, P.M., Samuels, S., Needham, L., Patterson, D., Brambilla, P., 2002. Serum Dioxin Concentrations and Breast Cancer Risk in the Seveso Women's Health Study. *Environ. Health Perspect.* 110, 625–628. doi:10.1289/ehp.02110625
- Watts, M., 2012. Chlorpyrifos as a possible global POP. *Pestic. Action Netw. North Am.* 1–34.
- Weinberg, R.A., 2014. pRb and control of the cell cycle clock, in: *The Biology of Cancer*. Garland Science, Teylos and Francis Group, New York, pp. 277–329.
- Weis, K.E., Ekena, K., Thomas, J. a, Lazennec, G., Katzenellenbogen, B.S., 1996. Constitutively active human estrogen receptors containing amino acid substitutions for tyrosine 537 in the receptor protein. *Mol. Endocrinol.* 10, 1388–1398. doi:10.1210/mend.10.11.8923465
- White, P.J., Charbonneau, A., Cooney, G.J., Marette, A., 2010. Nitrosative modifications of protein and lipid signaling molecules by reactive nitrogen species. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 299, E868–E878. doi:10.1152/ajpendo.00510.2010
- White, R., Sjöberg, M., Kalkhoven, E., Parker, M.G., 1997. Ligand-independent activation of the oestrogen receptor by mutation of a conserved tyrosine. *EMBO J.* 16, 1427–1435. doi:10.1093/emboj/16.6.1427
- Woodruff, T.J., Zota, A.R., Schwartz, J.M., 2011. Environmental chemicals in pregnant women in the United States: NHANES 2003-2004. *Environ. Health Perspect.* 119, 878–885. doi:10.1289/ehp.1002727

- World Health Organization, 2009a. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2009.
- World Health Organization, 2009b. WHO specifications and evaluations for public health pesticides. Chlorpyrifos.
- World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004. Manual sobre elaboración y empleo de las especificaciones de la FAO y de la OMS para plaguicidas. Roma.
- World Health Organization and Pan American Health Organization, 2013. Cancer in the Americas. Country profiles 2013. Washington D.C.
- Wu, W.-S., 2006. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 25, 695–705. doi:10.1007/s10555-006-9037-8
- Yavari, P., Hislop, T.G., Bajdik, C., Sadjadi, A., Nouraie, M., Babai, M., Malekzadeh, R., 2006. Comparison of cancer incidence in Iran and Iranian immigrants to British Columbia, Canada. *Asian Pacific J. cancer Prev.* 7, 86–90.
- Ye, L., Guo, J., Ge, R.-S., 2014. Environmental pollutants and hydroxysteroid dehydrogenases., 1st ed, Vitamins and hormones. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-800095-3.00013-4
- Yıldırım, E., Baydan, E., Kanbur, M., Kul, O., Cınar, M., Ekici, H., Atmaca, N., 2013. The effect of chlorpyrifos on isolated thoracic aorta in rats. *Biomed Res. Int.* 2013, 376051. doi:10.1155/2013/376051
- Yoon, S.O., Yun, C.H., Chung, A.S., 2002. Dose effect of oxidative stress on signal transduction in aging. *Mech. Ageing Dev.* 123, 1597–1604.
- Yost, C., Torres, M., Miller, J.R., Huang, E., Kimelman, D., Moon, R.T., 1996. The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev.* 10, 1443–1454. doi:10.1101/gad.10.12.1443
- Yudt, M.R., Vorojeikina, D., Zhong, L., Skafar, D.F., Sasson, S., Gasiewicz, T.A., Notides, A.C., 1999. Function of estrogen receptor tyrosine 537 in hormone binding, DNA binding, and transactivation. *Biochemistry* 38, 14146–14156.
- Yuspa, S.H., 1994. The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis -- thirty-third G . H . A . Clowes memorial award lecture. *Cancer Res.* 54, 1178–1189.
- Zhang, L., Huang, G., Li, X., Zhang, Y., Jiang, Y., Shen, J., Liu, J., Wang, Q., Zhu, J., Feng, X., Dong, J., Qian, C., 2013. Hypoxia induces epithelial-mesenchymal transition via activation of SNAIL by hypoxia-inducible factor -1 in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 13, 108. doi:10.1186/1471-2407-13-108

