



Universidad Nacional del Comahue - Centro Regional Universitario Bariloche

**REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL METABOLISMO DE
POLIAMINAS Y EL SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE EN
EMBRIONES DE *RHINELLA ARENARUM* COMO BIOMARCADOR
MOLECULAR DE LA EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS
ORGANOFOSFORADOS**

Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctora en Biología

Licenciada Natalia Susana Pires

Director: Doctor Andrés Venturino

Codirectora: Doctora Cecilia Inés Lascano

Año: 2019

Resumen

La zona del Alto Valle de Río Negro y Neuquén nuclea el 90% de la producción de peras y manzanas de Argentina. Las labores culturales conllevan la utilización a gran escala de diversos plaguicidas, siendo los organofosforados metilazinfos y clorpirifós los más utilizados en la última década. Sus residuos, además, han sido detectados tanto en suelo como en agua de la región, afectando a los organismos autóctonos como el sapo común *Rhinella arenarum*, el cual se reproduce y desarrolla en el agua durante la época de aplicación. Por presentar un desarrollo embrionario y larval acuático, un estilo de vida adulto semiacuático, una piel húmeda y sensible y huevos desprotegidos, los anfibios son considerados buenos indicadores biológicos de la salud del medio acuático.

Los antecedentes de nuestro grupo de trabajo han demostrado el impacto de los plaguicidas organofosforados sobre el desarrollo de *R. arenarum*, sus enzimas blanco y detoxificantes, estrés oxidativo y la vía de las poliaminas. Las poliaminas son policationes alifáticas de gran importancia en procesos de desarrollo y crecimiento, y pueden interactuar con diferentes macromoléculas. Sus niveles están finamente regulados por procesos de biosíntesis, de degradación oxidativa y de transporte. En su biosíntesis participan las enzimas ornitina decarboxilasa, S-adenosilmetionina decarboxilasa, espermidina sintasa y espermina sintasa. En su degradación e interconversión oxidativa participan las enzimas espermina oxidasa, espermidina/espermina N¹-acetiltransferasa, acetilpoliamino-oxidasa y diamino oxidasa, las cuales fueron objeto de estudio en esta tesis tanto a nivel de actividad como de expresión. Las reacciones de degradación oxidativa, además, generan especies reactivas del oxígeno y aldehídos reactivos que pueden impactar sobre el sistema de defensa antioxidante. Por lo tanto, el objetivo principal de esta tesis consistió en la búsqueda y desarrollo de herramientas moleculares para analizar la expresión de genes involucrados en los procesos mencionados y su regulación mediante factores de transcripción.

Para ello, se realizaron exposiciones crónicas y agudas a los plaguicidas organofosforados metilazinfos y clorpirifós. Las exposiciones crónicas se realizaron con embriones desde fertilización hasta completar el desarrollo embrionario. En ellos se evaluaron las actividades de las enzimas degradativas de poliaminas en tres estadios embrionarios, mediante espectrofluorimetría. Los tres

estadios se corresponden al desarrollo temprano (estadio de brote caudal), intermedio (estadio de boca abierta) y tardío (estadio de opérculo completo) de *R. arenarum*. Las exposiciones agudas se llevaron a cabo con larvas de 10 días, para analizar la expresión de genes de interés mediante RT-qPCR. No fueron viables los estudios de expresión génica en embriones, debido a la alta variabilidad propia de un organismo en pleno desarrollo.

Se pudo observar un incremento de las actividades de diamino oxidasa y acetilpoliamino oxidasa en embriones del estadio temprano, lo que sugiere su utilidad como biomarcadores frente a la exposición de metilazinfos y clorpirifós, respectivamente. Además, se podría decir que estas actividades enzimáticas cumplirían una función protectora frente a los plaguicidas organofosforados. El efecto de ambos plaguicidas sobre la actividad de espermina oxidasa fue evidente en embriones intermedios, y el efecto fue completamente opuesto entre ellos. Se observó un aumento significativo en las concentraciones de putrescina y espermina en embriones intermedios expuestos a metilazinfos, mientras que la exposición a clorpirifós no alteró los niveles de las poliaminas. A través de un análisis de componentes principales, fue posible inferir que los embriones expuestos a metilazinfos presentaban una respuesta proliferativa en estadios tempranos, mientras que los embriones expuestos a clorpirifós presentaban una situación de estrés oxidativo. Mientras que, en estadios tardíos de desarrollo, los embriones expuestos a metilazinfos y clorpirifós mostraron una situación de estrés oxidativo y una alteración del estado proliferativo.

Dentro de los estudios moleculares, la tecnología de RNA-Seq es una herramienta altamente sensible y precisa. Esta herramienta permite secuenciar el ARN para medir la expresión génica a través del transcriptoma, en un proceso relativamente accesible desde el punto de vista económico. Resulta ser una tecnología adecuada para organismos no modelo, cuya información genómica no se encuentre disponible como en el caso de *R. arenarum*. Por lo tanto, el análisis del transcriptoma permitió el avance en los estudios moleculares, analizando la expresión diferencial y diseñando cebadores específicos de la especie para cuantificar la expresión génica por qPCR.

Del análisis de la expresión diferencial a partir del transcriptoma de larvas de 10 días, se analizaron posibles genes de referencia y se estableció que los de menor

variación son Tubulina A1, B1, B2 y B4B; actina B; gliceraldehído-3-P-deshidrogenasa; L8; y el factor de elongación-1 EF1A0 y EF1AG. A nivel de enzimas blanco, se determinó que la expresión de acetilcolinesterasa aumenta en larvas expuestas a plaguicidas organofosforados, al igual que el factor de transcripción c-FOS, el cual regularía su inducción. En cuanto a ornitina decarboxilasa 1A, su expresión disminuyó a las 6 h pero aumentó a las 24 h de exposición a ambos plaguicidas. La expresión de S-adenosilmetionina decarboxilasa aumentó en las larvas expuestas a ambos plaguicidas, lo que podría atribuirse a la necesidad de activar el mecanismo de apoptosis para eliminar daño celular. También estaría relacionada al aumento de la expresión del factor de transcripción eIF5A, que es activado por espermidina y participa en el fenómeno de apoptosis. En cuanto al metabolismo oxidativo de las poliaminas, la expresión de acetilpoliamino oxidasa se incrementó en larvas expuestas a plaguicidas organofosforados, mientras que la expresión de espermidina/espermina N¹-acetiltransferasa disminuyó. Espermina oxidasa mostró un ligero aumento de la expresión en larvas expuestas a clorpirifós. Finalmente, el tratamiento con plaguicidas organofosforados afectó negativamente la expresión de diamino oxidasa. Dentro de los genes analizados para las enzimas de estrés oxidativo y respuesta antioxidante, sólo se observó una inducción significativa de glutatión peroxidasa 3. El análisis de las respuestas a nivel de transcritos de las enzimas involucradas en el metabolismo de poliaminas sugiere que la disminución de espermidina/espermina N¹-acetil transferasa podría estar relacionada al aumento en la expresión de espermina oxidasa, generando como consecuencia que la cantidad de espermina disponible para ser acetilada esté disminuida. Esto coincidiría con los niveles elevados de S-adenosilmetionina decarboxilasa. Finalmente, los niveles de expresión disminuidos de diamino oxidasa en las muestras expuestas a plaguicidas organofosforados sugieren que la cantidad de putrescina disponible para ser degradada también se encuentra disminuida, indicando que se podría estar generando espermidina como protección frente a la exposición a plaguicidas.

Asimismo, a partir del transcriptoma se pudieron obtener secuencias específicas y diseñar cebadores para los genes de: catalasa, S-adenosilmetionina decarboxilasa, glutatión S-transferasa-pi, glutatión reductasa, ornitina

decarboxilasa, acetilpoliamino oxidasa, diamino oxidasa, espermina oxidasa, c-FOS, c-JUN, NRF2, superóxido dismutasa, espermidina sintasa y JNK. Se pudieron amplificar 10 de los pares de cebadores diseñados, y se corroboraron 6 de las secuencias amplificadas (beta-actina, acetilpoliamino oxidasa, diamino oxidasa, c-FOS, c-JUN y ornitina decarboxilasa). Sin embargo, los intentos por estandarizar los cebadores de c-FOS, ornitina decarboxilasa, espermina oxidasa, espermidina sintasa y diamino oxidasa no fueron positivos, ya que estos genes demostraron niveles de transcripción muy bajos en las muestras de larvas de *R. arenarum*. Sí fue posible analizar la expresión de beta-actina, S-adenosilmetionina decarboxilasa y superóxido dismutasa en exposiciones agudas a 0,5 mg L⁻¹ clorpirifós, los cuales tienden a aumentar su expresión a las 12 h de exposición para luego disminuir a las 24 h. En las muestras expuestas a 1 mg L⁻¹ de clorpirifós, se puede ver una tendencia al aumento continuo en la expresión de beta-actina y S-adenosilmetionina decarboxilasa, mientras que superóxido dismutasa permanece sin cambios.

En resumen, determinamos mediante minería de datos que las exposiciones a metilazinfos y clorpirifós generan alteraciones en el metabolismo de poliaminas, en ciertos factores de transcripción y en enzimas blanco, como acetilcolinesterasa. A nivel transcriptómico se puede ver que la exposición a plaguicidas organofosforados induce la expresión de ornitina decarboxilasa, espermina oxidasa, S-adenosilmetionina decarboxilasa y el factor de transcripción eEIF5A, mientras que espermidina/espermina N¹-acetiltransferasa y diamino oxidasa disminuyen su expresión. La inducción de ornitina decarboxilasa, espermina oxidasa y S-adenosilmetionina decarboxilasa podría deberse a la necesidad de sintetizar espermidina, la cual induce la expresión del factor de transcripción eEIF5A. Por otra parte, la vía de degradación de las poliaminas genera especies reactivas del oxígeno, al igual que la exposición a plaguicidas organofosforados. Estas especies reactivas de oxígeno inducen, a su vez, la expresión del factor de transcripción c-FOS, el cual también produciría un aumento de la expresión de acetilcolinesterasa.

Summary

The region of Alto Valle of Rio Negro and Neuquén concentrates 90% of the production of pears and apples in Argentina. The main pesticides used over the last decade have been azinphos-methyl and chlorpyrifos. Their residues have been detected in both soil and water of this region. Therefore, they could affect native organisms such as the common toad, *Rhinella arenarum*, which reproduces and develops during the productive season. Amphibians are considered good bioindicators of environmental health due to certain characteristics, such as aquatic embryonic and larval lifestyle, semi-aquatic adult lifestyle, moist and sensitive skin and external eggs.

Previous studies performed in the group have demonstrated the impact of organophosphorus pesticides on development, target enzymes, antioxidant defense system, oxidative stress and polyamine metabolism. Polyamines are aliphatic polycations key to developmental and growth processes, which are capable of interacting with macromolecules. Their levels are precisely tuned through synthesis, degradation and transport. The enzymes that participate in polyamine synthesis are ornithine decarboxylase, S-adenosylmethionine decarboxylase, spermidine synthase and spermine synthase. The enzymes spermine oxidase, spermidine/spermine N¹-acetyltransferase, acetylpolyamine oxidase and diamine oxidase, which participate in polyamine oxidative degradation and interconversion, were analyzed in this thesis at biochemical and molecular levels. The oxidative degradation of polyamines generates reactive oxygen species and reactive aldehydes which impact the antioxidant defense system. Therefore, the main objective of this thesis was to seek and develop molecular tools to analyze the expression of genes involved in the aforementioned processes as well as their regulation by transcription factors.

Hence, chronic exposures to azinphos-methyl and chlorpyrifos were performed in *R. arenarum* embryos from fertilization to complete embryonic development, and the activity of polyamine degradation enzymes and polyamine levels were assessed. The embryonic stages used correspond to early, intermediate and late development, named tail-bud, open mouth and complete operculum, respectively. Besides, acute exposures to chlorpyrifos were performed in 10-days old tadpoles, with the objective of analyzing gene expression of target

genes through RT-qPCR. Genetic expression in embryonic stages could not be assessed due to the high variability of the developing organisms.

The increased activities of diamine oxidase and acetylpolyamine oxidase observed in early embryos suggest their use as biomarkers of exposure to azinphos-methyl and chlorpyrifos, respectively. Also, a protective role towards the toxicity of the insecticides could be attributed to these enzymes. Spermine oxidase activity was altered in intermediate embryos and the effect of pesticides was opposed between them. A significant increase in putrescine and spermine levels was observed in intermediate embryos exposed to azinphos-methyl, while polyamine levels were not altered in embryos exposed to chlorpyrifos. Through principal component analysis, it was inferred that early embryos exposed to azinphos-methyl displayed a proliferative response, while early embryos exposed to chlorpyrifos suffered from an oxidative stress situation. In late developmental stages, embryos exposed to both insecticides displayed oxidative stress and an altered proliferative status.

RNA-Seq technology is a sensitive and precise tool that allows the sequencing of RNA to determine genetic expression through the transcriptome, in an affordable and convenient way for non-model organisms such as *R. arenarum*. The analysis of *R. arenarum*'s transcriptome allowed for the progress of molecular studies by means of differential expression analysis and species-specific primer design that would allow the quantification of gene expression through qPCR.

Through differential expression analysis of data from the transcriptome, possible housekeeping genes were analyzed and it was determined that the ones that displayed the least variation were Tubulin A1, B1, B2 and B4B; actin B; glyceraldehyde-3P-dehydrogenase; RL8 (L8); and the elongation factor-1 EF1A0 and EF1D. Also through differential expression analysis, it was determined that acetylcholinesterase and c-FOS gene expression were increased in larvae exposed to both organophosphorus pesticides. The transcription factor c-FOS would be involved in the increase of acetylcholinesterase gene expression. Ornithine decarboxylase 1A expression decreased after 6h and increased after 24 h of exposure of larvae to azinphos-methyl and chlorpyrifos. S-adenosylmethionine decarboxylase expression increased in larvae exposed to these insecticides, which could be attributed to the need of eliminating cellular damage through apoptosis.

The genetic response of S-adenosylmethionine decarboxylase could also be related to the increased expression of the transcription factor eIF5A, which is activated by spermidine and takes part in the apoptotic process. Regarding the oxidative metabolism of polyamines, acetylpolyamine oxidase expression was increased in larvae exposed to both pesticides, while expression of spermidine/spermine N¹-acetyltransferase was decreased. Spermine oxidase was slightly increased in larvae exposed to chlorpyrifos, while expression of diamine oxidase was decreased in larvae exposed to both pesticides. Regarding the expression of genes involved in oxidative stress and antioxidant responses, a significant induction of glutathione peroxidase 3 was observed. Expression analysis of enzymes involved in polyamine metabolism suggests that the decrease of spermidine/spermine N¹-acetyltransferase expression could be related to the increase of spermine oxidase expression, with the subsequent decrease of the levels of its substrate. This situation is coincident with the increased expression of S-adenosylmethionine decarboxylase. Finally, the decreased expression of diamine oxidase suggests that the quantity of putrescine available for final degradation would also be decreased, and therefore the need of greater levels of the protective polyamine spermidine could be achieved.

Similarly, specific transcriptomic sequences were obtained and, therefore, specific primers were designed for amplification of catalase, S-adenosylmethionine decarboxylase, glutathione S-transferase pi, glutathione reductase, ornithine decarboxylase, acetylpolyamine oxidase, diamine oxidase, spermine oxidase, c-FOS, c-JUN, NRF2, superoxide dismutase, spermidine synthase and JNK. Ten of these primers allowed for amplification, and six of the sequences obtained were corroborated: beta-actin, acetylpolyamine oxidase, diamine oxidase, c-FOS, c-JUN and ornithine decarboxylase. Nevertheless, the attempts of standardization of primers for c-FOS, ornithine decarboxylase, spermine oxidase, spermidine synthase and diamine oxidase were not successful, as these genes were expressed at very low levels in larvae of *R. arenarum*. The expression of beta-actin, S-adenosylmethionine decarboxylase and superoxide dismutase was analyzed in larvae acutely exposed to 0.5 mg L⁻¹ chlorpyrifos: their expression was increased after 12 h of exposure and later decreased after 24 h of exposure. Larvae exposed to 1 mg L⁻¹ chlorpyrifos showed a continuous trend towards the

increase of beta-actin and S-adenosylmethionine decarboxylase expression, while superoxide dismutase expression remained unchanged.

In summary, through data mining of transcriptomic data, it was established that exposure to azinphos-methyl and chlorpyrifos altered polyamine metabolism, transcription factors and target enzymes such as acetylcholinesterase. At the transcriptomic level, exposure to organophosphorus pesticides induced the expression of ornithine decarboxylase, spermine oxidase, S-adenosylmethionine decarboxylase and the transcription factor eIF5A, while the expression of spermidine/spermine N¹-acetyltransferase expression and diamine oxidase was decreased. These responses could account for the need of increased levels of spermidine, which would induce the expression of the transcription factor eIF5A. Considering that polyamine oxidative degradation and exposure to organophosphorus pesticides increase the levels of reactive oxygen species, these would, in turn, induce the expression of the transcription factor c-FOS that would increase the expression of the acetylcholinesterase gene.

Agradecimientos

A mi director, Andrés Venturino, por haber confiado en mis capacidades y darme la posibilidad de realizar el doctorado dentro de su grupo de trabajo.
A Ceci Lascano, por haber accedido a ser mi co-directora, por las incontables charlas, los consejos y el apoyo constante.

A Danilo, por haberme permitido utilizar información importante para el desarrollo de esta tesis.

A Julia, Ceci, Naza y Cris por el aguante, los consejos, las charlas y el apoyo, sobre todo en los momentos difíciles de la tesis.

A Sole, Coki, Sebas, Enrique, Mariana, Josefina, Betsy, Vicky y Laura por los momentos compartidos en el laboratorio y fuera de él, y porque de una forma u otra, siempre estuvieron para ayudarme.

A Vir y Fla, porque fueron mis primeras amigas en el Valle y porque siempre han estado, a pesar de las distancias, para compartir trabajo, paseos, anécdotas y contenerme en muchas situaciones.

A Male, por dejarme disponer de su casa y porque en este último año ha estado para ayudarme en momentos muy importantes.

A las Marías, porque siempre están, sin importar como, cuando o donde, conteniéndome en todos escenarios de mi vida.

A Flor y Andrea, porque en *Hanami* hemos encontrado un nicho de contención y amor para todos.

A Prisci y Dani, porque son los mejores hermanos que podría tener, por todo su amor y porque, a pesar de los kilómetros, siempre están presentes.

A mi mamá y mi papá, porque sin uds no sería quien soy. Porque siempre han confiado en mí y nunca dejaron de hacer lo imposible para estar.

A Lu y Leo, porque con su paciencia y amor, no podría haber realizado este trabajo.

A mi esposo, Alejandro, porque es mi sostén y mi cable a tierra, por seguirme en mis locuras, por ayudarme a crecer y mejorar continuamente, por todo el amor que me da.

A la universidad Nacional del Comahue, a CONICET y a FONCyT, por haberme brindado los medios para realizar este Doctorado

A todos los que de una u otra forma ayudaron...infinitamente...¡GRACIAS!

"La mayor gloria no es no caer nunca, sino levantarse siempre"

Nelson Mandela

A Alejandro, Lu y Leo, con su luz hacen que todo sea posible.

Índice de Contenidos

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Plaguicidas y el ambiente.....	2
1.1.1	Situación del Alto Valle de Río Negro y Neuquén	2
1.2	Plaguicidas.....	3
1.2.1	Insecticidas.....	5
1.2.1.2	Insecticidas organofosforados.....	6
1.2.1.3	Metilazinfos	7
1.2.1.4	Clorpirifós	9
1.2.2	Biotransformación de insecticidas organofosforados	10
1.3	Poliaminas.....	11
1.3.1	Putrescina (Put).....	12
1.3.2	Espermidina (Spd).....	12
1.3.3	Espermina (Spm).....	13
1.3.4	Biosíntesis	14
1.3.5	Vía de interconversión y degradación	15
1.3.6	Regulación metabólica de los niveles de poliaminas.....	17
1.3.7	Poliaminas y proliferación celular	19
1.3.7	Poliaminas y estrés oxidativo	21
1.3.7.1	Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante	21
1.3.7.2	Relación entre poliaminas y estrés oxidativo.....	23
1.4	Organismos modelo vs organismos no-modelo	24
1.4.1	RNA-seq en organismos no-modelo.....	26
1.4.2.1	Estadios embrionarios	28
1.4.3.1	Biomarcadores	31
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	34
2.1	HIPÓTESIS	35
2.2	Objetivos	35
2.2.1	Objetivo general	35

	Índice
2.2.2 Objetivos específicos.....	35
3. METODOLOGÍA DE TRABAJO	36
3.1 Materiales.....	37
3.1.1 Material biológico	37
3.1.2 Material químico	38
3.2 Métodos.....	38
3.2.2 Preparación y control de soluciones estándar de metilazinfos y clorpirifós	39
3.2.3 Exposición a plaguicidas organofosforados	39
3.2.3.1 Exposiciones crónicas con embriones:.....	40
3.2.3.2 Exposiciones agudas con larvas:	40
3.2.4 Toma de muestras y almacenamiento.....	41
3.2.5 Estudios bioquímicos.....	42
3.2.5.1 Estudios del metabolismo de poliaminas:.....	42
3.2.5.2 Niveles de poliaminas libres y conjugadas	43
3.2.6 Estudios moleculares	44
3.2.6.2 Depuración de secuencias anotadas en el transcriptoma mediante herramientas bioinformáticas	44
3.2.6.3 Diseño de cebadores específicos.....	46
3.2.6.4 Extracción de ARN total	47
3.2.6.5 Verificación de la integridad del ARN purificado.....	48
3.2.6.6 Retrotranscripción a ADNc (ADN copia).....	49
3.2.6.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	49
3.2.6.8 Verificación del transcriptoma mediante secuenciación	50
3.2.6.9 Cuantificación de los niveles de expresión de los genes de interés por RT-qPCR	50
3.2.6.9.1 Diseño de cebadores específicos.....	50
3.2.6.9.2 Tratamiento con DNAsa	51
3.2.6.9.3 Puesta a punto de cebadores específicos para qPCR	52
3.3 Análisis de datos	52
3.4 Estudio complementario: estimación de la toxicocinética de CLP.....	54
4. RESULTADOS	57

	Índice
4.1 Efectos toxicológicos y teratogénicos de MAZ y CLP	58
4.2 Metabolismo oxidativo de poliaminas	58
4.2.1 Oxidasas de poliaminas en embriones expuestos a MAZ y CLP	58
4.2.1.1.1 Diamina oxidasa (DAO)	58
4.2.1.1.2 N ¹ -acetilpoliamina oxidasa (APAO)	59
4.2.1.1.3 Espermina oxidasa (SMOX)	60
4.2.1.2 Actividad de las oxidasas de poliaminas en embriones expuestos a CLP.....	61
4.2.1.2.1 Diamina oxidasa (DAO)	61
4.2.1.2.2 N ¹ -acetilpoliamino oxidasa (APAO)	62
4.2.1.2.3 Espermina oxidasa (SMOX)	63
4.3 Niveles de poliaminas libres y conjugadas	64
4.3.1 Concentración de poliaminas libres en embriones control de <i>R. arenarum</i>	64
4.3.2 Concentración de poliaminas libres en embriones expuestos a MAZ	65
4.3.2.1 Putrescina (Put).....	65
4.3.2.2 Espermidina (Spd).....	66
4.3.2.3 Espermina (Spm).....	66
4.3.3 Concentración de poliaminas libres en embriones expuestos a CLP	67
4.3.4 Poliaminas conjugadas.....	68
4.4 Análisis de componentes principales (ACP).....	68
4.5 Estudios moleculares	73
4.5.1 Verificación de la integridad del ARN purificado.....	73
4.5.2 Diseño de cebadores para secuenciación y verificación de la PCR	74
4.5.2.1 Depuración de secuencias anotadas en el transcriptoma, para el diseño de cebadores específicos.....	74
4.5.2.2 Verificación de los cebadores diseñados mediante PCR a punto final.....	83
4.5.2.3 Verificación de los productos de PCR mediante secuenciación.....	86
4.5.3 Verificación del tratamiento con DNAsas	89
4.5.4 Validación de cebadores para PCR en Tiempo Real (qPCR), rango dinámico y eficiencia de los mismos.....	90
4.5.5 Análisis de la expresión mediante RNA-Seq	97
5. DISCUSIÓN	109