- Zheng, A., Kallio, A., Härkönen, P., 2007. Tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells is mediated via extracellularly signal-regulated kinase signaling and can be abrogated by estrogen. *Endocrinology* 148, 2764–2777. doi:10.1210/en.2006-1269
- Zhong, L., Skafar, D.F., 2002. Mutations of tyrosine 537 in the human estrogen receptor-alpha selectively alter the receptor's affinity for estradiol and the kinetics of the interaction. *Biochemistry* 41, 4209–17.
- Ziech, D., Franco, R., Georgakilas, A.G., Georgakila, S., Malamou-Mitsi, V., Schoneveld, O., Pappa, A., Panayiotidis, M.I., 2010. The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. *Chem. Biol. Interact.* 188, 334–339. doi:10.1016/j.cbi.2010.07.010

Abreviaturas

A

AChE	Acetilcolinesterasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF-1	Dominio de activación independiente de ligando del RE
ALAT	Alanina aminotransferasa
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANMAT	Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
ANOVA	Análisis de la varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ASAT	Aspartato aminotransferasa
ATCC	<i>del inglés: <u>A</u>merican <u>T</u>ype <u>C</u>ulture <u>C</u>ollection</i>

B

BChE	Butirilcolinesterasa
BMD ₁₀	Dosis estimada que resulta en una modificación del 10 % en la actividad AChE eritrositaria
BMDL ₁₀	Límite inferior del intervalo de confianza del 95 % para el valor de la BMD ₁₀
BPA	Bifenol A
BRCA1	<i>del inglés: <u>B</u>reast <u>C</u>ancer 1</i>
BRCA2	<i>del inglés: <u>B</u>reast <u>C</u>ancer 2</i>
BrdU	5-bromo-2'-deoxiuridina
BSA	Seroalbúmina bobina

C

°C	Grado Celsius
CAT	Catalasa
CBG	Globulina transportadora de cortisol, <i>del inglés: <u>C</u>ortisol <u>B</u>inding <u>G</u>lobulin</i>
Cdks	Quinasas dependientes de ciclinas, <i>del inglés: <u>C</u>yclin-<u>D</u>ependent <u>K</u>inase</i>
CE	Carboxilesterasas
CI	Carcinoma invasivo
CIS	Carcinoma <i>in situ</i>
cPAD	Dosis poblacional ajustada por exposiciones crónicas
CPF	Clorpirifos
CPFO	Clorpirifos oxón

CSCs	Células madre del cáncer, <i>del inglés: <u>C</u>ancer <u>S</u>tem <u>C</u>ells</i>
c-Src	Proteína co-activadora de los receptores de hormonas esteroideas, <i>del inglés: <u>S</u>teroid <u>R</u>eceptor <u>C</u>o-activators</i>
CuZn SOD	Isoforma citosólica de la enzima SOD
CYP	Familia del citocromo P450
CYP11A	Citocromo P450 11A
CYP19A1	Citocromo P450 19A1, Aromatasa
CYP2B6	Citocromo P450 2B6

D

DAB	3-3'-Diaminobenzidina
DAF-2DA	Diacetato de 4,5-diamino-fluoresceína
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol
DCF-2DA	Diacetato de diclorodihidrofluoresceína
DDT	Diclorodifeniltriclorohexano
DE	Disruptores endócrinos
DE	Desvío estándar
DEA	Dietanolamina
DHEA	Dehidroepiandrosterona
dl	Decilitro
DL ₅₀	Dosis letal media
DMPO	5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
dpc	Días posteriores al coito
dpp	Días posteriores al parto
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-nitrobenzoico
DTT	DL-ditiotreitol