5.1	Alteración del metabolismo de poliaminas en embriones de <i>R. arenarum</i>	110
5.1.1	Relación entre poliaminas y estrés oxidativo.....	111
5.1.2	DAO y APAO como biomarcadores de exposición a plaguicidas OF en	112
5.2	<i>Rhinella arenarum</i> como organismo no-modelo	113
5.2.1	Estudios de biología molecular en <i>R. arenarum</i> como organismo no- modelo..	116
5.2.1.1	RT-qPCR con genes de baja expresión	116
5.2.1.2	Eligiendo genes de referencia para qPCR	119
5.3	Minería de datos para comparar niveles de expresión a nivel transcriptómico en <i>R. arenarum</i>	122
5.3.1	Niveles de las enzimas blanco de OF y enzimas antioxidantes	122
5.3.2	Niveles de enzimas del metabolismo de poliaminas	123
6.	CONCLUSIONES	128
7.	BIBLIOGRAFÍA	131
8.	ANEXO	149

Índice de figuras

Figura 1.1: Región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén	2
Figura 1.2: Clasificación de plaguicidas	4
Figura 1.3: Estructura molecular de MAZ (metilazinfos)	8
Figura 1.4: Estructura molecular de CLP (clorpirifós)	10
Figura 1.5: Estructura general de la poliamina Put (putrescina)	12
Figura 1.6: Estructura general de la poliamina Spd (espermidina)	13
Figura 1.7: Estructura general de la poliamina Spm (espermina)	13
Figura 1.8: Síntesis de poliaminas	15
Figura 1.9: Degradación e interconversión de poliaminas	17
Figura 1.10: Regulación de ODC (ornitina decarboxilasa)	18
Figura 1.11: Efecto de las poliaminas en la transducción de señales	21
Figura 1.12: Flujo de trabajo en RNA-Seq	27
Figura 1.13: Estadios de <i>R. arenarum</i>	30
Figura 3.1: Imagen satelital de los sitios de recolección de especímenes adultos de <i>R. arenarum</i>	37
Figura 3.2: Ovulación de <i>R. arenarum</i>	39

	Índice
Figura 3.3: Exposiciones a plaguicidas OF	41
Figura 3.4: Estadios embrionarios en los que se tomaron muestras	42
Figura 3.5: Metodología de trabajo	53
Figura 3.6: Contenido de CLP y metabolitos marcados en el medio y en larvas de <i>R. arenarum</i>, expuestas a CLP-¹⁴C	56
Figura 4.1: Efecto de MAZ en la actividad de DAO en embriones de <i>R. arenarum</i>	59
Figure 4.2: Efecto de MAZ en la actividad de APAO en embriones de <i>R. arenarum</i>	60
Figure 4.3: Efecto de MAZ en la actividad de SMOX en embriones de <i>R. arenarum</i>	61
Figura 4.4: Efecto de CLP en la actividad de DAO en embriones de <i>R. arenarum</i>	62
Figure 4.5: Efecto de CLP en la actividad de APAO en embriones de <i>R. arenarum</i>	63
Figure 4.6: Efecto de CLP en la actividad de SMOX en embriones de <i>R. arenarum</i>	64
Figura 4.7: Efecto de MAZ en la concentración de Put en embriones de <i>Rhinella arenarum</i>	65

	Índice
Figura 4.8: efecto de MAZ en la concentración de Spd en embriones de <i>Rhinella arenarum</i>	66
Figura 4.9: efecto de MAZ en la concentración de Spm en embriones de <i>Rhinella arenarum</i>	67
Figura 4.10: Análisis de componentes principales realizado en embriones de <i>R. arenarum</i>	69
Figura 4.11: Análisis de Componentes Principales realizado en embriones de <i>R. arenarum</i> en el estadio de BC	70
Figura 4.12: Análisis de Componentes Principales realizado en embriones de <i>R. arenarum</i> en el estadio de OC	72
Figura 4.13: ARN purificado a partir de hígado de adultos de <i>R. arenarum</i>	73
Figura 4.14: ARN purificado a partir de embriones y larvas de <i>R. arenarum</i>	74
Figura 4.15: Diseño de cebadores para SAMDC y GST-pi	77
Figura 4.16: Diseño de cebadores para SOD y JUN	78
Figura 4.17: Diseño de cebadores para SMOX y DAO	79
Figura 4.18: Diseño de cebadores para SRM y ODC	80
Figura 4.19: Diseño de cebadores para CAT y FOS	81
Figura 4.20: Diseño de cebadores para GR y NRF2	82
Figura 4.21: Diseño de cebadores para JNK	83

	Índice
Figura 4.22: Amplificación de los transcritos de ODC y B-ACT1	84
Figura 4.23: Amplificación de los transcritos de JUN, APAO, B-ACT y CAT	84
Figura 4.24: Amplificación de los transcritos de NRF2 y SOD	85
Figura 4.25: Amplificación de los transcritos de JUN, DAO y GST-pi	85
Figura 4.26: Amplificación de los transcritos de SAMDC y JUN	86
Figura 4.27: APAO, c-FOS y ODC	87
Figura 4.28: CAT	87
Figura 4.29: NRF2, SOD, c-JUN, GST-pi	88
Figura 4.30: DAO y c-JUN	88
Figura 4.31: SAMDC, GST-pi	89
Figura 4.32: Verificación del tratamiento con DNAsa	89
Figura 4.33: Curvas de estandarización de qPCR	91
Figura 4.34: Pruebas para aumentar la eficiencia de los cebadores	91
Figura 4.35: Curva de estandarización de B-ACT	92
Figura 4.36: Curva de estandarización de SOD	93

	Índice
Figura 4.37: Curva de estandarización de SAMDC	94
Figura 4.38: qPCR de B-ACT, SOD y SAMDC	96
Figura 4.39: Niveles de expresión para AChE y GPX3	101
Figura 4.40: Niveles de expresión para genes del metabolismo de poliaminas	103
Figura 4.41: Niveles de expresión para ODC-1 y DAO	104
Figura 4.42: Niveles de expresión para los transcritos de Tubulina	105
Figura 4.43: Niveles de expresión para actina, G3P y RL8	106
Figura 4.44: Niveles de expresión para los transcritos de EF1	107
Figura 4.45: Niveles de expresión para NRF2, c-FOS y eIFA5	108
Figura 5.1: Efectos de MAZ y CLP a nivel bioquímico y molecular, sobre el metabolismo de poliaminas, factores de transcripción y la enzima blanco, AChE.	126, 127

Índice de tablas

Tabla 3.1: Número de transcritos obtenidos mediante RNA-seq para cada gen de interés.	45
Tabla 3.2: Cebadores diseñados para secuenciar y corroborar el transcriptoma	47
Tabla 3.3: Mezcla de reacción de PCR	50
Tabla 3.4: Secuencias de los cebadores diseñados para el estudio de la expresión mediante qPCR en <i>R. arenarum</i>	51
Tabla 4.1: Contenido de poliaminas libres (nmol/mg de proteína) en embriones de <i>Rhinella arenarum</i> expuestos a CLP	68
Tabla 4.2.: Matriz de correlación para embriones de <i>R. arenarum</i> en estadio de BC	71
Tabla 4.3: Matriz de correlación para embriones de <i>R. arenarum</i> en estadio de OC	73
Tabla 4.4 Total de transcritos confirmados	75
Tabla 4.5: Valores de TMM obtenidos para cada uno de los transcritos anotados	98, 99
Tabla 4.6: Valores de TMM para los genes de referencia utilizados	100
Tabla 5.1: Valores de TPM (Transcritos por Millón) en <i>Xenopus laevis</i> y <i>Rhinella arenarum</i>	117

<i>ACh</i>	<i>Acetilcolina</i>
<i>AChE</i>	<i>Acetilcolinestasa</i>
<i>ACP</i>	<i>Análisis de Componentes Principales</i>
<i>ADC</i>	<i>Arginina decarboxilasa</i>
<i>ADNc</i>	<i>ADN copia</i>
<i>AdoMetdc</i>	<i>S-adenosilmetionina decarboxilada</i>
<i>APAO</i>	<i>N¹-Acetilpoliamino oxidasa</i>
<i>ARNm</i>	<i>ARN mensajero</i>
<i>AZ</i>	<i>Antizima</i>
<i>AZIn</i>	<i>Inhibidor de antizima</i>
<i>BA</i>	<i>Boca abierta</i>
<i>B-ACT</i>	<i>Beta Actina</i>
<i>BC</i>	<i>Brote caudal</i>
<i>ACT3</i>	<i>Actina citoplasmática 3</i>

<i>CAT</i>	<i>Catalasa</i>
<i>ChAT</i>	<i>Colina Acetiltransferasa</i>
<i>CbE</i>	<i>Carboxilesterasa</i>
<i>CLP</i>	<i>Clorpirifos</i>
<i>DAO</i>	<i>Diamino oxidasa</i>
<i>DS</i>	<i>Desvío Estándar</i>
<i>EF1-A</i>	<i>A Factor de elongación 1 alfa</i>
<i>EF1-B</i>	<i>B Factor de elongación beta</i>
<i>EF1-D</i>	<i>D Factor de elongación delta</i>
<i>EF1-GA</i>	<i>GA factor de elongación gama A</i>
<i>eIF5A</i>	<i>Factor de Iniciación de la Elongación 5A</i>
<i>EPA</i>	<i>Agencia de Protección Ambiental</i>
<i>ERA</i>	<i>Elemento de respuesta antioxidante</i>
<i>ERK</i>	<i>Señal extracelular regulada por quiinasas</i>
<i>EROs</i>	<i>Especies Reactivas del oxígeno</i>

<i>ESM</i>	<i>Error Estándar de la Media</i>
<i>FAD</i>	<i>Flavin adenina dinucleótido</i>
<i>GABA</i>	<i>Ácido gama-aminobutírico</i>
<i>G3P</i>	<i>Gliceraldehido 3 fosfato dehidrogenasa</i>
<i>GR</i>	<i>Glutación reductasa</i>
<i>GSH</i>	<i>Glutación reducido</i>
<i>GST</i>	<i>Glutación S-transferasa</i>
<i>HRP</i>	<i>Peroxidasa de rábano</i>
<i>K-W</i>	<i>Kruskal Wallis</i>
<i>L8</i>	<i>Proteína ribosomal L-8</i>
<i>LSD</i>	<i>Diferencia menos significativa</i>
<i>MAPK</i>	<i>Proteínas quinasas activadas por mitógenos</i>
<i>MAZ</i>	<i>Metilazinfos</i>
<i>NGS</i>	<i>Secuenciación de nueva generación</i>
<i>NIH</i>	<i>National Institutes of Health</i>
<i>NRF2</i>	<i>NF-E2-Related Factor 2</i>

<i>O₂-</i>	<i>Anión superóxido</i>
<i>OC</i>	<i>Opérculo completo</i>
<i>ODC</i>	<i>Ornitina decarboxilasa</i>
<i>OF</i>	<i>Organofosforados</i>
<i>OH</i>	<i>Radical hidroxilo</i>
<i>OMS</i>	<i>Organización Mundial de la Salud</i>
<i>ORF</i>	<i>marco de lectura abierto</i>
<i>Orn</i>	<i>Ornitina</i>
<i>PCR</i>	<i>Reacción en Cadena de la Polimerasa</i>
<i>Put</i>	<i>Putrescina</i>
<i>qPCR</i>	<i>PCR cuantitativa</i>
<i>RNA-Seq</i>	<i>Secuenciación del ARN</i>
<i>RT</i>	<i>Retrotranscripción</i>
<i>GPOX</i>	<i>Glutación peroxidasa Se-dependiente</i>
<i>SAMDC</i>	<i>S-adenosilmetionina decarboxilasa</i>
<i>SMOX</i>	<i>Espermina Oxidasa</i>
<i>SNP</i>	<i>Polimorfismo de nucleótido simple</i>

<i>SOD</i>	<i>Superóxido dismutasa</i>
<i>Spd</i>	<i>Espermidina</i>
<i>SpdS</i>	<i>Espermidina sintasa</i>
<i>Spm</i>	<i>Espermina</i>
<i>SpmS</i>	<i>Espermina Sintasa</i>
<i>SSAT</i>	<i>Espermidina/espermina N¹-acetiltransferasa</i>
<i>TBA</i>	<i>Tubulina alfa</i>
<i>TBB</i>	<i>Tubulina beta</i>
<i>TMM</i>	<i>Trimmed Mean of M-values</i>
<i>TPM</i>	<i>Transcriptos por millón</i>

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Plaguicidas y el ambiente

1.1.1 Situación del Alto Valle de Río Negro y Neuquén

Argentina produce anualmente alrededor de 1,4 millones de toneladas de peras y manzanas. El 90% del total producido en el país se concentra en la región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén, siendo la provincia de Río Negro la principal provincia productora de ambas frutas con más del 75% del total nacional, seguida de Neuquén. Argentina es el primer país exportador de peras a nivel mundial al comercializar el 60% de la producción total (Storti and Bevilacqua 2017) y el decimosexto en manzanas según estadísticas de FAO al año 2016 (<http://www.fao.org/faostat/en/#data/TP>). El rol de Argentina en el mercado internacional es muy importante por su carácter de comercializador de productos a contraestación del hemisferio norte. (Figura 1.1).

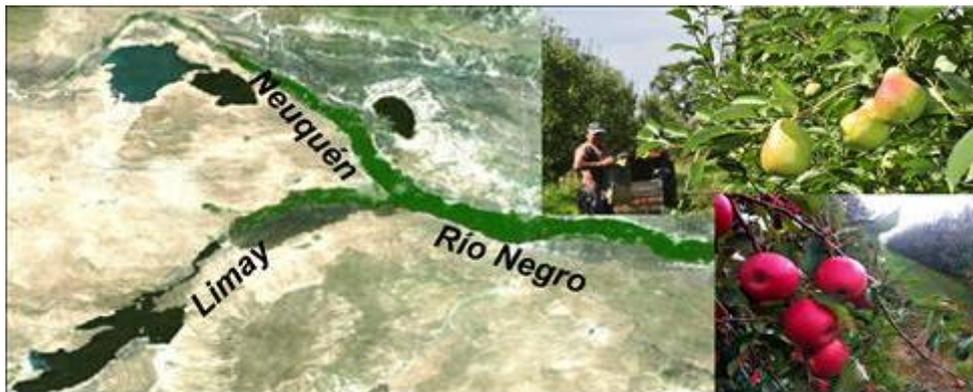


Figura 1.1: Región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén.

Al ser el Alto Valle de Río Negro y Neuquén una zona productora frutícola, las labores culturales llevadas a cabo para mantener los cultivos de frutales de pepita traen aparejada la utilización de diversos plaguicidas. La principal plaga de perales y manzanos es la carpocapsa (*Cydia pomonella*), y su control ha demandado la utilización de grandes cantidades de agroquímicos en las últimas décadas. Alrededor de 900 toneladas de insecticidas llegaron a ser aplicadas por temporada, correspondiendo la mayor parte a los organofosforados (OF) metilazinfos (MAZ) y clorpirifós (CLP), junto al carbamato carbarilo (Anguiano and

Pechen de D'Angelo 2007). Estos insecticidas han sido detectados tanto en suelo como en agua de la zona del Alto Valle de Río Negro y Neuquén (Loewy et al. 2011). La detección de plaguicidas en suelo y en agua resulta del escurrimiento y percolación de los mismos luego de la aplicación terrestre o aérea, siendo absorbidos y adsorbidos por constituyentes bióticos y abióticos, y transportados a otros lugares donde toman contacto con el hombre, los animales domésticos y la fauna silvestre. El uso de plaguicidas representa un beneficio para el productor, ya que garantiza un mayor rendimiento de la producción y una mejor calidad en el producto. Sin embargo, el uso de plaguicidas también acarrea riesgos para el ambiente, los animales y la salud humana. En el caso de macroinvertebrados acuáticos, se observa una disminución en la riqueza de especies en las zonas de drenaje. Esta disminución coincide con las épocas de mayor concentración de plaguicidas organofosforados presentes en el agua (Macchi et al, 2018). Asimismo, los peces y anfibios también se ven afectados debido a los plaguicidas presentes en el agua durante las épocas de irrigación (Guerreño et al, 2016). Los anfibios suelen estar afectados, principalmente, por su estilo de vida semiacuático, una piel húmeda y sensible y huevos desprotegidos. Por ello, son considerados buenos indicadores biológicos de la salud del medio (Netting, 2000). Más del 30% de las especies de anfibios se encuentran calificadas como vulnerables, en peligro o en peligro crítico (Stuart 2005). Si bien se desconocen las razones que pueden afectar a los anfibios en muchos casos, se pueden citar la contaminación química, la lluvia ácida y la destrucción del hábitat, entre otras (Becker et al. 2010; Crawford et al. 2010; Pilliod et al. 2010). La contaminación ambiental también ha sido implicada en el descenso del número de anfibios, existiendo estudios donde se demuestra una correlación directa con la aplicación de plaguicidas (Sparling and Fellers 2007, 2009).

1.2 Plaguicidas

El término plaguicida se refiere a aquella sustancia o mezcla de sustancias que es utilizada para prevenir, destruir, repeler o mitigar alguna plaga. Esto incluye a transmisores de enfermedades en humanos y animales, a plantas no deseadas o animales que causen daño durante la producción o interfieran con ella, durante el procesamiento, almacenaje, transporte o comercio de alimentos. También hace

referencia a sustancias con otro tipo de acción, como reguladores del crecimiento, defoliantes, desecantes, atrayentes, esterilizantes, repelentes y otros compuestos utilizados para prevenir el deterioro durante el almacenamiento y transporte de los productos agrícolas (FAO, 2003) (Figura 1.2).

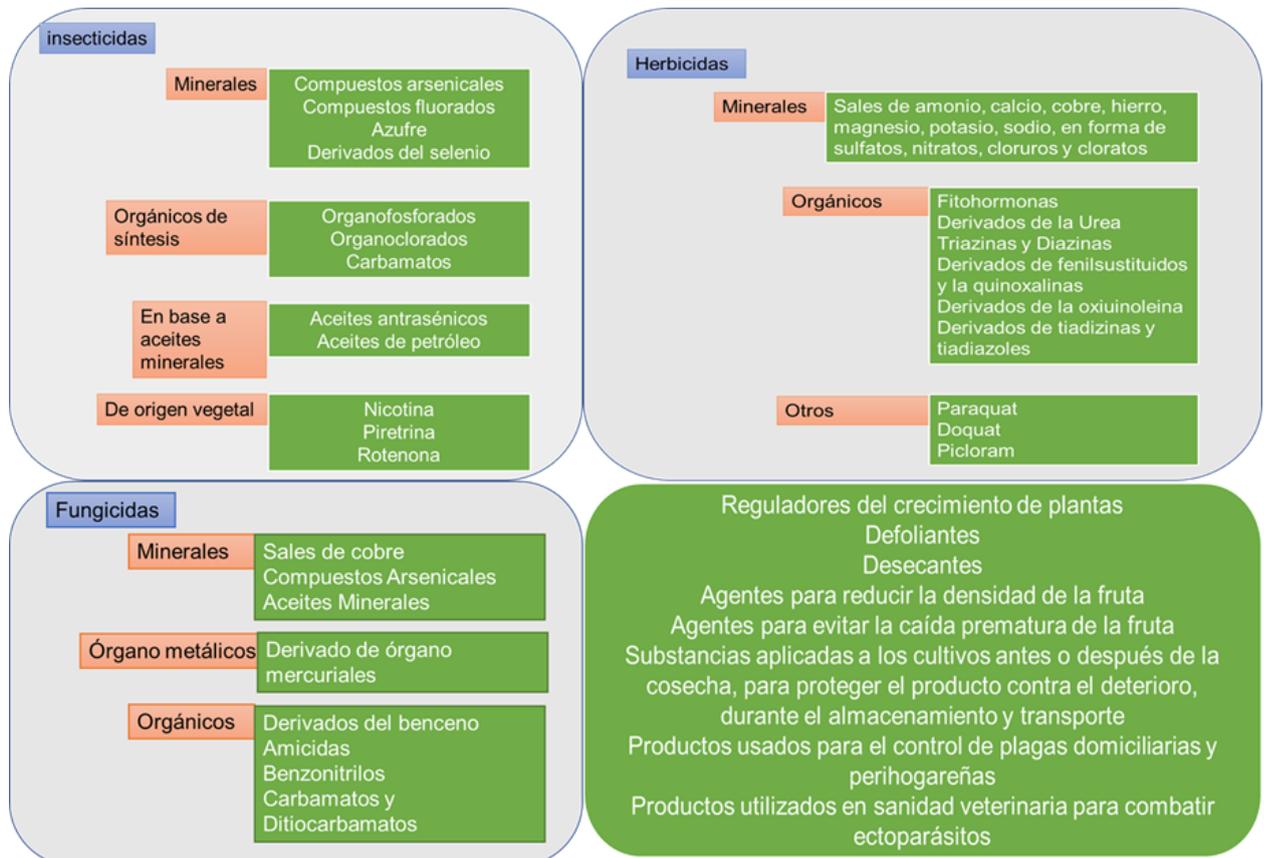


Figura 1.2: Clasificación de plaguicidas. Tipos de plaguicidas según la especie a combatir y otros tipos de sustancias también considerados plaguicidas según la FAO (Pórfido and Butler, 2014).

El uso de plaguicidas permite a los agricultores aumentar sus ganancias, aumentar la producción y disminuir sus pérdidas mediante el control de plagas. Su uso resulta necesario para proveer a la población mundial en expansión con suficientes alimentos de calidad nutricional, pero, al mismo tiempo, se ha incrementado la preocupación por sus efectos sobre organismos no blanco (Arias-Estévez et al. 2008). Es importante tener en cuenta que un 50% de los plaguicidas aplicados no alcanza a su blanco pretendido y llega a canales de riego, lagunas, arroyos y ríos por deriva, escorrentía y lavado por lluvias y riego (Loewy et al. 2011). Esto hace necesario controlar los niveles de residuos y el impacto

ambiental de plaguicidas, para lo cual el biomonitoreo mediante especies autóctonas resulta necesario (Eason and O'Halloran 2002).

De todos los criterios para la clasificación de los plaguicidas, la más común toma el tipo de plaga que se pretende controlar.

1.2.1 Insecticidas

Los insecticidas son un grupo particular de plaguicidas que se han desarrollado con el objetivo de controlar insectos. Son ampliamente empleados en agricultura y en el control de plagas domésticas. Otro uso sumamente importante es en salud pública para el control de vectores de enfermedades como malaria, oncocercosis, chagas, etc. La mayoría de los insecticidas ejercen su acción tóxica afectando el sistema nervioso de las especies blanco. Debido a su acción neurotóxica y al alto grado de conservación del sistema nervioso, se ven afectados otros animales no blancos, tanto invertebrados como vertebrados.

De acuerdo con el grupo químico, los insecticidas pueden ser:

- ✓ Clorados: este grupo se encuentra prohibido en nuestro país debido a su acumulación en las grasas animales: DDT, clordano, lindano, metoxicloro, pertane, heptacloro, aldrin, dieldrin, endrin, isodrin, etc.
- ✓ Organofosforados: acefato, clorpirifós, metil demetón, diazinon, dimetoato, etión, fenitrotión, triclorfón, mercaptotión, metilazinfos, metidation, triazofós, etc.
- ✓ Carbamatos: carbofurán, carbosulfán, metomil, pirimicarb, formetanato, etc.
- ✓ Piretroides: cipermetrina, ciflutrina, deltametrina, esfenvalerato, permetrina, fenpropatrina, lambdacihalotrina, etc.
- ✓ Nitroguanidinas: acetamiprid, imidacloprid.
- ✓ Benzoilureas: novalurón, clorfluazurón, teflubenzurón, etc.

Dentro del gran grupo de insecticidas, los organofosforados (OF) metilazinfos (MAZ) y clorpirifós (CLP), han sido algunos de los más comúnmente utilizados en la zona del Alto Valle de Río Negro y Neuquén.

1.2.1.2 Insecticidas organofosforados

Tal como se mencionó inicialmente, con el fin de controlar la principal plaga que ha afectado la producción frutícola en la región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén (carpocapsa, *Cydia pomonella*), se han utilizado diversas clases de plaguicidas. Anteriormente, el plaguicida más utilizado fue el insecticida organofosforado MAZ (Anguiano and Pechen de D'Angelo 2007). A mediados de la década del 2000, la utilización de MAZ se vio reducida drásticamente en un 40% debido a la implementación de un Plan de Manejo Integrado de Plagas en Grandes Bloques. Dicho plan se basaba en la utilización de la técnica de confusión sexual y la aplicación de otros plaguicidas alternativos de última generación para reducir la población de carpocapsa y mantenerla por debajo de niveles aceptables (SENASA-FUNBAPA, 2010). Sin embargo, desde la temporada 2014-2015, se ha observado un incremento gradual de las poblaciones de carpocapsa a nivel regional debido, entre otros factores, a la caída de rentabilidad en el sector, lo que llevó al abandono de la fruta en los árboles, y a que un número muy escaso de productores siguió realizando el manejo integrado de plagas luego de que se suspendió el Plan (Cichón et al. 2015). Otro factor que ha contribuido al incremento de las poblaciones de dicha plaga es la decisión errónea de no aplicar insecticidas durante la primera generación de la carpocapsa o de hacerlo sólo si se sobrepasa un límite de captura. Esto trae aparejado el incremento gradual de sus poblaciones y de las poblaciones de plagas secundarias, con la consiguiente necesidad de intervención con un mayor número de insecticidas en momentos cercanos a la cosecha, con el riesgo del aumento de residuos en los frutos (Cichón and Garrido 2012).

Los insecticidas OF derivan del ácido fosfórico y poseen un átomo de fósforo unido mediante un doble enlace a un átomo de azufre o de oxígeno. Además, dos cadenas alquílicas R1 y R2, que pueden ser grupos metilo, etilo o isopropilo, están unidas a través de un átomo de oxígeno al átomo central de fósforo. El enlace remanente del fósforo pentavalente se establece con el llamado grupo saliente (X), que varía ampliamente entre los diferentes compuestos (Costa, 1997) y es el enlace más susceptible a la hidrólisis.

Los insecticidas OF pueden ser divididos en 6 subclases, identificadas por sus nombres químicos, e incluyen a los fosfatos, fosforotioatos, fosforoditioatos, fosforamidatos, fosfonatos y fosforotiolatos. En general, son sustancias poco solubles en agua y muy solubles en disolventes orgánicos, principalmente en los

solventes aromáticos (benceno, xileno) y algo menos en los alifáticos (hexano, pentano); por lo tanto, son compuestos liposolubles.

Los compuestos OF ejercen su acción tóxica específica a nivel sináptico, en donde se enlaza de forma covalente con la enzima acetilcolinesterasa (AChE), inhibiendo su actividad enzimática. Esto conduce a una acumulación del neurotransmisor acetilcolina (ACh) en las sinapsis y uniones neuromusculares (Matsumura, 1985). Niveles elevados de ACh provocan la sobreestimulación de los receptores colinérgicos de las células postsinápticas y alteran las vías de señalización mediadas por estos receptores (Mileson 1998; Pope and Liu 1997; Pope et al. 2005). La inhibición de AChE por insecticidas OF es análoga al proceso de hidrólisis de su sustrato natural ACh. La inhibición de la enzima AChE por un compuesto OF tiene lugar a través de una reacción química en la cual el hidroxilo de un residuo de serina en el sitio activo de la enzima es fosforilado y se libera el grupo saliente X del OF. En contraste con la enzima acetilada, la cual es rápidamente hidrolizada para dar ácido acético y la enzima libre, la enzima fosforilada es altamente estable y en la mayoría de los casos, dependiendo de los grupos unidos al átomo de fósforo, es inactivada irreversiblemente (Fukuto, 1990). Esta disminución en la capacidad de reactivación, llamada envejecimiento, resulta de la pérdida de un segundo grupo, usualmente un grupo alquilo (R) desde el átomo de fósforo. Este hecho estabiliza el complejo AChE-OF y previene tanto la reactivación espontánea de AChE como la química (Eto, 1974; Costa, 1997). Por lo tanto, los compuestos que envejecen a AChE rápidamente son particularmente tóxicos, ya que para la recuperación de la actividad enzimática es necesario esperar que ocurra la síntesis proteica de nuevas moléculas de la enzima (Costa, 1997).

1.2.1.3 Metilazinfos

El insecticida metilazinfos (MAZ) [S-(3,4-dihidro-4-oxobenzo[d]-[1,2,3]-triazin-3-ilmetil) O, O-dimetil fosforoditioato] (CAS N° 86-50-0) posee un peso molecular de 317,33 g/mol y su solubilidad en agua es de 30 mg/L a 25°C (Figura 1.3). El MAZ es un insecticida-acaricida OF de amplio espectro, de gran persistencia y con un poder residual regular, clasificado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como Clase I altamente tóxico. Junto a su análogo etilado, este compuesto

es usado para combatir las plagas de frutales, vegetales, plantas ornamentales y cultivos de algodón (Matsumura, 1985). Es un insecticida-acaricida no sistémico por lo que no es transportado de un sitio a otro dentro de la planta. Se utiliza principalmente en aplicaciones foliares para controlar insectos que se alimentan de las hojas. Actúa como insecticida por contacto y como veneno estomacal.

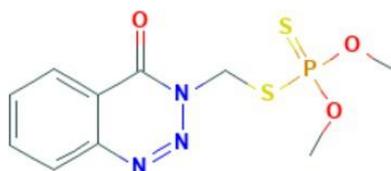


Figura 1.3: Estructura molecular de MAZ (Metilazinfos).

Dentro de los plaguicidas OF, MAZ es uno de los más tóxicos. En exposiciones agudas, el MAZ es altamente tóxico por inhalación, absorción dérmica, ingestión y contacto ocular. La dosis letal-50 (DL50) de MAZ varía ampliamente dependiendo de la ruta de exposición y del animal utilizado. La DL50 oral en ratas es de $4,4 \text{ mg kg}^{-1}$, 80 mg kg^{-1} en conejillos de la India y entre 8 y 20 mg kg^{-1} en ratones. La DL50 dérmica varía entre 88 y 220 mg kg^{-1} en ratas y es de 65 mg/kg en ratones. El MAZ es altamente tóxico para mamíferos, aves e insectos benéficos, así como también para peces e invertebrados acuáticos. En el caso de peces expuestos durante a 96 h, se ha informado una concentración letal 50 (CL50) de $0,02 \text{ mg L}^{-1}$, mientras que en crustáceos acuáticos expuestos por 96 h se informa una CL50 de $0,00022 \text{ mg L}^{-1}$ (International Union of Pure and Applied Chemistry, 2019). Para embriones de *Rhinella arenarum* expuestos durante a 144 h, se informa una CL50 de $15,6 \text{ mg L}^{-1}$, mientras que para larvas expuestas durante a 96 h la CL50 es de $10,4 \text{ mg L}^{-1}$ (Anguiano et al, 2002; Ferrari et al, 2004).

El plaguicida MAZ ha sido frecuentemente detectado en aguas subterráneas y superficiales de la región del Alto Valle de Rio Negro y Neuquén (Loewy et al. 1999, 2003, 2011), constituyendo un riesgo potencial para las especies acuáticas que habitan los cuerpos de agua tales como peces, anfípodos gamáridos y

estadios embrionarios y larvales de anfibios (Ferrari et al. 2004, 2008, 2009; Lascano et al. 2011).

Es importante señalar que el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) determinó, a través de la Resolución 149/16, la prohibición de la elaboración, importación y fraccionamiento de MAZ a partir del 1 de julio de 2016 y la prohibición de su comercialización y uso a partir del 31 de marzo de 2017.

1.2.1.4 Clorpirifós

El clorpirifós (CLP) (O, O-dietil O-3,5,6-trichloropyridin-2-il fosforotioato) (Figura 1.4) es un insecticida organofosforado que tiene el mismo mecanismo de acción que MAZ. El CLP es moderadamente tóxico y la exposición crónica se ha relacionado con efectos neurológicos, trastornos del desarrollo y trastornos autoinmunes. La DL50 oral en animales de experimentación es de 32 a 1000 mg kg⁻¹. La DL50 por vía cutánea en ratas es superior a 2000 mg kg⁻¹ y de 1000 a 2000 mg kg⁻¹ en conejos. La DL50 por inhalación de 4 horas en ratas es superior a 200 mg/m³. En el caso de peces expuestos durante 96 h, la CL50 es de 0,025 mg L⁻¹, mientras que en crustáceos acuáticos es de 0,00004 mg L⁻¹ (International Union of Pure and Applied Chemistry, 2019). En el caso de *Rhinella arenarum*, la CL50 a 96h es de 14,3 mg L⁻¹ para embriones y de 1,46 mg L⁻¹ para larvas (Liendro et al, 2015; Sotomayor et al, 2012). El insecticida CLP se ha utilizado ampliamente en viviendas y en agricultura, siendo pulverizado en las zonas afectadas para el control de plagas de cosechas como cochinillas, moscas blancas y otros. Sin embargo, la Agencia de Protección Medioambiental (EPA) ha restringido su uso doméstico desde el año 2000, luego de que diversos estudios indicaran que los niños expuestos a CLP tenían una menor circunferencia craneal, un indicador de función cognitiva reducida. A pesar de ello, en muchas comunidades se continúa utilizando ampliamente en agricultura donde los niños, trabajadores y otros residentes rurales se encuentran expuestos a través del aire y el agua (Californians for Pesticide Reform, 2017).

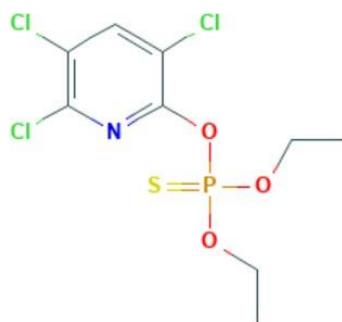


Figura 1.4: Estructura molecular de CLP (clorpirifós).

Este insecticida es ampliamente utilizado en Argentina y, en la zona del Alto Valle de Río Negro y Neuquén, sigue siendo utilizado por pequeños y medianos productores en reemplazo de MAZ. De acuerdo con información provista por SENASA, en el año 2017 se importaron más de dos mil toneladas de CLP a Argentina, provenientes en gran parte de China e India (informe en <https://www.ciafa.org.ar/info-fitosanitario-mercado>). Residuos de CLP han sido encontrados en agua y suelos superficiales en regiones de producción frutal, en el orden de 10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ durante el periodo de producción (Loewy et al. 2011).

1.2.2 Biotransformación de insecticidas organofosforados

Una vez que el OF ha sido absorbido por el organismo, sufre una serie de reacciones de biotransformación, conduciendo a la formación de compuestos conjugados más polares. La biotransformación de los compuestos OF puede incrementar ampliamente su potencial anticolinesterásico y, por lo tanto, el efecto tóxico resultante es la suma de los procesos bioquímicos competitivos de activación y detoxificación. La detoxificación incluye la biotransformación de los compuestos OF a metabolitos no tóxicos (Jokanović 2001). Las reacciones de biotransformación de xenobióticos pueden dividirse en reacciones de Fase I y reacciones de Fase II. En las reacciones de Fase I, un grupo polar tal como hidroxilo (-OH), carboxilo (-COOH), tiol (-SH) o amino (-NH₂) es introducido en la molécula a través de reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis. En las reacciones de Fase II,

los metabolitos polares son conjugados con sustratos endógenos como glucurónidos, glutatión reducido (GSH), sulfatos, acetatos y aminoácidos para formar compuestos más hidrosolubles que pueden ser excretados en la orina (Jokanović 2001; Livingstone 1998).

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

1.3 Poliaminas

Las poliaminas son moléculas policatiónicas que poseen varios grupos amino a lo largo de la cadena. Las aminas se pueden clasificar en alifáticas, como las poliaminas putrescina, espermidina, espermina y cadaverina; aromáticas, como tiramina, feniletilamina; o heterocíclicas, como histamina y triptamina. Fueron descritas por primera vez por Antoine van Leeuwenhoek en 1678 en el fluido seminal (Pegg and Casero, 2011).

Las poliaminas pueden encontrarse dentro de la célula en forma conjugada, en forma insoluble unida a otras moléculas, o libres. Las formas insolubles se encuentran unidas a macromoléculas como los ácidos nucleicos y las proteínas. Las poliaminas conjugadas se encuentran, en su mayoría, conjugadas con pequeñas moléculas, tales como compuestos fenólicos. Si bien no existen muchos estudios sobre poliaminas conjugadas en animales, en el caso de las plantas se ha informado que, al igual que las poliaminas libres, juegan un papel importante en la sobrevivencia de la planta, incluyendo la división celular, el florecimiento y la respuesta a estrés biótico y abiótico (Pinto and Ferreira, 2014). Las poliaminas libres, sin embargo, son las más abundantes, encontrándose en todos los seres vivos. Las poliaminas libres más comunes son espermidina (Spd), espermina (Spm) y putrescina (Put).

1.3.1 Putrescina (Put)

Conocida también como 1,4-diaminobutano (Figura 1.5), es una base nitrogenada de bajo peso molecular. Debido a la presencia de dos grupos amino básicos en su estructura, posee carga positiva a pH fisiológico, haciéndola muy adecuada para una amplia gama de funciones en diferentes tipos de células.

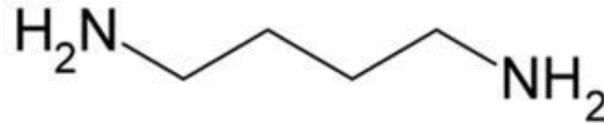


Figura 1.5: Estructura general de la poliamina Put (Putrescina).

Si bien las tres poliaminas más comunes se encuentran en todos los organismos, los eucariotas por lo general tienen niveles bajos de Put, mientras que los procariotas presentan un contenido más elevado de ésta. Cumple importantes funciones fisiológicas en diversas células, siendo también un precursor en la síntesis de Spm y Spd. Se ha demostrado que Put, junto con otros iones de poliaminas y fosfatos, forma agregados nucleares en los núcleos celulares, logrando interaccionar así con moléculas cargadas negativamente como ADN, ARN, proteínas y fosfolípidos. Por lo tanto, participarían en la regulación de la estructura de los ácidos nucleicos y la síntesis de proteínas (Hou 2001; Igarashi and Kashiwagi 2010).

La Put puede unirse a la membrana de las células, generando una disminución en la fluidez de la misma y una resistencia a la fragmentación debido a la estabilización de la membrana. Además, se ha encontrado que está involucrada en la eliminación de radicales libres y juega un rol importante en la homeostasis del Ca²⁺, Na⁺ y K⁺ (Tabor and Tabor 1976).

1.3.2 Espermidina (Spd)

Espermidina es el nombre común que recibe la N'-(3-aminopropil) butano-1,4-diamina (Figura 1.6). La Spd se encuentra en los ribosomas y todos los tejidos vivos, cumpliendo varias funciones metabólicas en los organismos.

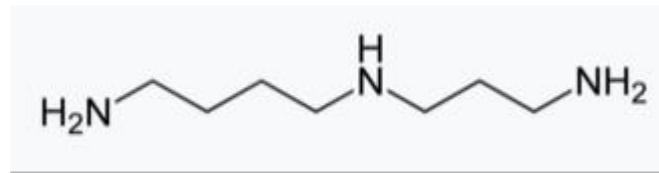


Figura 1.6: Estructura general de la poliamina Spd (espermidina).

Espermidina se forma por la acción de espermidina sintasa (SpdS) mediante la aminopropilación de Put, usando el grupo aminopropilo proveniente de la S-adenosilmetionina decarboxilada (AdoMetdc) (Michael 2016).

Además de cumplir funciones similares a espermina, espermidina actúa como donante del grupo aminobutil para las modificaciones post-traduccionales de un residuo específico de lisina en el factor de transcripción eIF5A, mediante la deoxihipusina sintasa. Dicha modificación resulta esencial para la actividad del factor de transcripción, cuya función es contribuir a la transcripción, el transporte núcleo-citoplasma, la renovación de ARNm y la apoptosis (Nishimura et al. 2009).

1.3.3 Espermina (Spm)

Es el nombre común de la N, N'-bis(3-aminopropil) butano-1,4-diamina (Figura 1.7).

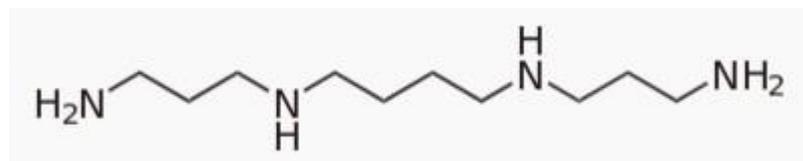


Figura 1.7: Estructura general la poliamina Spm (espermina).

La Spm se produce mediante la acción de la espermina sintasa (SpmS) a partir de espermidina. Es la poliamina más básica de todas y en su gran mayoría se encuentra unida a los sitios ácidos de las macromoléculas. Su liberación induce la vía catabólica de conversión para generar espermidina, mediante espermina oxidasa (SMOX) o mediante acetil-poliamino oxidasa (APAO).

Una de sus funciones biológicas y fisiológicas más importante es actuar como defensa frente al daño causado por estrés oxidativo, estimulando la síntesis de los productos de genes protectores, como superóxido dismutasa (SOD), proteínas de choque térmico y proteínas reguladoras del ciclo celular. Aunque estas funciones corresponden también a las funciones de espermidina, se cree que espermina es la que cumple un rol más efectivo (Ha et al. 1998; Pegg 2014).

1.3.4 Biosíntesis

Las poliaminas se encuentran en todos los eucariotas y en la mayoría de los procariotas, siendo sintetizadas mediante la acción de enzimas aminopropil transferasas. Estas enzimas utilizan como sustrato S-adenosilmetionina decarboxilada (AdoMetdc) y transfieren sus grupos aminopropilo a los aceptores aminos mediante la acción de las enzimas específicas para cada aceptor, SpdS o SpmS (Pegg and Michael 2010).

Las poliaminas derivan principalmente de los aminoácidos ornitina (Orn) y metionina, mientras que arginina y lisina sirven como alternativas secundarias, fundamentalmente en vegetales, hongos y procariotas. La vía más común de biosíntesis comienza con la decarboxilación de Orn, mediante ornitina decarboxilasa (ODC) para formar Put. Espermidina y espermina, por su parte, se forman desde Put mediante la adición de grupos aminopropilo. En el caso de espermidina, los grupos son donados por AdoMetdc y adicionados a Put mediante la acción de SpdS. Espermina se forma por transferencia del grupo aminopropil desde AdoMetdc a la posición N¹ de espermidina, mediante la actividad de SpmS (Figura 1.8) (Pegg 2014). Alternativamente, Put puede ser sintetizada desde arginina mediante la vía de arginina decarboxilasa (ADC) y agmatinasa.

Si bien ODC es el factor limitante en la síntesis de Put, el suministro de los grupos aminopropilo por acción de la enzima S-adenosilmetionina decarboxilasa (AdoMetDC), también influye en la síntesis de las demás poliaminas. Esto se debe a que, una vez que S-adenosilmetionina es convertida en su forma decarboxilada (AdoMetdc), es utilizada exclusivamente para la biosíntesis de poliaminas, debido a que las metil-transferasas no utilizan AdoMetdc como sustrato. De esta forma, los niveles de AdoMetdc suelen mantenerse muy bajos y su suministro limita la conversión de putrescina en espermina y espermidina (Pegg 2009).

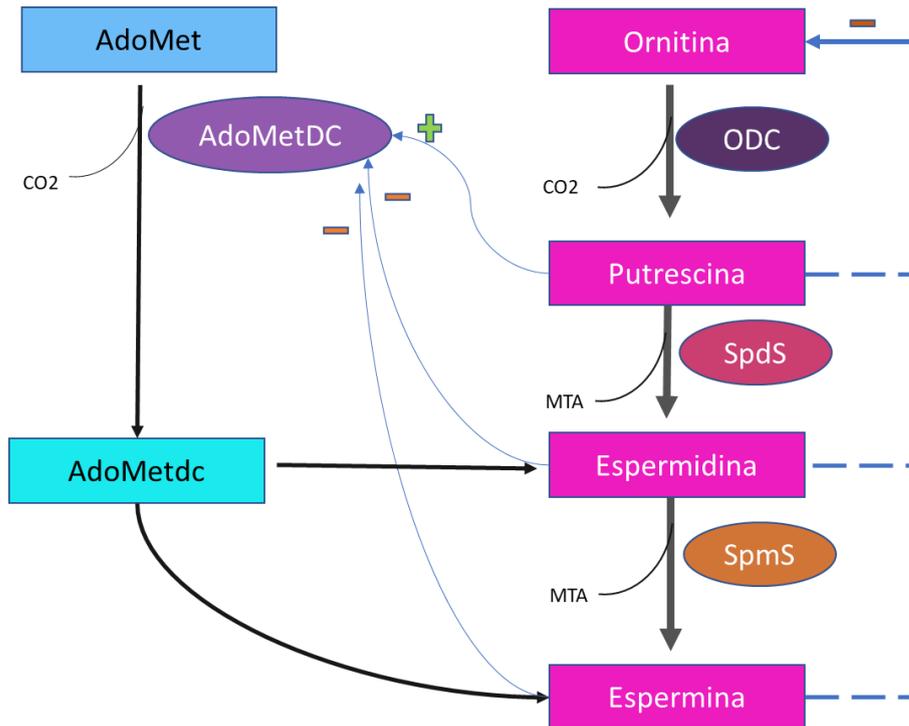


Figura 1.8: Síntesis de poliaminas. Se observa un esquema de la vía de biosíntesis de las poliaminas más comunes. Partiendo desde su precursor, el aminoácido ornitina, se obtiene putrescina por acción de ornitina decarboxilasa (ODC). Luego putrescina es transformada en espermidina por acción de espermidina sintasa (SpdS); y espermidina es transformada en espermina, por acción de espermina sintasa (SpmS). Espermidina y espermina regulan negativamente a AdoMetDC, mientras que putrescina la regula positivamente. El contenido de ornitina es regulado también por las tres poliaminas, de forma negativa.