E

E ₂	Estradiol
EC SOD	Isoforma extracelular de la enzima SOD
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EEM	Error estándar de la media
EE.UU.	Estados Unidos

EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, <i>del inglés: <u>E</u>uropean <u>F</u>ood <u>S</u>afety <u>A</u>uthority</i>
EPR	Resonancia paramagnética electrónica, <i>del inglés: <u>E</u>lectron <u>P</u>aramagnetic <u>R</u>esonance</i>
ERE	Elemento de respuesta a estrógenos
ERK1/2	Quinasas reguladas por señales extracelulares, <i>del inglés: <u>E</u>xtracellular signal <u>R</u>egulated <u>K</u>inases</i>
ERN	Especies reactivas del nitrógeno
ERO	Especies reactivas del oxígeno
ERP	Elemento de respuesta a progesterona
EtOH	Etanol

F

FDA	Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos, <i>del inglés: <u>F</u>ood and <u>D</u>rug <u>A</u>dmistration</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína, <i>del inglés: <u>F</u>luorescein <u>I</u>sothiocyante</i>
FSH	Hormona folículo estimulante

G

g	Gramo
g	Aceleración de la gravedad
GH	Hormona de crecimiento, <i>del inglés: <u>G</u>rowth <u>H</u>ormone</i>
GHz	Giga hertz
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas, <i>del inglés: <u>G</u>onadotropin <u>R</u>eleasing <u>H</u>ormone</i>
GPR30	Receptor de estógeno acoplado a proteína G
GPX	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
Gsk-3	Glicógeno sintasa quinasa 3
GSSG	Glutación oxidado
GST	glutación-S-transferasa

H

HCB	Hexaclorobenzeno
HCH	Hexaclorociclohexano
HDA	Hiperplasia ductal atípica
HE	Hematoxilina-eosina
HER2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico 2, <i>del inglés: <u>H</u>uman <u>E</u>pidermal <u>G</u>rowth <u>F</u>actor <u>R</u>eceptor 2</i>
HO·	Radical hidroxilo
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno

I

IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, <i>del Inglés: <u>I</u>nternational <u>A</u>gency of <u>R</u>esearch on <u>C</u>ancer</i>
IBYME	Instituto de Biología y Medicina Experimental
ICI	ICI 182,780
IDA	Ingesta diaria admisible
IFCC	Federación Internacional de Química Clínica y Medicina de Laboratorio, <i>del inglés: <u>I</u>nternational <u>F</u>ederation of <u>C</u>linical <u>C</u>hemistry <u>L</u>aboratory <u>M</u>edicine</i>
IGF-I	Factor de crecimiento insulínico tipo I, <i>del inglés: <u>I</u>nsulin <u>G</u>rowth <u>F</u>actor <u>I</u></i>
IGF-IR	Receptor del factor de crecimiento insulínico tipo I
IgG	Inmunoglobulina G
INK4	Inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas
i.p.	Vía de administración intraperitoneal
IP	Ioduro de propidio
IT	Incidencia tumoral

J

JNK	c-Jun N-terminal
-----	------------------

K

KDa	Kilodalton
Kg	Kilogramo

L

L	Litro
LH	Hormona luteinizante
LOB	Estructuras alveolares
LO [·]	Radical alcoxilo
LOO [·]	Radical peroxilo

M

M	Molar
mA	Miliamper
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos, <i>del inglés: <u>Mitogen Activated Protein Kinases</u></i>
MDA	Malondialdehído
MEK1	Quinasa regulada por señales mitogénicas extracelulares 1, <i>del inglés: <u>Mitogen Extracellular signal-regulated Kinase 1</u></i>
MET	Metástasis
mg	Miligramo
MG	Media geométrica
ml	Militro
mm	Milimetro
mM	Milimolar
Mn SOD	Isoforma mitocondrial de la enzima SOD
ms	Milisegundo
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
mW	Mili watt