1.3.5 Vía de interconversión y degradación

En el camino de la interconversión de las poliaminas existen diversas aminopropil transferasas que actúan de forma irreversible.

Las poliaminas pueden ser oxidadas y/o acetiladas para mantener su concentración o actividad celular. La regulación de la concentración de poliaminas está mediada por poliamino oxidasas que pueden ser clasificadas dependiendo de si su cofactor es flavina adenina dinucleótido (FAD) o cobre. Dentro de las enzimas que contienen FAD, se encuentra acetilpoliamino oxidasa (APAO) y espermina oxidasa (SMOX). Los sustratos de APAO son poliaminas acetiladas, oxígeno y agua. La mayoría de las APAO producen poliaminas más pequeñas, un aminoaldehído y H₂O₂. La acetilación de espermina y espermidina es catalizada

por la espermidina/espermina N¹-acetiltransferasa (SSAT). Cuando SSAT se activa, produce la acetilación de poliaminas, reduciendo su carga positiva y evitando así su interacción con otras moléculas. Estos metabolitos acetilados luego son excretados u oxidados por APAO, lo que permite a la célula regular las concentraciones de espermina y espermidina rápidamente (Figura 1.9). Espermina oxidasa (SMOX) convierte espermina en espermidina, generando como productos el aldehído reactivo 3-aminopropanal y H₂O₂ (Seiler 2011).

En la reacción de degradación de putrescina, ésta puede ser oxidada por diamino oxidasa (DAO), produciendo alfa-amino-butaraldehído. Este aldehído luego puede ser oxidado a ácido gamma-aminobutírico (GABA). La enzima DAO es una amino oxidasa que contiene cobre y actúa principalmente sobre diaminas. Su acción sobre Put como precursora de las poliaminas superiores Spd y Spm, parece cumplir un papel importante en el control homeostático de los niveles intracelulares de aminas biogénicas. Su actividad se encuentra elevada en tejidos que se encuentran en rápida proliferación, como placenta, tejidos fetales y órganos que sufren procesos hiperplásicos, hipertróficos o neoplásicos (Agostinelli et al. 2004).

La actividad catabólica de APAO y de SMOX genera altas cantidades de peróxido de hidrógeno, favoreciendo así la apoptosis (Guasco Herrera et al. 2014). Asimismo, los aldehídos reactivos también se encuentran implicados en la muerte celular en distintos tipos celulares (Agostinelli et al. 2004).

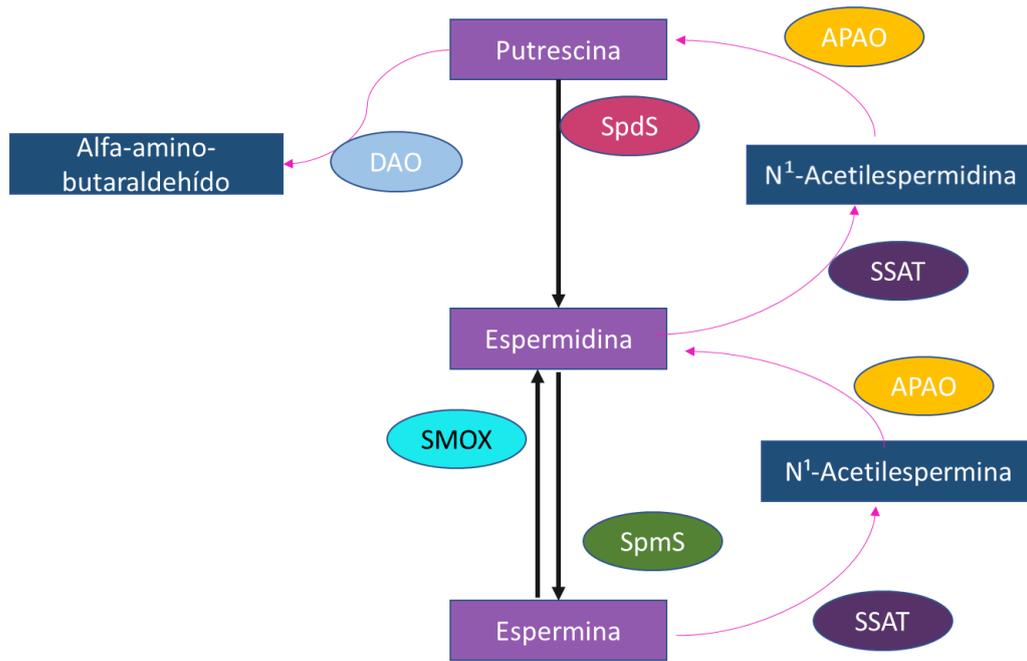


Figura 1.9: Degradación e interconversión de poliaminas. Se muestra la conversión de espermina a espermidina por medio de espermina oxidasa (SMOX), y la conversión de espermina en espermidina, y de espermidina en putrescina, por acción sucesiva de espermidina/espermina N¹-acetiltransferasa (SSAT) y N¹-acetilpoliamino oxidasa (APAO). La acción de SMOX y APAO genera como producto H₂O₂ y aldehídos reactivos. Además, se muestran la oxidación de putrescina a alfa-amino-butiraldehído por acción de diamino oxidasa (DAO).

1.3.6 Regulación metabólica de los niveles de poliaminas

Los niveles intracelulares de poliaminas están finamente regulados, principalmente, por cambios en las enzimas claves de su metabolismo. Las enzimas involucradas están controladas mediante un mecanismo altamente especializado a nivel de la transcripción, traducción y degradación proteica, involucrando una retroalimentación controlada por la concentración de poliaminas. Estas características se encuentran muy conservadas entre todos los organismos vivos, sugiriendo que la regulación del nivel de poliaminas es crítica para las células.

El factor limitante en la síntesis de poliaminas, la enzima ODC, es degradada muy rápidamente cuando el nivel de poliaminas se incrementa. Esta degradación es independiente de ubiquitinación, ya que se debe a la acción de una enzima

denominada antizima (AZ). La AZ se activa al incrementarse los niveles de las poliaminas. La forma activa de ODC es en su forma de dímero, pero la asociación entre las dos subunidades es bastante débil, por lo que los dímeros se mantienen en equilibrio con monómeros inactivos. Por lo tanto, AZ se une al monómero de ODC, inactivando la proteína y marcándola para ser degradada por el proteosoma 26S. Por otra parte, AZ es regulada por una segunda proteína, denominada inhibidor de antizima (AZIn). El AZIn tiene una estructura similar a ODC, pero se une con más fuerza a AZ que ODC, inactivando así a AZ y evitando la degradación de ODC (Pegg 2006) (Figura 1.10).

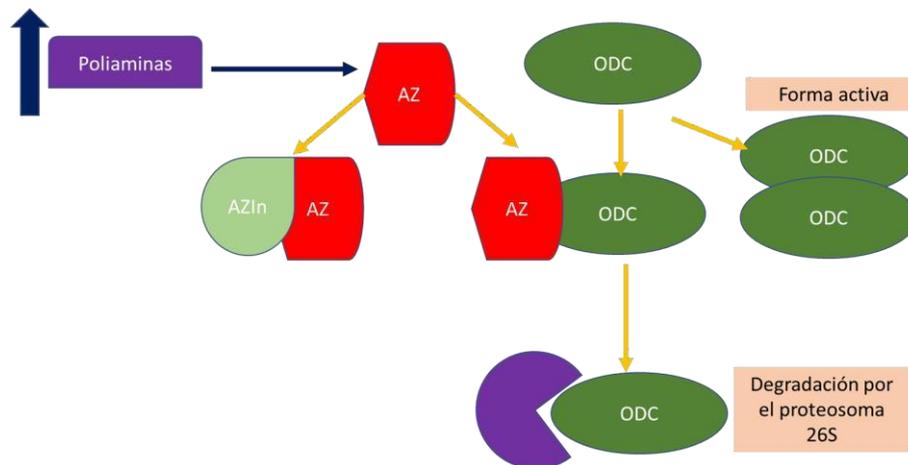


Figura 1.10: Regulación de ODC (ornitina decarboxilasa). Vía de regulación de ODC mediante la enzima AZ, activada cuando los niveles de poliaminas se ven elevados. Por un lado, la AZ se une a ODC guiando su degradación por los proteosomas, y por otro se une al AZIn, lo que evita la degradación de ODC.

Además de la regulación de ODC, la cantidad de la proteína AdoMetDC también es importante para mantener los niveles de poliaminas en las células. Su regulación ocurre a diferentes niveles, incluyendo la transcripción, traducción y recambio proteico. Sin embargo, el mecanismo mejor conocido es el de la regulación a nivel traduccional. Se ha visto que, en células humanas, hay un pequeño marco de lectura abierto (*open reading frame*, ORF) en el 5'UTR del ARNm (ARN mensajero) que codifica para un péptido denominado MAGDIS. Este

es una pro-enzima que sufre una reacción espontánea de procesamiento, generando el grupo prostético piruvoil sobre el extremo amino de las subunidades α de AdoMetDC, y también codifica una pequeña subunidad β para la enzima. Este procesamiento y la actividad de la enzima final son activadas por Put (Figura 1.8). Sin embargo, la protonación incorrecta del grupo piruvoil durante la reacción enzimática lleva a la transaminación y conversión en alanina, inactivando permanentemente la enzima (Pegg 2009).

La enzima SSAT también es un factor importante en la vía de interconversión de las poliaminas, ya que cataliza un paso limitante. Juega un rol importante en la homeostasis de las poliaminas, ya que puede ser inducida por éstas y algunos de sus análogos, como N^1 , N^{12} -bis(etil)espermina y N^1 , N^{12} -bis(etil)norspermina. Mientras que APAO es una enzima estable y normalmente su actividad excede la de la acetilasa, SSAT tiene un recambio rápido y una vida media muy corta, por lo que puede responder rápidamente a los cambios en la síntesis o degradación de la enzima (Wang and Casero 2006). La regulación de SSAT ocurre a múltiples niveles, incluyendo el nivel transcripcional, el procesamiento del ARNm, a nivel traduccional y de estabilización proteica, siendo afectado en todos sus pasos por los niveles de poliaminas. El gen de SSAT contiene un elemento de respuesta a poliaminas, el cual permite el incremento de su transcripción y, además, permite la interacción del factor de transcripción NRF2 (Pegg 2008). El empalme alternativo es un segundo paso regulatorio en el control de la producción del ARNm de SSAT. El pre-ARNm puede sufrir *splicing* alternativo, generando una variante truncada que produce una enzima inactiva (Hyvönen et al. 2006).

1.3.7 Poliaminas y proliferación celular

La importancia de las poliaminas en el crecimiento y la proliferación celular ha sido estudiada y demostrada por décadas. Se ha visto que tanto espermina como espermidina promueven el crecimiento, mientras que la disminución en la concentración de poliaminas intracelulares disminuye el crecimiento en diversos organismos. En eucariotas, las poliaminas juegan un papel importante en la progresión del ciclo celular, donde las concentraciones y actividades de ODC y AdoMetDC varían de acuerdo a las fases del ciclo celular (Miller-Fleming et al. 2015).

La cascada de las MAPK (*Mitogen activated protein kinases*, proteínas quinasas activadas por mitógenos) y el oncogén Ras es la vía de señalización mejor definida, involucrada en la proliferación celular. Muchos estudios sugieren que las poliaminas están involucradas en la expresión y activación de las MAPKs, estimulando la amplificación de protooncogenes. Las señales son transducidas desde la membrana celular hacia el núcleo mediante activación de quinasas, incluyendo tirosina-quinasas, activando a Ras, MEK y ERK (*extracellular signal-regulated kinase*, quinasa regulada por señales extracelulares), llevando a la expresión de protooncogenes y factores de transcripción. Por un lado, se ha demostrado que espermidina estimula la fosforilación de tirosina-quinasas como ERK1/2 y también activa al oncogén nuclear c-Myc, que puede ser considerado un factor de transcripción. Por otro lado, putrescina estimula la fosforilación de residuos de tirosinas mediante tirosina-quinasas y la expresión de los protooncogenes nucleares c-FOS y c-JUN (Figura 1.11). Estos últimos son genes asociados al crecimiento, que se activan durante procesos de proliferación celular. Se ha observado que, a continuación de la estimulación por mitógenos, hay una activación simultánea de la biosíntesis de poliaminas y la transcripción del protooncogén c-FOS. De la misma forma, cuando hay un crecimiento tumoral maligno, se incrementa la síntesis de poliaminas, la desregulación de ODC y la amplificación de los protooncogenes (Bachrach et al. 2001; Pegg 2009).

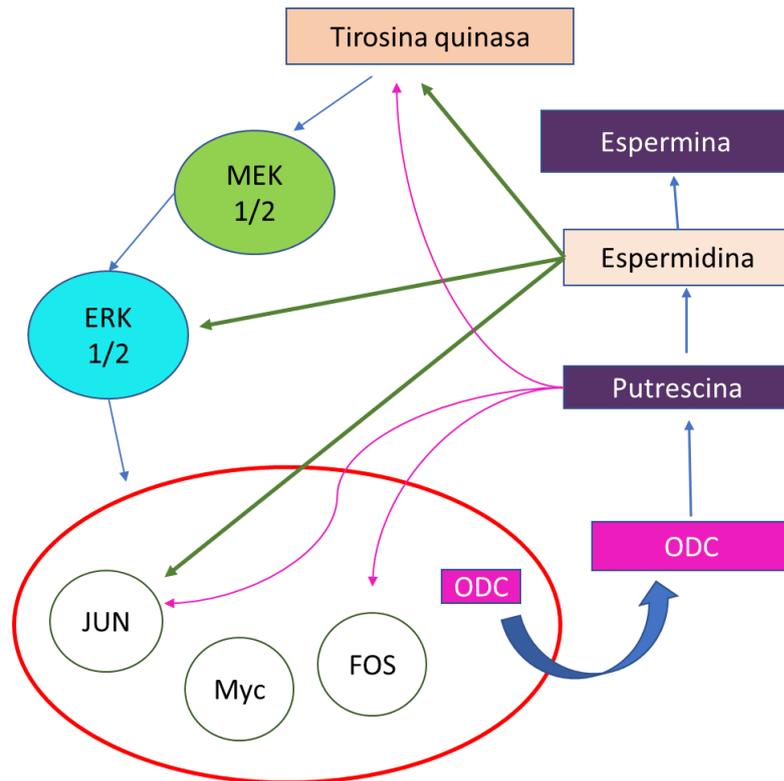


Figura 1.11: Efecto de las poliaminas en la transducción de señales. La vía de las MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos) es estimulada por espermidina y putrescina. Espermidina, formada a partir de putrescina, estimula la fosforilación de ERK 1/2 y activa al gen Myc, que funciona como factor de transcripción. Por otro lado, putrescina, generada mediante la actividad de ODC, estimula la activación de tirosinas quinasas y de los genes FOS y JUN, quienes están involucrados en procesos de proliferación celular.

1.3.7 Poliaminas y estrés oxidativo

1.3.7.1 Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante

Las células se encuentran continuamente expuestas a diferentes tipos de estrés, ya sea por productos de su propio metabolismo o por cambios ambientales en los niveles de las especies reactivas de oxígeno (EROs), el nivel de pH, la presión osmótica y la temperatura. Las especies reactivas de oxígeno se generan como productos normales del proceso metabólico, pero no siempre son inofensivos. Comprenden un grupo diverso de especies químicas que incluyen al H_2O_2 , el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), entre otros. Están involucrados fisiológicamente en diversas funciones celulares, pero el desbalance entre EROs y su disposición dentro de la célula puede desencadenar una serie de reacciones de oxidación y peroxidación de macromoléculas. Los radicales libres

generados pueden provocar daño en las membranas biológicas o pueden oxidar proteínas, polisacáridos e incluso el ADN. Además, pueden activar señales moleculares que conducen tanto a la apoptosis como a la proliferación celular y dar lugar a lesiones pre-neoplásicas (Panemangalore and Bebe 2000). Además, la exposición de los organismos a diversos factores ambientales puede generar una alteración en el estado redox del organismo, al generar un incremento en la producción de EROs (Halliwell 2011). Se ha visto que la exposición de organismos acuáticos a plaguicidas OF puede conducir a una situación de estrés oxidativo y/o a la alteración de sus sistemas de defensa antioxidante (Anguiano et al. 2001; Ferrari et al. 2007, 2008, 2009; Liendro et al. 2015; Sotomayor et al. 2015).

Sin embargo, los organismos han sido capaces de desarrollar un complejo sistema de defensa antioxidante para contrarrestar los efectos deletéreos de las EROs. Si este sistema no consigue neutralizar el exceso de EROs, ocurre una situación de estrés oxidativo (Davies 1995). El sistema de defensa antioxidante comprende tanto enzimas como antioxidantes químicos de bajo peso molecular. La expresión de las enzimas antioxidantes es modulada, en algunos casos, por los propios xenobióticos a los cuales el organismo ha sido expuesto (Janssens et al. 2002). Dentro de los componentes enzimáticos del sistema antioxidante se encuentran las enzimas glutatión S-transferasa (E.C. 2.5.1.18; GST) glutatión reductasa (E.C., 1.6.4.2, GR), glutatión peroxidasa Se-dependiente (E.C. 1.11.1.9, GPOX), catalasa (E.C. 1.11.1.6, CAT) y superóxido dismutasa (E.C. 1.15.1.1, SOD). Dentro de los antioxidantes químicos se encuentran compuestos tales como el alfa-tocoferol (vitamina E), el ácido ascórbico (vitamina C), los tioles proteicos (-SH) y el glutatión reducido (GSH) (Voronkova et al. 2018).

GSH actúa como una sustancia nucleofílica capaz de eliminar numerosos compuestos y sus metabolitos al convertir sus centros electrofílicos en enlaces tioéter. Participa también como cofactor en las reacciones catalizadas por las enzimas GST y GPOX. Además, GSH protege a las células de la desnaturalización de proteínas ocasionada por la oxidación de sus grupos tiol durante situaciones de estrés (Noctor 2002).

Las enzimas GST, por su parte, catalizan el ataque nucleofílico de GSH sobre compuestos no polares que contienen un átomo de carbono, de nitrógeno o de azufre electrofílico. Diferentes isoenzimas de GST metabolizan agentes quimioterapéuticos, insecticidas, herbicidas, carcinógenos y subproductos del

estrés oxidativo con propiedades mutagénicas y citotóxicas. Además, algunas de estas isoenzimas actúan junto con GPOX para eliminar electrófilos secundarios, generados por escisión de los hidroperóxidos generados a causa de la peroxidación de ácidos grasos (Hayes y Mc Lellan, 1999).

La actividad enzimática de GR es la encargada de regular la homeostasis celular de GSH y mantener los niveles adecuados que aseguran la protección de las células frente a situaciones de estrés. Esta enzima recicla al glutatión oxidado que se produce en reacciones redox por la acción de GPOX, a GSH, utilizando NADPH como co-sustrato reductor. La enzima SOD destruye el anión superóxido al dismutarlo en peróxido de hidrógeno y oxígeno, y, el peróxido generado puede a su vez ser eliminado por acción de CAT o GPOX. La enzima CAT es una enzima ubicua que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno produciendo agua y oxígeno. Junto con la GPOX, constituye la defensa antioxidante celular clave contra los peróxidos (Birben et al. 2012; Halliwell 2011).

A nivel transcripcional, las enzimas antioxidantes están reguladas por la vía denominada Keap1-NRF2. NRF2 (*NF-E2-Related Factor 2*, factor 2 relacionado al factor nuclear eritroide 2) es un factor de transcripción y Keap1 es su represor específico. En condiciones normales dentro de la célula, NRF2 se une a Keap1 en el citosol, promoviendo su ubiquitinación para ser degradado por los proteosomas. Ambas proteínas median la respuesta celular a xenobióticos electrofílicos y oxidantes. Específicamente, NRF2 se une al elemento de respuesta antioxidante (ERA) para activar la transcripción de los genes que él regula. De esta forma, juega un rol importante en la coordinación de la adaptación celular a compuestos que puedan causar un daño por estrés. La exposición a compuestos oxidantes resulta en la oxidación específica de un residuo de cisteína en Keap1, causando su dimerización. Esto evita su unión a NRF2, evitando así la ubiquitinación y posterior degradación. De esta forma, las concentraciones celulares de NRF2 se incrementan, trasladándose al núcleo y uniéndose a ERA en la región reguladora de genes blanco (Lushchak 2011).

1.3.7.2 Relación entre poliaminas y estrés oxidativo

Se ha observado que las concentraciones intracelulares de las poliaminas cambian durante la exposición al estrés, y, a su vez, modificaciones en sus concentraciones exógenas pueden influenciar la sensibilidad de la célula al estrés.

En diversos estudios se pudo observar que las poliaminas están asociadas con la respuesta y protección a diferentes tipos de estrés (Fujisawa and Kadoma 2005; Rhee et al. 2007; Rider et al. 2007). Por ejemplo, se ha observado la acumulación de putrescina durante el estrés osmótico en cultivos celulares hepáticos de rata (Mitchell et al. 1998) y en plantas. Esto se debe a un aumento en la actividad de ODC y de ADC, respectivamente, dando como resultado, en el caso de las plantas, la pérdida de clorofila y senescencia (Miller-Fleming et al. 2015). Las poliaminas tienen la capacidad de interactuar con diversas moléculas celulares, debido a su carga positiva, siendo una de ellas el ADN. Mediante su unión al ADN, las poliaminas lo protegen de los daños estructurales y funcionales que pueda sufrir, ya que bloquean la unión de éste con los radicales libres (Rider et al. 2007). No sólo cumplen una función protectora uniéndose a la molécula de ADN, sino que actúan estimulando la expresión de genes que actúan frente al estrés. Ejemplo de ello son los trabajos realizados en levaduras, *E. coli* y *Arabidopsis thaliana* (Krüger et al. 2013; Sagor et al. 2013). Se ha podido observar que putrescina incrementa la supervivencia de los cultivos de *E. coli* expuestos a radicales libres, mediante estimulación de la expresión los genes *oxyR*, *Kate* y *katG*, que actúan en la protección frente al estrés oxidativo (Tkachenko et al. 2001). Si bien todas las poliaminas tienen un potencial de protección en situaciones de estrés celular, es Spm la que ha demostrado un rol más eficiente como recolector de EROs. Tanto Spm como Spd protegen a las células del H₂O₂, por un mecanismo aparentemente diferente de aquel realizado por GSH (Rider et al. 2007). A concentraciones fisiológicas, Spm y Spd son potentes recolectores de $\cdot\text{OH}$, uniéndose también al O₂⁻, protegiendo así a la célula durante la inflamación, peroxidación lipídica y toxicidad causada por el oxígeno (Das and Misra 2004).

1.4 Organismos modelo vs organismos no-modelo

Un modelo animal en experimentación es aquel que utiliza animales no humanos, seleccionados en función de sus características específicas, para ser utilizados en investigación o docencia. Gracias al empleo de modelos animales, se han comprendido mejor los principios básicos de la genética, bioquímica, fisiología y comportamiento. En el diseño experimental, las claves son la elección de la especie animal que más se adapte al estudio y la viabilidad de la extrapolación de los resultados desde la especie modelo a la especie en que se vayan a aplicar los

resultados obtenidos (Pérez et al. 2009). A lo largo de los años se ha acumulado gran cantidad de datos sobre los organismos modelo, pudiendo ser utilizados para obtener información acerca de otras especies más difíciles de estudiar. Existen así organismos modelo genéticos, experimentales y genómicos. Ejemplos de ello son *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis*, *Danio rerio* y *Fugu rubripes*. Uno de los organismos más utilizados como modelo experimental es la rana de uñas africana *X. laevis*, ya que presenta enormes ventajas entre las que se incluyen un buen conocimiento de su fisiología, tolerancia a grandes variaciones en el ambiente y fácil mantenimiento en cautividad (Pérez et al. 2009). Debido a la conveniencia y utilidad de estos organismos, muchos científicos se abocaron a estudiarlos. De esta forma, se desarrollaron herramientas y recursos específicamente para esta clase de organismos, tales como herramientas moleculares, técnicas y métodos (Russell et al. 2017).

Los organismos no-modelo lo son porque no son fáciles de mantener en condiciones de laboratorio, o, simplemente, porque no están bien caracterizados a nivel molecular. Sin embargo, el interés por estas especies recae justamente sobre el hecho de que son diferentes a aquellos considerados organismos modelo. Por ejemplo, en biología comparativa, los organismos no-modelo son de gran interés debido a su diversidad biológica. Sin embargo, trabajar con estas especies genera un gran esfuerzo de adaptaciones y desarrollo de metodologías apropiadas para estudiarlas. Como resultado, se han generado grandes avances en la práctica y la teoría, que no se podrían haber obtenido usando únicamente especies modelo (Armengaud et al. 2014). Uno de estos grandes avances es el uso de la secuenciación de nueva generación (NGS, *Next-generation sequencing*), también denominada Secuenciación Paralela Masiva. Debido a la gran revolución en la era "ómica", se pueden estudiar una gran variedad de especies, tanto a nivel genómico como transcriptómico (Huang et al. 2016). La tecnología de NGS lee todo el genoma/transcriptoma de forma aleatoria, acompañado de la rotura de éste en pequeñas piezas y luego ligándolas a determinados adaptadores, para realizar una lectura al azar del ADN/ARN sintetizado. El estudio del transcriptoma mediante NGS se denomina RNA-Seq (Secuenciación del ARN).

1.4.1 RNA-seq en organismos no-modelo

La secuenciación del ARN ha revolucionado el estudio del transcriptoma. Es una herramienta altamente sensible y precisa para medir la expresión a través del transcriptoma, posibilitando a los investigadores detectar cambios que previamente habrían pasado desapercibidos. Permite la detección de características conocidas y nuevas en un simple ensayo, logrando la detección de isoformas, genes fusionados, variantes de nucleótido simple (SNP) y otras características sin la limitación del conocimiento previo.

La tecnología de RNA-Seq representa un set de métodos experimentales que genera una biblioteca de secuencias de ADNc (ADN copia), generada a partir de todas las moléculas de ARN. Estas secuencias son generadas de forma fragmentada, con adaptadores en cada extremo. Cada fragmento es así secuenciado, de manera altamente eficiente, para obtener secuencias cortas. Las lecturas son típicamente de una longitud de entre 30 y 400 pares de bases, y cualquier tecnología de secuenciación de alto rendimiento puede ser utilizada. Algunas de ellas son: Illumina IG18-21, Applied Biosystems SOLID y Roche 454 Life Science (Wang et al. 2009).

La secuenciación del transcriptoma permite obtener la expresión génica para un tipo celular, bajo un estímulo determinado, en un momento de tiempo dado. Permite, además, cuantificar los niveles de abundancia o cambios relativos para cada transcripto durante un estadio del desarrollo determinado o bajo un tratamiento específico (Han et al. 2015).

En el caso de los organismos considerados no-modelo, la tecnología de RNA-Seq permite obtener información genómica mediante un proceso relativamente accesible desde el punto de vista económico, y considerando la relación costo-beneficio. Por lo tanto, no solamente se puede acceder a las secuencias de los genes de interés, sino que también se puede obtener información sobre sus niveles de expresión, sin tener un conocimiento previo. Esto se debe a que la secuenciación masiva permite trabajar con o sin un genoma de referencia. En el caso de no contar con un genoma de referencia se puede ensamblar el transcriptoma *de novo*, gracias al avance de herramientas computacionales como el programa Trinity (Grabherr et al. 2011) (Figura 1.12).

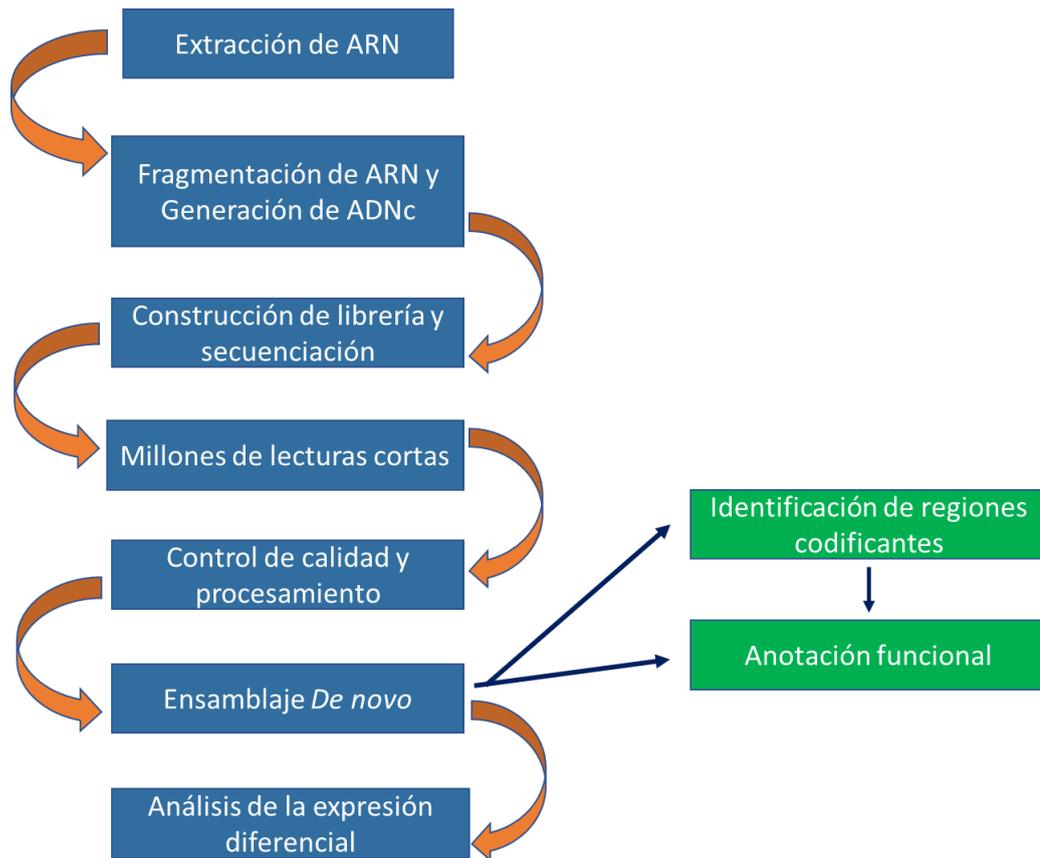


Figura 1.12: Flujo de trabajo en RNA-Seq. Se presentan los pasos generales a seguir en el desarrollo de un ensamblaje *de novo*, mediante secuenciación masiva del transcriptoma.

1.4.2 *Rhinella arenarum*: un organismo no-modelo

La especie *Rhinella arenarum* (Hensel 1987) se encuentra ampliamente distribuida en todo el territorio sudamericano (Devillers y Exbrayat, 1992), en el país (Kwet et al. 2004) y en la región del Comahue. Su ciclo de vida abarca dos etapas fundamentales antes de alcanzar el estado adulto: la embrionaria y la larval. El dimorfismo sexual en los ejemplares adultos se reconoce fácilmente dado que los machos son de menor tamaño, presentan una coloración verde-azulada a la altura del saco vocal, una formación particular en el pulgar de coloración negra o parda llamado “callo nupcial”, que favorece el abrazo durante el acto sexual, y porque además croan. El callo nupcial posee terminaciones nerviosas que permiten captar las vibraciones latero-abdominales que tanto la hembra como el macho presentan durante el apareamiento (Pisanó y Rengel, 1982). La hembra realiza la deposición de los huevos (ovocitos) en el agua mientras que el macho los fertiliza abrazado a la hembra mientras nadan, por lo que tanto la fecundación

como el desarrollo embrionario son externos. En cada ovoposición pueden contarse de 30000 a 40000 ovocitos que se disponen en forma espiralada en el interior de una sustancia gelatinosa denominada “ganga”. Desde un punto de vista experimental, la fertilización y el desarrollo embrionarios externos facilitan su seguimiento y evaluación. Además, estas características determinan que los embriones sean blancos accesibles para sustancias contaminantes.

La reproducción fisiológica de la especie se lleva a cabo una sola vez al año, en primavera. En la región del Alto Valle, el apareamiento ocurre durante los meses de septiembre, octubre y noviembre en lugares de remanso de las costas de los ríos y en canales de riego, coincidiendo con el período de mayor aplicación de plaguicidas (INTA, 1993) y en sitios en los cuales se ha detectado la presencia de diversos compuestos (Loewy et al. 2011). Esto implica que tanto el desarrollo embrionario como el larval podrían estar expuestos, al menos transitoriamente, a concentraciones elevadas de estos tóxicos. Esta situación constituye un peligro potencial para la especie, que justifica la inclusión de la misma en protocolos de evaluación de riesgo. El desarrollo embrionario de los anfibios representa el arquetipo del desarrollo de los vertebrados. El gran tamaño de los ovocitos de sapos y ranas (1-2 mm), la fecundación y el desarrollo embrionario externos que facilitan el estudio experimental en cualquier estadio, el gran número de individuos obtenidos simultáneamente en cada ovulación, la posibilidad de inducir hormonalmente a las hembras y realizar fertilizaciones y desarrollos embrionarios *in vitro* sin necesidad de agregar nutrientes, la transparencia de la ganga que facilita la observación, la posibilidad de su remoción química o quirúrgica y la factibilidad de realizar microcirugías y microinyecciones en los embriones, transforman al desarrollo embrionario de sapos y ranas en un sistema experimental único para estudios embriológicos básicos y toxicológicos (Slack and Forman 1980).

1.4.2.1 Estadios embrionarios

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

y Sirlin (1952). El primer estadio corresponde a la fertilización del ovocito, que conlleva la rotación del embrión y deja el polo animal hacia arriba. En el segundo estadio se produce la expulsión del segundo glóbulo polar y aparece la media luna gris en el córtex ovular. La media luna gris es poco visible en *R. arenarum* debido a la coloración oscura propia de los embriones y es la zona donde aparecerá posteriormente el labio dorsal del blastoporo durante la gastrulación. Los estadios 3 a 9 corresponden a la fase de segmentación hasta la formación de la blástula tardía, con blastómeros cada vez más pequeños y predominio del polo animal sobre el vegetal. En el estadio 10 se inicia la gastrulación y es evidente el labio dorsal del blastoporo; la gastrulación se completa con la invaginación gradual del tapón vitelino en los dos estadios siguientes. La fase de neurulación abarca los estadios 13 a 16 y comienza con la aparición de la placa neural en la región dorsal del embrión. Luego se observa la elongación antero-posterior del embrión y la formación del surco neural. Además, el embrión posee un movimiento dentro de la membrana vitelina (rotación, estadio 15), presentando un acercamiento paulatino de los pliegues neurales hasta que se contactan. Finalmente, se completa el cierre del tubo neural y el embrión comienza a desarrollar en forma distinguible la cabeza. Los estadios 17 al 20 se diferencian en base al desarrollo de la aleta caudal y las branquias externas. El estadio 17 es el de **brote caudal (BC; 3 días post-fertilización)** (Figura 1.13, B). Dichos embriones poseen 4 mm de longitud y es fácil separarlos de su envoltura gelatinosa en el laboratorio. El cuerpo es ovalado y en la porción más caudal se encuentra un esbozo de la futura aleta caudal. La glándula adhesiva comienza a ser visible en este estadio. Los embriones utilizan secreciones pegajosas provenientes de esta glándula transitoria con fines de estabilización, ya que aún no han desarrollado el disco oral ni la aleta caudal que les permitirán una mayor locomoción y adhesión cuando sean nadadores activos. El estadio 18 es reconocido por los movimientos musculares espasmódicos de los embriones que les permiten eclosionar desde sus envolturas gelatinosas. Además, su aleta caudal se encuentra bien definida y los botones branquiales muestran un aspecto acanalado. El estadio 19 se reconoce por la aparición del latido cardíaco, mientras que en el estadio 20 es posible visualizar la corriente sanguínea en los filamentos branquiales. Los estadios siguientes abarcan la transición hacia la larva, con capacidad de ingerir alimentos y nadar libremente. En el estadio 21 los ojos se distinguen bien y se produce la apertura de

la boca, por lo que el estadio se denomina **boca abierta (BA; 7 días post-fertilización)** (Figura 1.13, C). Esta característica determina que los embriones en BA, de 7 mm de longitud, estén en condiciones de alimentarse. En el estadio 22 los bordes de la aleta caudal se vuelven transparentes y es posible observar la circulación sanguínea en ella. Los estadios 23 a 25 marcan el desarrollo de los opérculos y la desaparición de las branquias externas. En el estadio 24 se ha cerrado el opérculo del lado derecho. El estadio 25, denominado **opérculo completo (OC; 10 días post-fertilización)** (Figura 1.13, D), se caracteriza por la completa reabsorción de las branquias externas. Los embriones control en OC tienen una longitud de 10 mm y la porción anterior del embrión es redondeada y se encuentra bien diferenciada respecto de la porción posterior constituida por la aleta caudal.

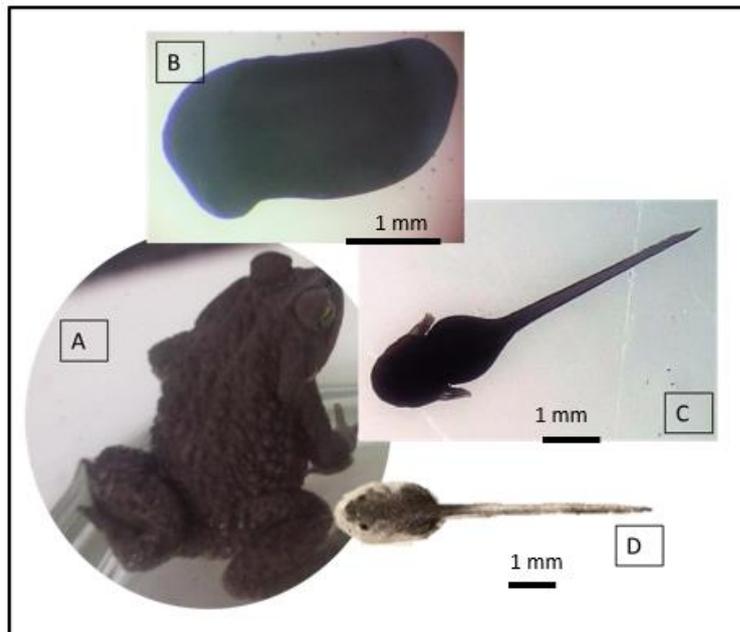


Figura 1.13: Estadios de *R. arenarum*. Fotografía de un ejemplar adulto (A), un ejemplar en estadio de brote caudal (BC) (B), en estadio de boca abierta (BA) (C) y en estadio de opérculo completo (OC) (D).

1.4.3 Biomarcadores en *Rhinella arenarum*

1.4.3.1 Biomarcadores

Los biomarcadores se definen como indicadores en sistemas biológicos o muestras, con cambios medibles a nivel molecular, bioquímico, celular, fisiológico, patológico o a nivel de comportamiento en la respuesta a un xenobiótico. El grupo de los Institutos Nacionales de Salud (*NIH, National Institutes of Health*) ha definido a los biomarcadores como “una característica que objetivamente mide y evaluada funciona como un indicador de los procesos biológicos normales o de la respuesta farmacológica a un agente terapéutico”. En el ámbito de la toxicología, se los puede clasificar como marcadores de exposición, de efecto y de susceptibilidad. De acuerdo con Gupta (2014), los biomarcadores deben ser específicos, acertados, sensibles, válidos, biológica o clínicamente relevantes y fáciles y rápidos de medir, para poder ser utilizados como herramientas útiles y predictivas para testear la toxicidad y estimar el nivel de exposición y dosis.

Los biomarcadores tienen utilidad en el campo de los plaguicidas, metales, micotoxinas y drogas. Se los puede agrupar en los tres tipos mencionados, considerando que son indicadores del estado biológico que arroja información sobre la exposición de un organismo a un xenobiótico, el efecto de la exposición de dicho organismo o la susceptibilidad del mismo a ese xenobiótico.

1) Biomarcadores de exposición: sirven para determinar cuánto estuvo expuesto el organismo a un xenobiótico determinado, debido a que la presencia del xenobiótico o sus metabolitos se encuentran en muestras biológicas del individuo monitoreado.

2) Biomarcadores de efecto: se utilizan para determinar el efecto o la respuesta de la exposición de un organismo a un xenobiótico determinado.

3) Biomarcadores de susceptibilidad: desarrollados para predecir la susceptibilidad o resistencia de un organismo a los efectos deletéreos de un xenobiótico específico.

Por otra parte, el desarrollo de biomarcadores específicos para diferentes tóxicos se ve actualmente reforzado a partir de la integración y generación de distintos datos “ómicos”. Por ello, las tecnologías de secuenciación masiva aplicadas a organismos no-modelo como *R. arenarum*, son herramientas útiles para obtener un panorama más completo y así entender los mecanismos de acción de un tóxico determinado (Ceschin 2017).

1.4.3.2 Estudios de biomarcadores desarrollados en *Rhinella arenarum*

Las características de desarrollo que presentan los anfibios hacen que puedan estar expuestos a una amplia gama de contaminantes. Esto se debe a que durante sus primeros estadios de vida se desarrollan en el agua y durante su vida adulta en la tierra, mientras mantienen un estrecho contacto con el medio acuático. Además, el pasaje continuo de agua a través de sus branquias durante estadios embrionarios y larvales, y su especial sensibilidad a los productos químicos durante esta etapa de vida acuática, hace que los anfibios sean buenos indicadores de las condiciones generales del entorno. Debido a que la mayoría de las especies de anfibios son susceptibles a xenobióticos durante la fertilización y el desarrollo temprano, los biomarcadores de exposición, efecto y susceptibilidad son apropiados para conectar la presencia de contaminantes en el medio ambiente con su acción en un organismo. Por ello, los biomarcadores ayudan a evaluar el estado de salud de las poblaciones de anfibios, actuando como puntos finales de intoxicación subletales (Venturino et al. 2003).

En estudios realizados con plaguicidas organofosforados y carbamatos en embriones de *R. arenarum*, se pudieron observar cambios morfológicos, como la reducción del tamaño corporal, el plegado de la aleta caudal, la flexión de la notocorda y una pigmentación anormal (Rosenbaum et al. 1988; Ferrari et al. 2007; Lascano et al. 2009, 2011; Sotomayor et al. 2012, 2015; Liendo et al. 2015). Además, se ha observado que los insecticidas malatión, metilazinfos y lindano afectan los niveles de GSH en embriones y larvas de *R. arenarum* (Venturino et al. 2001; Anguiano et al. 2001).

También se han estudiado aspectos relacionados al estilo de vida, tipo de reproducción y la capacidad de sobrevivir en individuos de *R. arenarum* expuestos a plaguicidas ya sea de forma directa o indirecta. Por un lado, Babini et al. (2018), han visto que los individuos de *R. arenarum* que habitan en agroecosistemas poseen oviposiciones más pequeñas, con una mayor frecuencia de embriones anormales y mayor mortalidad. Los autores confirman así la gran sensibilidad de los estadios embrionarios frente a los disturbios ambientales, apoyando también su uso como indicadores de la salud del ambiente. Por otra parte, se ha observado que en larvas expuestas a concentraciones subletales de CLP podría verse afectada su aptitud y supervivencia. Si bien se analizaron concentraciones no letales, se produjeron efectos tóxicos debido a cambios en la temperatura,

pudiendo en última instancia reducir la supervivencia larval y disminuir la población (Quiroga et al. 2019).

Se han estudiado también algunos procesos a nivel molecular en el desarrollo de *R. arenarum*. En un estudio con embriones en estadio de gástrula, expuestos a diferentes concentraciones de CLP, se ha encontrado que existe una respuesta temprana al estrés oxidativo, que podría estar ligada a la vía de activación de MEK y de regulación de c-FOS (Sotomayor et al. 2015). Por otra parte, en embriones y larvas expuestas a concentraciones subletales de arsénico, se pudo observar que éste regularía la expresión de enzimas detoxificantes como GST. Esta regulación se daría a través de la expresión y cambio de localización subcelular, de las proteínas de la ruta MAPK, MEK y ERK, desde etapas embrionarias hasta el desarrollo larvario avanzado, aumentando también la expresión de factores de transcripción, como c-FOS y c-JUN (Mardirosian et al. 2017).

Los niveles de poliaminas también han sido evaluados como biomarcadores de los efectos de plaguicidas sobre embriones y larvas de *R. arenarum*. Se ha observado una disminución de los niveles de poliaminas en etapas embrionarias y un aumento en la concentración de putrescina al final del desarrollo embrionario como una respuesta de recuperación (Venturino et al. 2001). También se ha observado un aumento de putrescina, mediante inducción de ODC, en embriones expuestos a concentraciones letales y subletales de MAZ (Lascano et al. 2011). En embriones expuestos a concentraciones subletales de CLP, se ha visto que los niveles de Put y Spd disminuyen un 33 y 42 %, respectivamente, lo que sugiere una disminución de la actividad de ODC por acción del plaguicida (Sotomayor et al. 2012). Por lo tanto, las poliaminas podrían ser biomarcadores útiles de efecto de plaguicidas y respuestas de recuperación durante el desarrollo de los anfibios, dependiendo de la fase y el nivel de exposición.

En cuanto a estudios de campo en *R. arenarum*, Rosenbaum et al. (2012). evaluaron las respuestas de diversos biomarcadores en larvas desarrolladas en canales de agua durante la temporada de producción de frutas. Se reportó una inhibición de las enzimas acetilcolinesterasa y carboxilesterasas luego de una semana de exposición adentro de los canales potencialmente receptores de diversos plaguicidas, mientras que aumentaron los niveles de GSH y de GST.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

La exposición de embriones de *Rhinella arenarum* a insecticidas organofosforados conduce a la expresión diferencial de genes relacionados con la respuesta frente al estrés. Estos genes involucrarían distintos tipos de respuestas, como los mecanismos de respuesta antioxidante y la modulación de la vía de poliaminas, al igual que la regulación corriente arriba (“*upstream*”) de factores de transcripción. Esto permite su utilización como biomarcadores moleculares tempranos de exposición al tóxico.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo general

Identificar y desarrollar biomarcadores moleculares en *Rhinella arenarum* que se relacionen en forma temprana con efectos tóxicos por exposición a plaguicidas organofosforados.

2.2.2 Objetivos específicos

1. Estudiar los efectos de plaguicidas organofosforados sobre la expresión de transcritos que codifican a factores de transcripción, efectores de vías de fosforilación, estrés oxidativo y enzimas de la vía de poliaminas en embriones de *R. arenarum*. Para ello se requiere:
 - a. Desarrollar los cebadores necesarios para analizar la expresión genética en *R. arenarum* por técnicas como RT-PCR y qRT-PCR.
 - b. Optimizar las técnicas de amplificación genética y de detección.
2. Estudiar a nivel bioquímico los efectos de plaguicidas organofosforados sobre la síntesis y degradación de poliaminas y su relación con el estrés oxidativo.
3. Identificar blancos moleculares como potenciales biomarcadores de respuesta temprana frente a la exposición a plaguicidas organofosforados.