N

N	Concentración normal
NAC	N-acetil-cisteína
NADH	Dinucleótido de adenina y nicotinamida, <i>del inglés: <u>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</u></i>
NADPH	Dinucleótido de adinina y nicotinamida, <i>del inglés: <u>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</u></i>
ng	Nanogramo
NIH	Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos, <i>del inglés: <u>National Institutes of Health</u></i>

nm	Nanómetros
nM	Nanomolar
NMU	N-nitroso-N-metilurea
NO	Óxido nítrico
NOAEL	Nivel al cual no se observan efectos adversos, <i>del inglés: <u>No</u> <u>Observed</u> <u>Adverse</u> <u>Effect</u> <u>Level</u></i>
NOS	Óxido nítrico sintasa
ns	No significativo

O

O ₂	Oxígeno
O ₂ ^{•-}	Anión superóxido
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONOO ⁻	Peroxinitrito
OP	Organofosforado

P

p	significancia estadística
PBS	Solución amortiguadora de fosfato de sodio
PBS-T	Solución amortiguadora fosfato de sodio con Tween 20 0,05 %
PCB	Bifenilo policlorado
PCNA	Antígeno nuclear de células proliferantes, <i>del inglés: <u>P</u>roliferating <u>C</u>ell <u>N</u>uclear <u>A</u>ntigen</i>
p-ERK1/2	Proteína ERK1/2 fosforilada
pg	Picogramo
Pg	Progesterona
p-Gsk-3	Gsk-3 fosforilada en su serina 9
PI3K	Fosfoinositol-3 quinasa
PKC	proteína quinasa C
PL	Período de latencia tumoral
PON1	Paraoxonasa 1
ppb	Partes por billón
p-RE	Receptor de estrógeno alfa fosforilado en su tirosina 537
PSA	Persulfato de amonio
p/v	Peso en volumen

PVDF Fluoruro de polivinilideno

R

RA Receptor de andrógenos
 RE Receptor de estrógeno
 RE Receptor de estrógeno alfa
 RE Receptor de estrógeno beta
 REL Retículo endoplasmático liso
 RE_n Retículo endoplasmático
 RI Receptor de insulina
 RPg Receptor de progesterona
 RPg-A Isoforma A del receptor de progesterona
 RPg-B Isoforma B del receptor de progesterona
 RPrl Receptor de prolactina

S

SDS Dodecil sulfato de sodio
 SDS-PAGE Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
 SFB Suero fetal bobino
 -SH Grupo tiol
 SHBG Globulina transportadora de hormonas sexuales, *del inglés: Steroid
Hormone Binding Globulin*
 SOD Superóxido dismutasa
 StAR Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda, *del inglés: Steroidogenic
Acute Regulatory protein*

T

T Testosterona
 TBARS Sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico, *del inglés: Thiobarbituric Acid
Reactive Substances*
 TCPY 3,5,6-tricloro-2-piridinol
 TEA Trietanolamina
 TEB Brotes terminales, *del inglés: Terminal End Bud*
 TEMED N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
 T-RE Receptor de estrógeno alfa total

U

U	Unidad
USEPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, <i>del inglés: <u>U</u>nited <u>S</u>tates <u>E</u>nvironmental <u>P</u>rotection <u>A</u>gency</i>

V

v.o.	Vía de administración oral
v/v	Volumen en volumen

W

WAF/KIP	WAF/proteínas inhibidoras de quinasas
---------	---------------------------------------

Coeficiente de extinción

ex	Longitud de onda de excitación
em	Longitud de onda de emisión

μ

μg	Microgramo
μl	Microlitro
μmol	Micromol

3 -HSD	3 -hidroxiesteroide deshidrogenasa
15d-PGJ ₂	15-deoxi- ^{12,14} -prostaglandina J ₂
17 -HSD	17 -hidroxiesteroide deshidrogenasa