3. METODOLOGÍA DE TRABAJO

3.1 Materiales

3.1.1 Material biológico

Hembras y machos adultos de sapo de la especie *Rhinella arenarum* (Hensel 1867) fueron recolectados en los lagos Mari Menuco (-38.611016, -68.468470) y Los Barreales (-38.509980, -64.960498), ubicados a 80 y 120 Km, respectivamente, de distancia de la ciudad de Neuquén (Figura 3.1). Dichas zonas fueron seleccionadas porque constituyen áreas de referencia libres de aplicación de plaguicidas. Los animales fueron mantenidos en cautiverio a la intemperie, durante 24-48 h, en un pequeño recinto (debidamente aislado y ventilado), con pasto, hojarasca, alimento y agua hasta ser utilizados. Todos los animales utilizados fueron mantenidos y tratados para aliviar su sufrimiento, de acuerdo a las recomendaciones de la Guide for Care and Use of Laboratory Animals (2011).

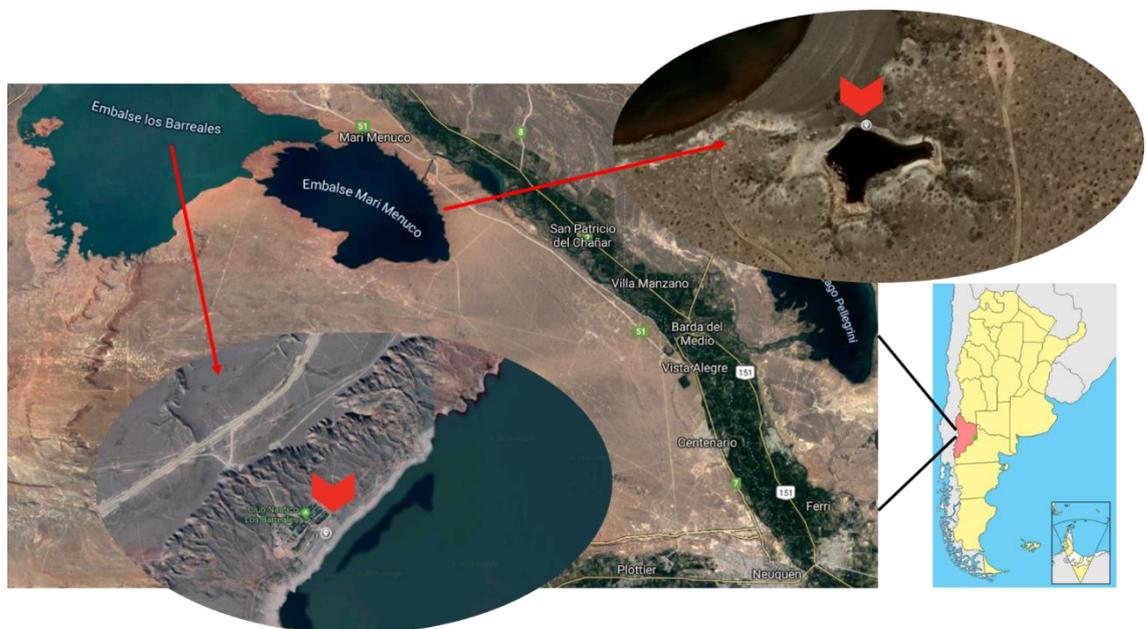


Figura 3.1: Imagen satelital de los sitios de recolección de especímenes adultos de *R. arenarum*. Las flechas rojas indican los sitios de recolección (Lago Mari Menuco: -38.611016S, -68.468470O; Lago Barreales: -38.509980S, -64.960498O) de los ejemplares utilizados en la tesis.

3.1.2 Material químico

Los plaguicidas organofosforados utilizados, metilazinfos y clorpirifós (MAZ y CLP; 99% pureza) fueron comprados a Chem Service (West Chester, PA, USA). El cloruro de dansilo 1,7-diamino heptano, espermina, putrescina, N¹-acetilespermina, luminol, HRP y la albúmina de suero bovino fueron comprados a Sigma (St. Louis, MO, USA). Los dNTPs, Kit de PCR (Taq Polimerasa, Buffer 10X y MgCl₂), marcador de peso molecular de ácidos nucleicos, el kit PURO ADN CLEAN UP y el kit Puro Gel Extraction fueron comprados a Productos Bio-lógicos (PB-L, Quilmes, Buenos Aires, Argentina). El Quick-Zol fue comprado a Kalium Technologies (Bernal, Buenos Aires, Argentina). El clorpirifós radioactivo C¹⁴ fue provisto por la International Atomic Energy Agency (IAEA), Viena. Los cebadores, oligo-dt fueron encargados a Macrogen (Geumcheon-gu, Seoul, República de Korea) y Tecnolab (Buenos Aires, Argentina). El kit de qPCR (iQtm SYBR® GREEN SUPERMIX) fue comprado a Bio-Rad (California, USA). El Kit de retrotranscripción Revert Aid® (Retrotranscriptasa, buffer de reacción 5X), RNA Later®, DNAsa kit (DNAsa, Solución stop y Buffer de reacción) fueron comprados a Thermo Fisher Scientific. Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

3.2 Métodos

3.2.1 Fertilización *in vitro* de embriones de *Rhinella arenarum*

Se realizaron tres experimentos a partir de ovulaciones independientes para cada parámetro a analizar, utilizando parejas distintas de sapos adultos. Las hembras fueron aclimatadas durante 24 h a 20-23°C. Su ovulación se indujo por inyección intraperitoneal de 2500 UI de gonadotrofina coriónica humana. Alrededor de 12-17 h después de la inyección se produjo la ovulación de las hembras, con la ayuda de masajes abdominales para estimular la liberación de los ovocitos. La fertilización *in vitro* de los ovocitos fue realizada pincelando a los mismos con un macerado de testículos de macho (Figura 3.2) (Ferrari et al. 2008).

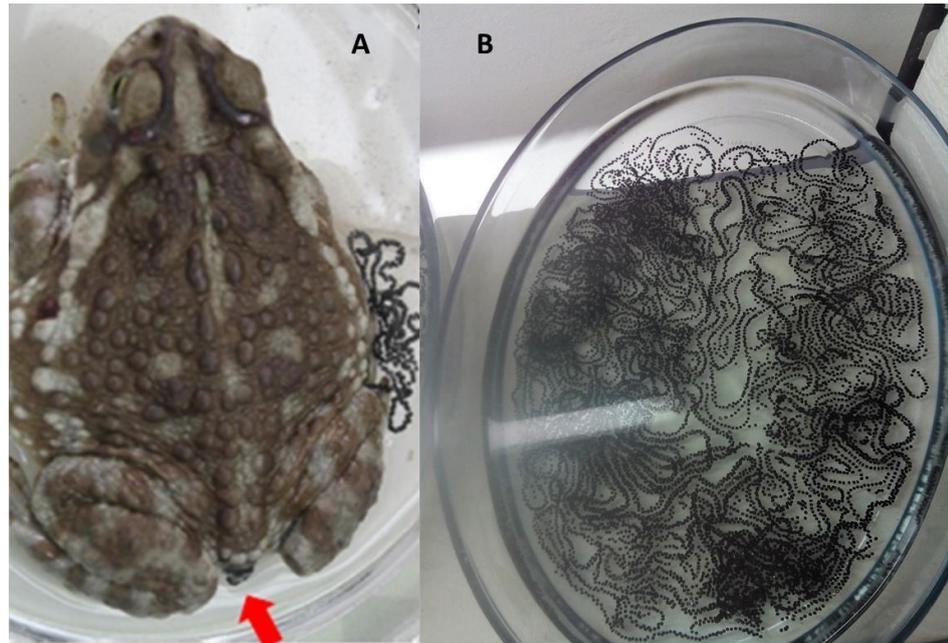


Figura 3.2: Ovulación de *R. arenarum*. Se observa un ejemplar de hembra adulta en proceso de ovulación, la flecha señala la cloaca llena de ovocitos (A). En B se observan las ristras de ovocitos fecundados, colocados en bandejas de vidrio con medio de anfibios Ringer.

3.2.2 Preparación y control de soluciones estándar de metilazinfos y clorpirifós

Se prepararon soluciones estándar de MAZ de 18 g L^{-1} y de CLP de 1 g L^{-1} . Los insecticidas fueron pesados y disueltos en un volumen apropiado de acetona calidad pro-análisis de residuos de plaguicidas. Las concentraciones de las soluciones estándar fueron controladas por cromatografía gaseosa acoplada a un detector nitrógeno-fósforo (GC-NPD).

3.2.3 Exposición a plaguicidas organofosforados

Se llevaron a cabo dos tipos de exposiciones: por un lado, se realizaron exposiciones crónicas para estudios bioquímicos y moleculares; y por otro, se realizaron exposiciones agudas para estudios moleculares y de toxicocinética.

3.2.3.1 Exposiciones crónicas con embriones:

Los embriones obtenidos fueron expuestos desde fertilización en grupos de entre 400 y 800 individuos en bandejas de vidrio, y hasta desarrollo embrionario completo (Del Conte y Sirlin, 1952). Se realizaron exposiciones a diferentes concentraciones de plaguicidas organofosforados, en una relación de 1 embrión/mL de medio de Ringer de anfibios. Para ello se utilizó un esquema semiestático, de acuerdo con la metodología habitual del laboratorio para estudios toxicológicos con embriones, con renovación de medio cada 48 h, en un régimen de 12 h de luz-12 h de oscuridad y a una temperatura controlada de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Los embriones fueron expuestos a dos concentraciones subletales de metilazinfos de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ y 2 mg L^{-1} (siendo 40 y 10 veces más bajas, respectivamente, que la $\text{LC}_{50-96 \text{ h}}$ para embriones); y una concentración letal de 9 mg L^{-1} (2 veces más baja que la $\text{LC}_{50-96 \text{ h}}$ para embriones) (Anguiano et al, 2002; Ferrari et al, 2004). Además, se realizaron exposiciones a dos concentraciones subletales de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ y 1 mg L^{-1} de clorpirifós (siendo 40 y 20 veces más bajas que la $\text{LC}_{50-96 \text{ h}}$) (Sotomayor et al, 2012). En cada ensayo se colocaron además bandejas con embriones no expuestos como controles, con una concentración final de 0,3% de acetona. Todos los tratamientos fueron realizados por duplicado en cada experimento. Las soluciones de trabajo se prepararon diluyendo la solución estándar concentrada del principio activo preparada en acetona y controlada por GC-NPD, en un volumen apropiado de solución Ringer de anfibios ($0,65 \text{ g L}^{-1}$ NaCl; $0,01 \text{ g L}^{-1}$ KCl; $0,02 \text{ g L}^{-1}$ CaCl_2) (Figura 3.3). Tanto el material de laboratorio utilizado durante los experimentos como el medio líquido que contenía el plaguicida fueron adecuadamente descontaminados por hidrólisis básica con una solución diluida de NaOH técnico, y luego el material de vidrio fue sonicado en agua con detergente alcalino (Extran®, Merck).

3.2.3.2 Exposiciones agudas con larvas:

Para estudios moleculares de qPCR y RNA-Seq se realizaron exposiciones agudas de larvas de *R. arenarum* a 24 h. Para los estudios con qPCR se realizaron exposiciones a concentraciones subletales de CLP y MAZ ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$ y 1 mg L^{-1}), mientras que para los estudios de RNA-Seq se realizaron exposiciones a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de MAZ y $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ CLP. En ambos casos se utilizaron larvas a 10 días de alcanzado el estadio de OC. Las exposiciones se realizaron nuevamente

en bandejas de vidrio manteniendo la relación 1 larva/10mL, conteniendo las diferentes concentraciones de los plaguicidas, por duplicado. Se tomaron 5-10 larvas por bandeja a diferentes tiempos: 6, 12 y 24 h para los estudios con qPCR; y 6 y 24 h para los estudios de RNA-Seq. Además, se mantuvo una población control con medio Ringer y acetona al 0,3%.



Figura 3.3: Exposiciones a plaguicidas OF. En la imagen se observan las distintas exposiciones realizadas a MAZ y CLP en sus diferentes concentraciones. Los embriones fueron colocados en bandejas de vidrio con medio Ringer.

3.2.4 Toma de muestras y almacenamiento

En el caso de las exposiciones crónicas se evaluó el desarrollo embrionario en todos los tratamientos y los estadios fueron asignados de acuerdo con Del Conte y Sirlin (1952). Se monitoreó la mortalidad y los individuos muertos fueron removidos. El criterio de mortalidad utilizado fue la ausencia de latido cardíaco y/o de circulación sanguínea en branquias y aleta caudal en embriones tardíos que ya hubieran superado el estadio de latido cardíaco. En embriones en estadios previos, se consideraron muertos aquellos individuos que se detuvieron en su desarrollo y no progresaron al estadio embrionario siguiente. Además, se monitorearon las alteraciones morfológicas utilizando una lupa estereoscópica con aumentos del 4X al 40X, realizando un registro fotográfico de las principales alteraciones encontradas.

Las muestras de embriones control y expuestos a ambos OF fueron colectadas en tres estadios embrionarios diferentes: brote caudal, (BC), boca abierta (BA) y opérculo completo (OC) (Figura 3.4). Cada muestra comprendió un

total de 50 embriones en el estadio de BC o de 25 en estadio de BA y OC para los estudios bioquímicos, mientras que para los análisis moleculares se almacenaron 10 individuos por muestra para cada estadio embrionario y 5 individuos para el estadio larval. Todos los embriones muestreados fueron lavados tres veces con solución Ringer fría, colocados en tubos de 1,5 mL y guardados en freezer a -20 °C hasta ser procesados. Oportunamente se indica, para cada ensayo realizado, en qué solución buffer fueron guardadas las muestras y cómo se retomó el protocolo de procesamiento.

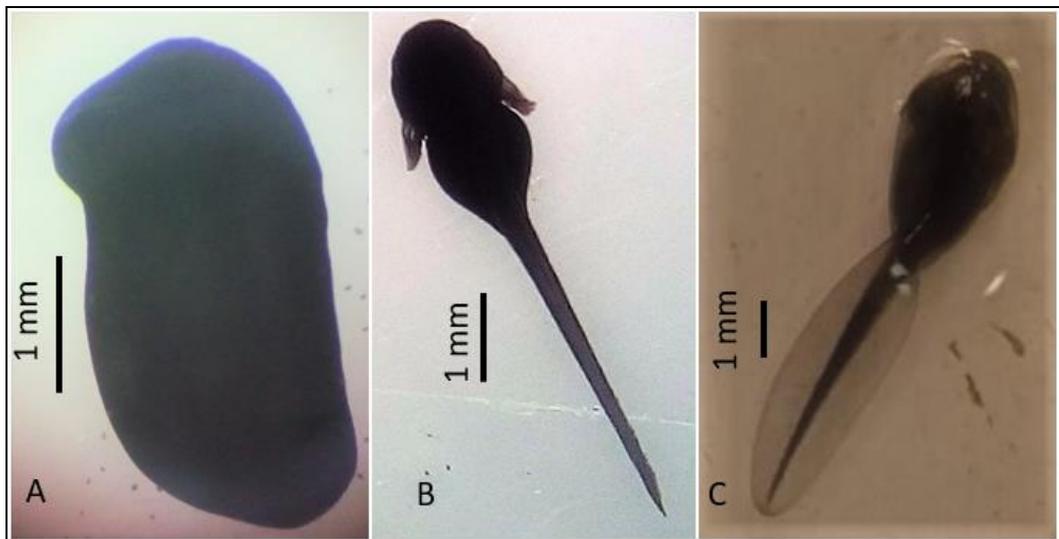


Figura 3.4: Estadios embrionarios en los que se tomaron muestras. Se observan los estadios embrionarios en los cuales se tomaron las muestras para estudiar los diferentes parámetros analizados en la tesis: A) Brote caudal; B) Boca abierta; C) Opérculo completo.

3.2.5 Estudios bioquímicos

3.2.5.1 Estudios del metabolismo de poliaminas:

Para estos estudios se utilizaron embriones en estadio de BC, BA y OC, expuestos a MAZ y CLP. Se midió la actividad de APAO, DAO y SMOX, enzimas de degradación oxidativa de poliaminas, de acuerdo con la técnica de Goodwin et al. (2011), con modificaciones. Dicha técnica se basa en el acoplamiento de la producción de H_2O_2 por SMOX, APAO o DAO con la generación de quimioluminiscencia como consecuencia de la oxidación del luminol, catalizada por la peroxidasa del rábano (HRP). Las muestras fueron homogeneizadas en 1

mL de buffer fosfato de potasio 143 mM pH 7,5, con 6,3 mM de EDTA-Na₂ (buffer PIK). Los homogenados fueron centrifugados a 10000 x g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante fue utilizado como fuente enzimática. Como buffer de reacción se utilizó Tris-HCl 100 mM, pH 8. Además, se utilizaron luminol 0,25 mM, peroxidasa de rábano (HRP, 0,5 U) y el sustrato correspondiente para medir cada una de las actividades enzimáticas. Para medir la actividad de SMOX se utilizó espermina 1,5 mM; para APAO se utilizó 1,5 mM de N¹-acetilespermina; y para DAO se usó 1,5 mM de putrescina. La cuantificación de la luminiscencia en tiempo real y determinación de la actividad se llevó a cabo con un espectrofotómetro de fluorescencia (λ_{Ex} = 0; λ_{Em} = 500).

3.2.5.2 Niveles de poliaminas libres y conjugadas

Se utilizó la técnica de Schenkel et al. (1996) para determinar los niveles endógenos de poliaminas en embriones de *R. arenarum*. Para ello, las muestras fueron guardadas en 1 ml de buffer PIK a -20°C. Luego de homogenizarlas, se agregó a cada tubo ácido perclórico 1 N en cantidad suficiente para alcanzar una concentración final de 0,2 N y se mezcló por agitación. Las muestras se colocaron durante 60 min en baño de hielo y fueron centrifugadas a 3000 x g durante 10 minutos, sin necesidad de refrigeración. El sobrenadante, conteniendo poliaminas libres, fue derivatizado con 20 mg mL⁻¹ de cloruro de dansilo. A fin de determinar la concentración de poliaminas libres, los derivados secos se volvieron a disolver en 200 μ l de acetonitrilo antes de ser inyectados en un HPLC en fase reversa utilizando acetonitrilo puro como solvente para la separación de las poliaminas dansiladas. Las poliaminas libres fueron cuantificadas por fluorimetría con una λ de excitación de 342 nm y una λ de emisión de 512 nm (Cochón et al. 2002) con un detector de fluorescencia. Las muestras fueron eluidas con un gradiente lineal a partir de acetonitrilo 40% en agua hasta acetonitrilo 100% a una tasa de 1 mL min⁻¹. Para medir las poliaminas conjugadas, los extractos con ácido perclórico fueron mezclados con HCl 12 N (1:1), seguido de incubación a 70°C durante 24 h para lograr la hidrólisis ácida. Las muestras se dejaron secar hasta evaporación completa. El residuo remanente fue disuelto en HClO₄ al 5% y se realizó la derivatización con cloruro de dansilo como se describió anteriormente. Se utilizó una columna LUNA[®] de fase reversa, de 250 mm x 4 mm, 5 μ m de tamaño de partícula (Phenomenex, CA, USA). Se utilizó 1,7-diamina heptano como estándar

interno de calibración de las muestras.

3.2.6 Estudios moleculares

3.2.6.1 Uso de los datos obtenidos por secuenciación masiva del transcriptoma de *Rhinella arenarum*

Las larvas utilizadas en la exposición aguda, mencionada en la sección 3.2.3.2, fueron utilizadas para realizar un experimento de secuenciación masiva del transcriptoma de *R. arenarum*. Se tomaron muestras a las 6 y 24 h y luego fueron guardadas en RNA Later® a -20°C hasta su utilización y procesamiento. A partir de este estudio se obtuvieron las secuencias de referencia de la totalidad del ARNm expresado en *R. arenarum*. Las secuencias de referencia obtenidas fueron asignadas y anotadas con su correspondiente gen, trabajo realizado por el Dr. Danilo Ceschin (Investigador Asistente de CONICET). Las secuencias se encuentran disponibles en <http://rhinella.uncoma.edu.ar/>.

3.2.6.2 Depuración de secuencias anotadas en el transcriptoma mediante herramientas bioinformáticas

A partir de los transcriptomas de *R. arenarum* para los diferentes tratamientos, se analizaron minerías de datos para evaluar las exposiciones diferenciales de transcritos de interés de acuerdo a los objetivos de esta tesis.

Debido a que se obtuvieron más de dos constructos para cada transcritos de interés (Tabla 3.1), las secuencias obtenidas mediante RNA-seq debieron ser controladas y depuradas con el uso de distintas herramientas bioinformáticas, disponibles *online* en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Tabla 3.1: Número de transcritos obtenidos mediante RNA-seq para cada gen de interés.

NOMBRE DEL GEN	N° de Transcritos
CAT	23
ODC	6
SOD	43
GR	8
GST-Pi	6
NRF2	2
c-JUN	4
JNK	2
c-FOS	12
APAO	2
DAO	3
AMD1(SAMDC)	2
SMOX	2

Las herramientas utilizadas fueron:

ORF FINDER (Open Reading Frame, ORF): Es una herramienta encargada de buscar marcos de lectura abiertos en la secuencia de ADN que se inserta. El programa arroja el rango de cada ORF, junto con su traducción en aminoácidos. Es muy útil para encontrar secuencias nuevas para potenciales segmentos codificadores de proteínas, verificando la proteína predicha mediante el uso de SMART BLAST y BLASTP. Se tomaron en este caso los valores por defecto, donde la herramienta considera únicamente los sitios “ATG” como puntos de inicio del codón y el largo mínimo de los ORF de 75 nt (nucleótidos).

Acceso a ORF Finder a través de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>

SMART BLAST: se encarga de procesar la secuencia proteica para presentar un resumen conciso de las 5 mejores coincidencias, tomando como referencia las secuencias descritas de diferentes especies cargadas en las bases de datos de BLAST, que incluye los proteomas de 27 genomas.

Acceso a SMART BLAST a través de:

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/smartblast/smartBlast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastDocs

BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*): se encarga de encontrar regiones de similitud entre secuencias biológicas. El programa puede comparar tanto nucleótidos (blastn), como proteínas (blastp), como así también traducir las secuencias nucleotídicas a proteína (blastx) para luego buscar secuencias con similitud. Las comparaciones se realizan contra diferentes bases de datos y se calcula la significancia estadística.

Acceso a BLAST a través de: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

3.2.6.3 Diseño de cebadores específicos

Una vez depuradas las secuencias, se diseñaron cebadores para amplificar las regiones de interés y secuenciarlas a fin de obtener una corroboración fehaciente de las mismas. Se obtuvieron resultados positivos en algunos constructos. Por esta razón, a la hora de diseñar los cebadores para las secuencias seleccionadas, se tuvieron en cuenta tanto los resultados de la herramienta *Primer3* como del *PrimerBLAST*. Se diseñaron cebadores para los siguientes genes: AMD1 (SAMDC), ODC, APAO, DAO, SMOX, SOD, c-JUN, GST-Pi, NRF2, c-FOS, JNK, GR (GSH en la Tabla 3.2) y CAT (Tabla 3.2).

Tabla 3.2: Cebadores diseñados para secuenciar y corroborar el transcriptoma.

Cebador	Secuencia	FOS_R_RA	ACTCCTGGGTTCCGGGATAA
ODC_F_RA	CTGGTAGGTCGAAACGCTCA	GSH_F_RA	CCCATTTTGATAGCGACGGC
ODC_R_RA	ACTTCCAGTTGACTCCGGC	GSH_R_RA	GGCAGAGCACTTTTGACACC
PAO_F_RA	AGGGCCATCTGCTCTTTCAC	GSTPI_F_RA	CACCAGGTTGTAGTCGGCAA
PAO_R_RA	CGTGGACGAGGCTTGTAAC	GSTPI_R_RA	GGCAGCCCTCATAGACATGG
DAO_F_RA	GAGGGCCTATTGGAGACGTG	SOD_F_RA	GTCCAGTTGGGGCTCTTACC
DAO_R_RA	AATGCAGTGGACGACCTGTT	SOD_R_RA	TGTGCTGGTACAGCAGTAAAC
SMOX_F_RA	TCCTTCTGGAGAACCCTTT	NRF2_F_RA	AGAAGGAATTGTACCCGCCG
SMOX_R_RA	TGTGGTACGAAAACGCGTCA	NRF2_R_RA	GATGTCCTGACCAAAGCCA
AMD1_F_RA	ATGAGGCCAAGACCGTCAAC	JUN_F_RA	CCGCTCGGCTTTTATCCTCT
AMD1_R_RA	CGTTGAACTGAGCGAACTGG	JUN_R_RA	ACCCAGTTCTCTGCCCATAA
CAT_F_RA	ACCAGAGAGATGGGTTTCAG	JNK_F_RA	TTGCTGCTGCTCACTCTTTG
CAT_R_RA	TGCCAGTTTGCCAGTTTCAG	JNK_R_RA	CGATCTGGAGTTTGTTCCT
FOS_F_RA	AGCATCGCTATGGGTCACAG		

3.2.6.4 Extracción de ARN total

Por un lado, se utilizó ARN de hígado de especímenes adultos de *R. arenarum* y de larvas control en estadio n° 25, con el objetivo de evaluar la utilidad de los cebadores diseñados para corroborar las secuencias obtenidas a partir del transcriptoma. Por un lado, para verificar la utilidad de los cebadores específicos diseñados para el análisis de la expresión mediante qPCR (ver sección 3.2.7.9), el ARN se extrajo a partir de larvas en estadio n° 25 expuestas a OF y larvas control. Para las muestras de hígado se procedió a colocar 800 μ L de Quick-Zol[®] por cada 100 mg de tejido y se guardaron a -20°C hasta su utilización; mientras que a las muestras de larvas en estadio n° 25 se adicionaron 150 μ L de RNA Later[®] por cada 5 larvas y se guardaron a -20°C hasta su utilización. En todos los casos se procedió con el mismo protocolo de purificación. En un primer paso se procedió a extraer todo el Quick-Zol[®] o RNA Later[®]. Luego, las muestras fueron homogeneizadas de forma manual, con homogeneizador de teflón y nitrógeno líquido, manteniéndolas en baño de nitrógeno. Luego se agregaron 2 mL de buffer de lisis (CTAB 2%, PVP 2%, Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA 25 mM pH 8, NaCl 2 M, Espermidina 0,5 g L⁻¹, beta-mercaptoetanol 2%) precalentado a 70°C en baño termo-estabilizado, en cada muestra homogeneizada. Se tomaron 700 μ L y se colocaron en un tubo eppendorf de 1,5 mL. Se incubaron a 70°C durante 10 min en baño termo-estabilizado, vortexeando cada 2-3 min. Luego se agregaron 600 μ L de cloroformo a cada muestra y se agitaron (con vortex) y se centrifugaron las muestras a 20000 x g durante 15 min a 4°C. La fase acuosa

obtenida fue trasvasada a un nuevo tubo de 1,5 mL y se agregaron 250 μL de etanol absoluto. Luego se agitaron las muestras en vortex durante 10 segundos y se procedió a pasar cada mezcla por una columna de purificación ADN (Puro ADN CLEAN UP). Las muestras fueron nuevamente centrifugadas a 20000 $\times g$ durante 1 min a temperatura ambiente. Se descartó el líquido y se realizaron 2 lavados con 500 μL de etanol 80%, mediante utilización de la columna y centrifugación durante 2 minutos a 20000 $\times g$, a temperatura ambiente. Al finalizar el segundo lavado se descartó el líquido obtenido y se dejó secar la columna a temperatura ambiente durante 1 min, para luego eluir cada muestra en 30 μL de agua libre de RNAsas.

Para determinar la pureza del ARN extraído se realizó una dilución de 5 μL de ARN en 995 μL de agua, para leer las absorbancias a 260 nm (ARN) y a 280 nm (proteínas y ADN). Aquellas muestras cuya relación 260/280 fue $>1,70$ fueron utilizadas para las siguientes etapas. La concentración de ARN en cada muestra se calculó con la siguiente fórmula:

$$[\text{ARN}] (\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}) = (\text{Abs } 260 \times 33 \times \text{factor de dilución}) / 1000$$

Los ARN purificados y disueltos en agua libre de RNAsas fueron conservados a -20°C hasta su utilización.

3.2.6.5 Verificación de la integridad del ARN purificado

Para verificar la integridad del ARN extraído se sembraron 2 μL de cada muestra en un gel de agarosa al 1%, preparada con buffer TAE 1X (partiendo del buffer TAE 50X: Tris HCl 13,3 mM pH 7,7, 6,67 mM ácido acético glacial y 0,33 mM EDTA). Para la siembra se utilizaron 2 μL de cada muestra, diluidas en 2 μL de GelRed[®] y 4 μL de buffer de siembra comercial al 10X. Se realizó la electroforesis en una cuba horizontal (*multiSub Horizontal Gel System, Cleaver Scientific*) con buffer TAE 1X como buffer de corrida, durante 30 min a 100 V. La visualización se llevó a cabo en un transiluminador UV (*MaestroGen[®] Slider Imager*). El ARN se consideró íntegro al visualizarse las bandas correspondientes a los ARN ribosomales 18S y 28S.

3.2.6.6 Retrotranscripción a ADNc (ADN copia)

Luego de la obtención del ARN de muestras de hígado de especímenes adultos y de larvas en estadio n° 25 no expuestas, se procedió a la obtención del ADN copia. Se utilizaron 5 μ L (5 μ g) de cada muestra, a las cuales se agregaron 2 μ L de cebadores oligo-dT (18) a una concentración 10 μ M y 7,5 μ L de agua libre de RNAsas. Se colocó en un termociclador durante 5 min a 65°C y luego, las muestras fueron colocadas durante 2 min en hielo. A cada tubo se agregaron 2 μ L de dNTPs 2 mM, 4 μ L de Buffer 5X y 0,5 U de la enzima retrotranscriptasa. Luego, las muestras fueron llevadas a termociclador durante 1 h a 42°C.

3.2.6.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

A continuación, se procedió a la preparación de la mezcla de reacción de PCR para amplificar los genes de interés, utilizando tubos de 0,2 mL autoclavados dos veces. La mezcla de reacción estuvo compuesta por: 2 μ L de Buffer 10X (Kit Taq Polimerasa, PBL), 2 μ L de MgCl 50 mM, 2 μ L de dNTPs 2 mM, 0,6 μ L de cada cebador 10 μ M, 1 U de enzima polimerasa Taq (Kit Taq Polimerasa PBL) y agua libre de RNAsas hasta completar un volumen de 18 μ L. De cada muestra de ADNc, se tomaron 2 μ L y se colocaron en los tubos conteniendo 18 μ L de la mezcla de reacción de PCR (Tabla 3.3). Se utilizó un ciclado estándar para cada par de cebadores, utilizando la temperatura de hibridación adecuada en cada caso.

Tabla 3.3: Mezcla de reacción de PCR.

Componentes	Para cada muestra
Agua	11,2 μL
Buffer 10 X	2 μL
MgCl ₂ 50 mM	2 μL
dNTPs 25 mM	2 μL
Cebador sentido (Forward) 10 μM	0,3 μL
Cebador antisentido (Reverse) 10 μM	0,3 μL
TAQ Polimerasa	0,2 μL
ADNc	2 μL
VOLUMEN TOTAL	20 μL

3.2.6.8 Verificación del transcriptoma mediante secuenciación

Los productos de PCR fueron sembrados en un gel de agarosa al 2%, seguido de electroforesis en cuba horizontal y visualizados mediante transiluminador UV. Aquellos productos cuya concentración fue mayor o igual a 5 ng/ μL fueron cortados del gel y purificados mediante el Kit PURO GEL EXTRACTION según indicaciones del fabricante. Finalmente, las muestras purificadas se enviaron a Macrogen para ser secuenciadas, junto con 20 μL de cada cebador (20 ng μL^{-1}) correspondiente.

3.2.6.9 Cuantificación de los niveles de expresión de los genes de interés por RT-qPCR

3.2.6.9.1 Diseño de cebadores específicos

Las secuencias positivas obtenidas en la sección anterior se utilizaron para el diseño de cebadores específicos para la técnica de qPCR (Tabla 3.4). Como gen endógeno se eligió Beta Actina (B-ACT), cuyos cebadores fueron obtenidos a partir de la bibliografía (Amé et al. 2009) y se utilizaron para secuenciar el producto

de PCR obtenido. Una vez obtenida la secuencia de B-ACT, se diseñaron los cebadores específicos para qPCR sobre dicha secuencia.

Tabla 3.4: Secuencias de los cebadores diseñados para el estudio de la expresión mediante qPCR en *R. arenarum*

FOS F	ACCACCTACACCACCTCGTTTGTC
FOS R	ACTGCTCGTTGCTGCTGCTTC
APAO F	CTGGAAACTGCTCACCATCTTCAC
APAO R	AAGGGCTACCAAGCTCTACTAGAC
ODC F	TCCGTAGACACCATCGTTGAC
ODC R	TGTTGCTTCAGCCTTCAC
B_ACT F	GCTGTGCTGTCCCTGTATG
B_ACT R	CAAGTCCAGACGCAGGATG
DAO F	CTGCTGCTCCATCACTTG
DAO R	CTCTGCCAGGGTCGTAATAG
SMOX F	TCCTTCCTCCTGGAGAAC
SMOX R	GAGGCTGAAACTGGCTATG
SRM F	AAGACTCTGTTCCCTGTGGTAG
SRM R	ATGCTGCCCGATGAATGTTG
SAMDC F	ACCAGACCATCAGGAATACC
SAMDC R	CATGCGTCCCATGCAATAAG
SOD F	GCAACGCCATCTTTGGAGG
SOD R	GCACTATCAACGGGCTGAC

3.2.6.9.2 Tratamiento con DNAsa

De las muestras de larvas expuestas a OF y larvas control, se utilizaron entre 5 y 8 µg de ARN purificado para realizar el tratamiento con DNAsas. En cada muestra se colocó 1,2 µL de DNAsa y 1,2 µl de Buffer (DNAsa kit), seguido de incubación en termociclador Eppendorf durante 60 min a 37°C. Una vez finalizada la incubación, se adicionó 1,2 µL de solución stop y se llevó nuevamente a termociclador durante 10 min a 65°C. Las muestras fueron conservadas a -20 °C hasta ser utilizadas.

3.2.6.9.3 Puesta a punto de cebadores específicos para qPCR

Para cada experimento se utilizó ADNc obtenido con el protocolo mencionado anteriormente. La mezcla de reacción se preparó con las siguientes concentraciones finales de los reactivos en 20 μ L de reacción: iQtm SYBR[®] GREEN SUPERMIX (BIORAD) 1x, par de cebadores 0,3 μ M, ADNc 5 μ L de cada dilución correspondiente y H₂O hasta volumen final. El ciclado incluyó una desnaturalización inicial a 95°C de 10 min, 40 ciclos con una desnaturalización a 95°C de 40 segundos, hibridación o *annealing* a 58°C de 40 segundos y la extensión a 60°C de 40 segundos. Por último, se realizó una curva de disociación o *melting* agregando un paso de 15 segundos de desnaturalización a 95°C, 1 minuto de hibridación o *annealing* a 58°C y luego se llevó nuevamente a 95°C con incrementos escalonados de temperatura de 0,3°C y medida de señal en cada uno. El equipo utilizado fue el MasterCycler[®] Realplex (Eppendorf). Cada punto de la curva se midió por triplicado. La ecuación de la recta, la eficiencia de los cebadores y el $\Delta\Delta$ Ct se determinaron con el software del equipo.

3.3 Análisis de datos

Se realizaron tres experimentos independientes de exposición a MAZ y CLP. A partir de estos se determinaron las actividades de enzimas degradativas de poliaminas y los niveles de poliaminas libres. Dentro de cada uno, los diferentes tratamientos se realizaron por duplicado. Se analizaron diferencias entre experimentos para la respuesta de cada parámetro. Se calculó la Media \pm Error Estándar de la Media (ESM) para cada estadio embrionario y para cada actividad enzimática (n=6). Las diferencias entre tratamientos fueron analizadas por ANOVA factorial y/o de una vía para cada parámetro medido en los diferentes estadios embrionarios. Se utilizó el Test de Fisher de Menor Diferencia Significativa (LSD; least significant difference) como análisis *post hoc* a fin de evaluar las diferencias estadísticas entre embriones control y embriones expuestos a MAZ y CLP en cada estadio de desarrollo, y entre embriones control en diferentes estadios de desarrollo. La influencia de los diferentes parámetros bioquímicos en la variabilidad de respuesta frente a los tratamientos con MAZ y CLP, y las posibles correlaciones entre ellos, fueron evaluadas por Análisis de Componentes Principales (ACP), utilizando el programa NTSYS. Como insumos para el ACP se utilizaron resultados obtenidos en este trabajo, junto con datos aportados por

investigaciones previas del grupo de investigación (Ferrari et al. 2009; Lascano et al. 2011; Liendro et al. 2015; Sotomayor et al. 2015).

Para el análisis de los niveles de expresión obtenidos mediante RNA-Seq se utilizaron medidas no paramétricas, como el test de medianas y Kruskal-Wallis (K-W).

En la Figura 3.5 Se muestra un esquema donde se resumen la metodología de trabajo desde la inducción de la ovulación hasta la toma de muestras.

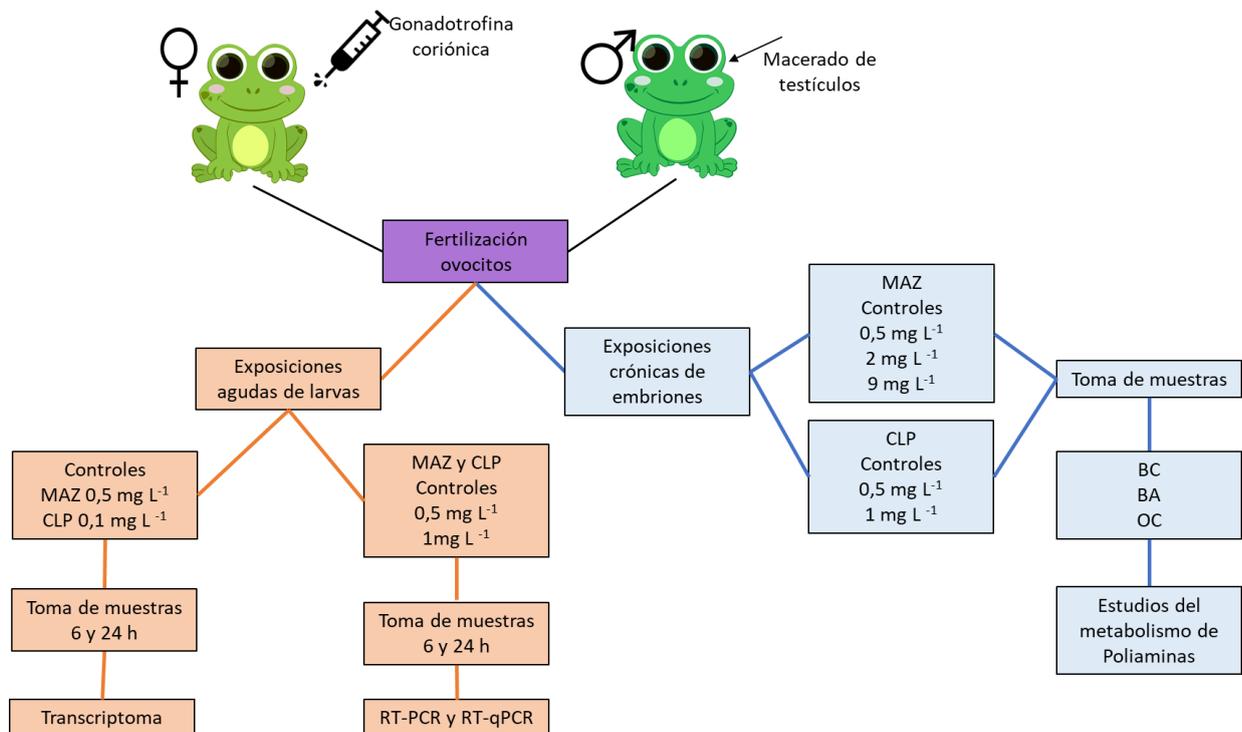


Figura 3.5: Metodología de trabajo. En el esquema se puede ver de color azul la metodología empleada para las exposiciones crónicas de embriones, las concentraciones ensayadas y los estadios embrionarios utilizados. Mientras que en color naranja se observa la metodología utilizada para las exposiciones agudas con larvas (estadio de OC a 10 días).

3.4 Estudio complementario: estimación de la toxicocinética de CLP

Con el fin de evaluar cuánto se absorbe y metaboliza del CLP en las exposiciones semiestáticas, se realizaron ensayos para determinar la toxicocinética de CLP, como información adicional a los objetivos de la tesis y habida cuenta de la disponibilidad del compuesto marcado radiactivamente en el laboratorio. Para ello, se realizaron exposiciones a CLP marcado radiactivamente con ^{14}C , en los carbonos 2 y 6 ($25000 \text{ dpm mL}^{-1}$). Se utilizaron larvas a 10 días de alcanzado el estadio de opérculo completo (n° 25 de Del Conte y Sirlin). Las larvas fueron mantenidas en bandejas de vidrio con medio Ringer, en una relación 1 larva/10mL, conteniendo además el CLP marcado radiactivamente con ^{14}C . Se tomaron muestras de 1 mL de medio y 1 larva entera por duplicado a diferentes tiempos: 0, 6, 12, 24 y 48 h y se colocaron en un vial de centelleo con 3 mL de líquido de centelleo para luego ser procesadas y medidas mediante centelleo líquido.

A partir de los datos obtenidos en el medio (w) y en las larvas (l), se procedieron a realizar ajustes de diferentes modelos de absorción-metabolización-excreción derivados de mecanismos toxicocinéticos desarrollados en el laboratorio (Venturino et al, 1998; Venturino et al, 2001; Venturino et al, 2001). Luego de realizar ajustes por Regresión No Lineal de los diferentes modelos a los datos, se seleccionaron mediante el criterio de mejor bondad de ajuste de Akaike (1973), las siguientes ecuaciones a fin de estimar los parámetros cinéticos:

Para el medio

$$T_w = MW_0 * (\exp(-k_1 * t) + P_w E_q * (1 - \exp(-k_2 * t)))$$

Para la larva

$$T_l = MW_0 * (1 - \exp(-k_1 * t)) + P_w E_q * (\exp(-k_2 * t) - 1)$$

Dónde:

“w” representa el compartimiento agua;

“l” es el compartimiento larva;

“T” es la variable dependiente medida que representa el total de compuestos radiactivos (principio activo más metabolitos) en cada compartimento;

“M” representa la radiactividad debida a CLP;

“P” representa la radiactividad en los productos resultantes del metabolismo

de CLP;

“0” es la condición inicial para CLP;

“Eq” es la condición de equilibrio final entre compartimentos para los productos;

De ello resultan los siguientes parámetros a ajustar:

“MW0” es la radioactividad inicial del CLP, presente solamente en el agua;

“PwEq” es la radioactividad de los productos en el equilibrio, una vez que todo el CLP es metabolizado;

“k1” es la constante de primer orden para la remoción de CLP del compartimiento agua u absorción por las larvas;

“k2” es la constante de primer orden global para todos los procesos de metabolización de CLP en las larvas y su excreción al medio.

Los valores obtenidos de cada parámetro para el medio fueron:

$$MW0 = 25407 \pm 818 \text{ dpm}$$

$$PwEq = 19679 \pm 1128 \text{ dpm}$$

$$k1 = 0,311 \pm 0,053 \text{ h}^{-1}$$

$$k2 = 0,0757 \pm 0,0145 \text{ h}^{-1}$$

Mientras que para la larva fueron:

$$MW0 = 24246 \text{ dpm}$$

$$PwEq = 17413 \pm 1732 \text{ dpm}$$

$$k1 = 0,387 \pm 0,124 \text{ h}^{-1}$$

$$k2 = 0,129 \pm 0,050 \text{ h}^{-1}$$

A partir de estos resultados, podemos estimar por diferencia entre MW0 y PwEq, que el equilibrio medio estimado de productos en las larvas es de 6000 dpm. Además, sabiendo que el tiempo medio $t_{1/2} = \ln 2 / k$, el tiempo medio de absorción calculado para CLP a partir de las k1 es de alrededor de 2 h, mientras que el tiempo medio de metabolización aparente oscila entre las 5 y las 9 horas (Figura 3.4).

Estos resultados estarían indicando que, de acuerdo al tiempo medio ajustado y al cabo de 24 h, sólo una diezmilésima parte de la concentración

original de CLP permanece en el medio, o sea que el CLP sería totalmente absorbido y metabolizado en aproximadamente 24 h.

Lamentablemente, no fue posible realizar un nuevo experimento toxicocinético en el cual estaba previsto separar al CLP principio activo y los metabolitos radiactivos previamente a su cuantificación por centelleo líquido, por no disponer de suficiente CLP radiactivo. Este experimento permitiría corroborar los parámetros estimados, y a su vez determinar si en 24 h se produce algún grado de bioacumulación de CLP en tejidos grasos de las larvas.

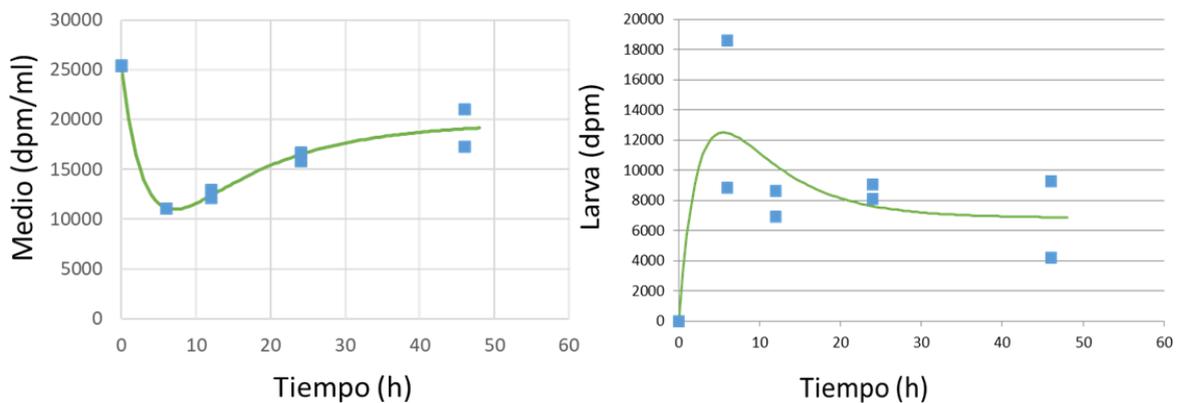


Figura 3.6: Contenido de CLP y metabolitos marcados en el medio y en larvas de *R. arenarum*, expuestas a CLP-¹⁴C.

4. RESULTADOS

4.1 Efectos toxicológicos y teratogénicos de MAZ y CLP

De acuerdo con lo previsto en los diseños experimentales empleados para estudiar efectos subletales de ambos insecticidas organofosforados, no se observó mortalidad a ninguna de las concentraciones utilizadas.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en los índices de malformaciones entre los embriones expuestos a MAZ y CLP, con respecto a los embriones utilizados como control, ni tampoco se observaron alteraciones en los comportamientos de los embriones tratados.

4.2 Metabolismo oxidativo de poliaminas

4.2.1 Oxidasas de poliaminas en embriones expuestos a MAZ y CLP

4.2.1.1 Actividad de las oxidasas de poliaminas en embriones expuestos a MAZ

4.2.1.1.1 Diamina oxidasa (DAO)

En los embriones control se pudo ver un incremento en la actividad enzimática de DAO, desde BC hasta BA, seguido de una disminución en OC, observándose los valores de $1,10 \pm 0,07$; $2,23 \pm 0,16$ y $1,40 \pm 0,12$ nmol min^{-1} mg proteína $^{-1}$ en BC, BA y OC. La actividad específica de DAO se vio afectada frente a la exposición con MAZ. Se observó un aumento significativo en la actividad enzimática en el estadio de BC en todos los tratamientos a los cuales fueron expuestos los embriones (Figura 4.1), con un máximo de un 62% de aumento para la concentración más baja de MAZ ($p < 0,01$), con respecto a los controles. En los estadios de BA y OC no se observaron diferencias significativas al comparar la actividad de DAO en embriones expuestos a MAZ con sus controles respectivos.

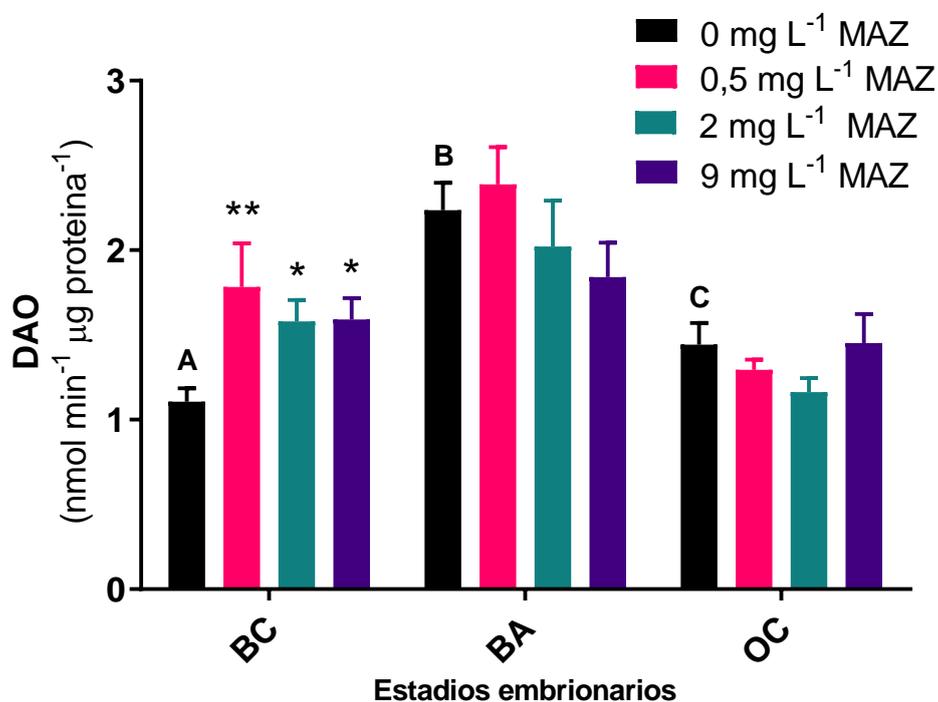


Figura 4.1: Efecto de MAZ en la actividad de DAO en embriones de *R. arenarum*. Los datos representan la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes con tratamientos por duplicado ($n = 6$). Los asteriscos representan las diferencias significativas entre los embriones expuestos y su correspondiente control (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$); letras diferentes indican diferencias significativas en los valores control a lo largo del desarrollo embrionario ($p \leq 0,01$), determinados mediante ANOVA y el test de Fisher LSD.

4.2.1.1.2 N¹-acetilpoliamina oxidasa (APAO)

Se pudo ver en los embriones control un incremento de la actividad desde BC hasta BA y luego una disminución en OC, mostrando valores de $0,80 \pm 0,08$; $2,19 \pm 0,08$ y $1,10 \pm 0,14$ $\text{nmol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$, respectivamente.

La exposición a MAZ no alteró significativamente la actividad de APAO durante el desarrollo embrionario, a ninguna de las concentraciones testeadas (Figura 4.2).

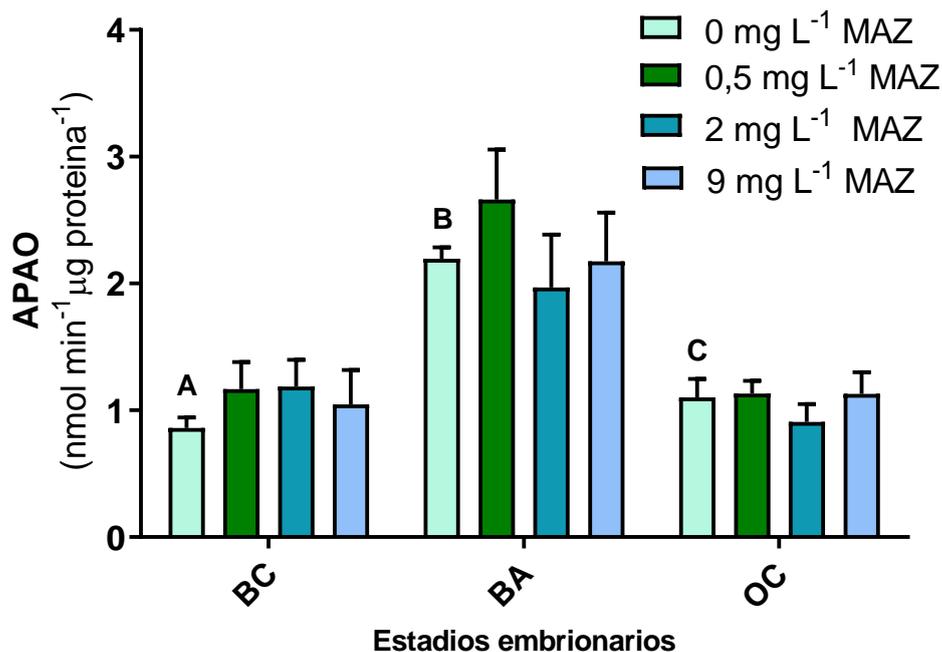


Figure 4.2: Efecto de MAZ en la actividad de APAO en embriones de *R. arenarum*. Los datos representan la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes, con sus tratamientos por duplicado ($n = 6$). No se observan diferencias significativas entre los tratamientos y sus controles respectivos ($p > 0,05$). Letras diferentes indican diferencias significativas en los valores control a lo largo del desarrollo embrionario ($p \leq 0,01$), determinado por ANOVA y test de Fisher LSD.

4.2.1.1.3 Espermina oxidasa (SMOX)

Los embriones control mostraron un patrón similar a las demás enzimas, observándose un incremento de la actividad desde BC hasta BA y luego una disminución en OC. Para estos embriones los valores fueron $1,46 \pm 0,04$; $6,02 \pm 0,14$ y $3,53 \pm 0,25$ $\text{nmol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$, respectivamente.

Los embriones expuestos a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de MAZ mostraron un aumento del 33% en la actividad de SMOX en el estadio de BA ($p < 0,01$), con respecto a los controles (Figura 4.3). No se encontraron diferencias significativas en la actividad de SMOX en los estadios de BC y OC de los embriones expuestos a MAZ, respecto de los controles.

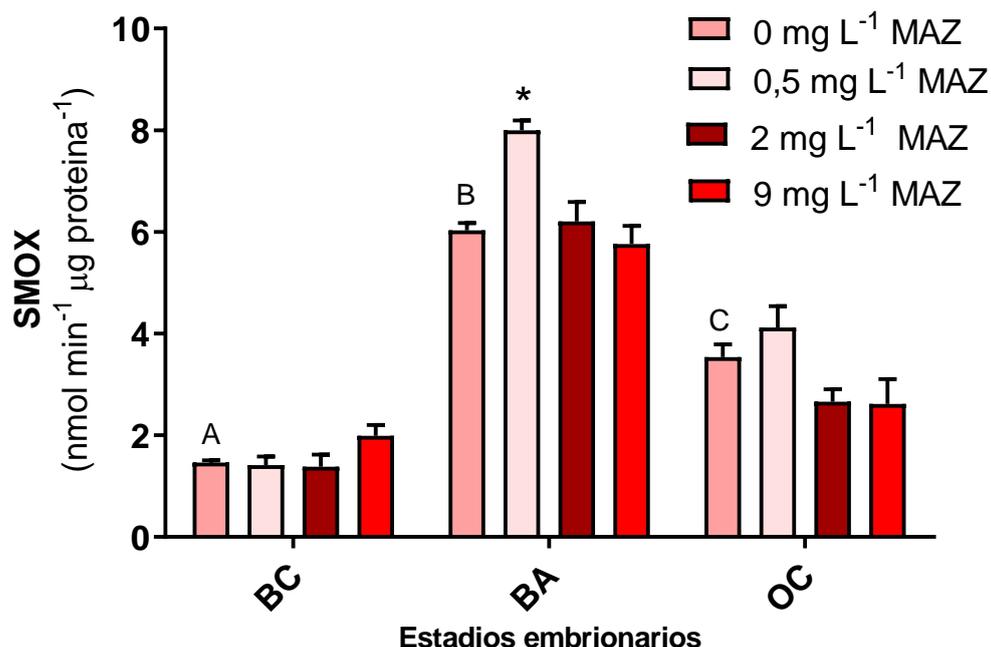


Figure 4.3: Efecto de MAZ en la actividad de SMOX en embriones de *R. arenarum*. Los datos representan la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes, con sus tratamientos por duplicado ($n = 6$). Los asteriscos indican las diferencias significativas entre los tratamientos y sus controles respectivos ($* p \leq 0,05$); las letras diferentes indican diferencias significativas en los valores control a lo largo del desarrollo embrionario ($p \leq 0,01$), determinado por ANOVA y test de Fisher LSD.

4.2.1.2 Actividad de las oxidasas de poliaminas en embriones expuestos a CLP

4.2.1.2.1 Diamina oxidasa (DAO)

Para los embriones controles se observaron valores de $5,06 \pm 0,39$; $7,49 \pm 0,80$ y $3,25 \pm 0,53$ en los estadios de BC, BA y OC, respectivamente. Se observaron diferencias significativas entre los valores control de DAO para los tres estadios embrionarios.

No se observaron diferencias significativas entre los controles y los embriones expuestos a CLP en los estadios de BC y OC. En el estadio de BA, la exposición a CLP indujo una disminución significativa de la actividad de DAO en embriones expuestos a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ (31%; $p < 0,05$) (Figura 4.4), mientras que en los embriones expuestos a 1 mg L^{-1} de CLP se observó una tendencia hacia la disminución de la actividad de DAO (25%; $p = 0,068$), con respecto a los controles.

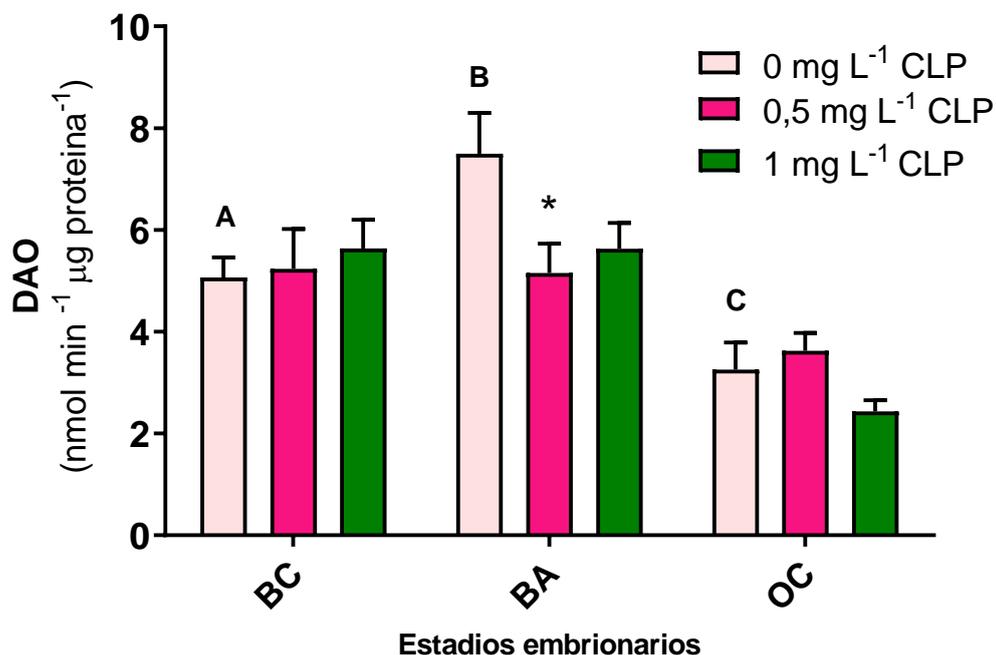


Figura 4.4: Efecto de CLP en la actividad de DAO en embriones de *R. arenarum*. Los datos representan la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes con tratamientos por duplicado ($n = 6$). Los asteriscos representan las diferencias significativas entre los embriones expuestos y su correspondiente control (* $p \leq 0,05$); letras diferentes indican diferencias significativas en los valores control a lo largo del desarrollo embrionario ($p \leq 0,01$), determinados mediante ANOVA y el test de Fisher LSD.

4.2.1.2.2 N1-acetilpoliamino oxidasa (APAO)

Para los embriones control se observaron los valores de $3,27 \pm 0,21$; $5,02 \pm 0,32$ y $4,49 \pm 0,67$ en los estadios de BC, BA y OC, respectivamente.

En los embriones en el estadio de BC expuestos a 1 mg L^{-1} de CLP se produjo un aumento de 2,7 veces ($p < 0,05$) en la actividad de APAO, con respecto al control (Figura 4.5). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los estadios de BA y OC.

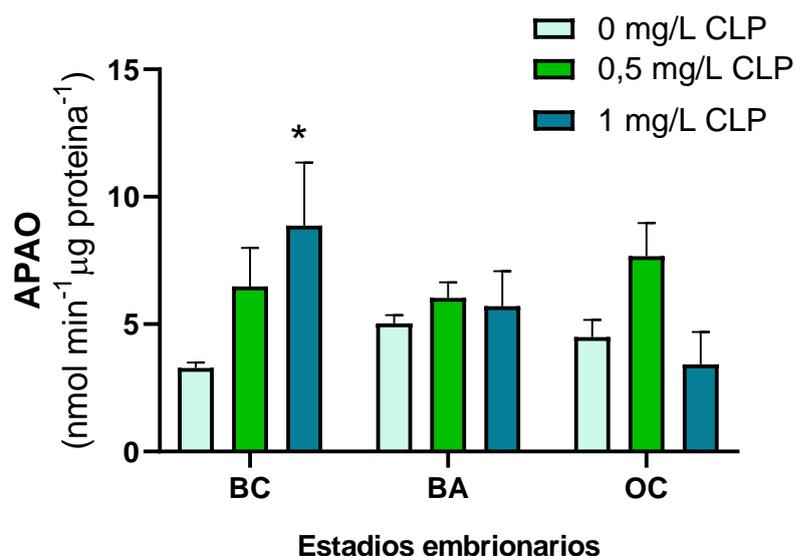


Figure 4.5: Efecto de CLP en la actividad de APAO en embriones de *R. arenarum*. Los datos representan la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes, con sus tratamientos por duplicado ($n = 6$). Los asteriscos indican las diferencias significativas entre los tratamientos y sus controles respectivos (* $p \leq 0,05$), determinado por ANOVA y test de Fisher LSD. No se observaron diferencias significativas en la actividad de APAO entre embriones control a lo largo del desarrollo embrionario.

4.2.1.2.3 Espermina oxidasa (SMOX)

En los embriones control se observaron los valores de $4,39 \pm 0,54$; $5,41 \pm 0,48$ y $3,35 \pm 0,34$ en los estadios de BC, BA y OC.

La exposición a CLP no causó efectos significativos en la actividad de SMOX en los estadios de BC y OC. Mientras que, en embriones en BA expuestos a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ CLP ($p < 0,05$), se observó una disminución del 25% en la actividad de SMOX, con respecto al control (Figura 4.6).

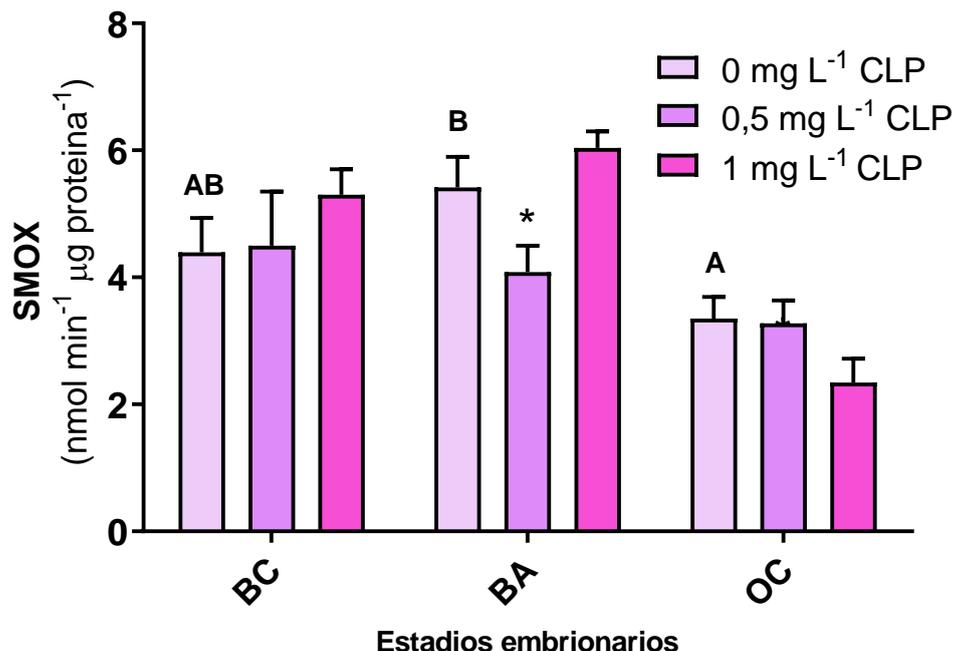


Figure 4.6: Efecto de CLP en la actividad de SMOX en embriones de *R. arenarum*. Los datos representan la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes, con sus tratamientos por duplicado ($n = 6$). Los asteriscos indican las diferencias significativas entre los tratamientos y sus controles respectivos ($* p \leq 0,05$); letras diferentes indican diferencias significativas en los valores control a lo largo del desarrollo embrionario ($p \leq 0,01$), determinado por ANOVA y test de Fisher LSD.

4.3 Niveles de poliaminas libres y conjugadas

4.3.1 Concentración de poliaminas libres en embriones control de *R. arenarum*

La concentración de Putrescina (Put) entre los embriones control de *R. arenarum* fue similar en los estadios de BC y BA, y se observó una disminución significativa en el estadio de OC. Los valores de los controles fueron $26,37 \pm 1,92$; $24,30 \pm 2,22$ y $8,48 \pm 1,40$ nmol μg proteína⁻¹ en los estadios de BC, BA y OC, respectivamente. Put fue la poliamina detectada en mayor concentración.

La concentración de Spd no mostró variación a lo largo del desarrollo embrionario en los embriones control (valor de la media de $7,60 \pm 0,18$ nmol μg proteína⁻¹).

Por otra parte, los niveles de Spm aumentaron entre los estadios de BC y BA ($0,31 \pm 0,02$ y $0,4 \pm 0,01$ nmol μg proteína⁻¹, respectivamente) para luego disminuir en el estadio de OC ($0,25 \pm 0,02$ nmol μg proteína⁻¹).

4.3.2 Concentración de poliaminas libres en embriones expuestos a MAZ

4.3.2.1 Putrescina (Put)

Los embriones en estadio de BA expuestos a 2 mg L^{-1} de MAZ mostraron un aumento del 46% en la concentración de Put ($p < 0,05$), con respecto al control. Asimismo, se observó un aumento del 53% en la concentración de Put ($p < 0,05$) en embriones en OC expuestos a 9 mg L^{-1} de MAZ (Figura 4.7).

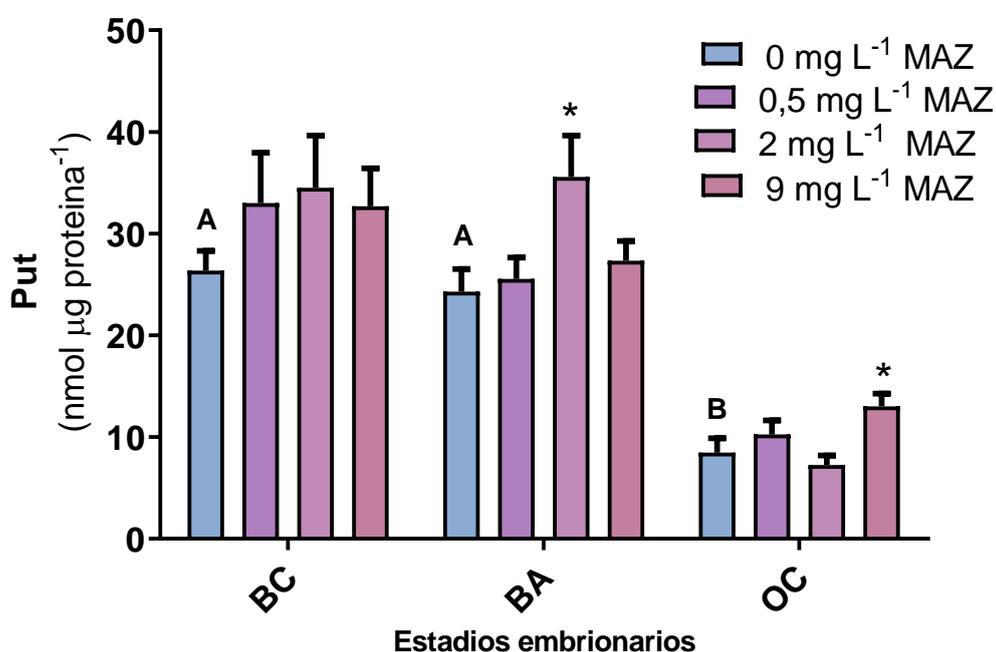


Figura 4.7: Efecto de MAZ en la concentración de Put en embriones de *R. arenarum*. Los datos representan la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes con tratamientos por duplicado ($n = 6$). Los asteriscos representan las diferencias significativas entre los embriones expuestos y sus controles respectivos ($* p \leq 0,05$); letras diferentes indican diferencias significativas en los valores control a lo largo del desarrollo embrionario ($p \leq 0,01$), determinado mediante ANOVA y el test LSD de Fisher.

4.3.2.2 Espermidina (Spd)

Espermidina fue la única poliamina cuya concentración no se vio significativamente afectada por la exposición a MAZ (Figura 4.8).

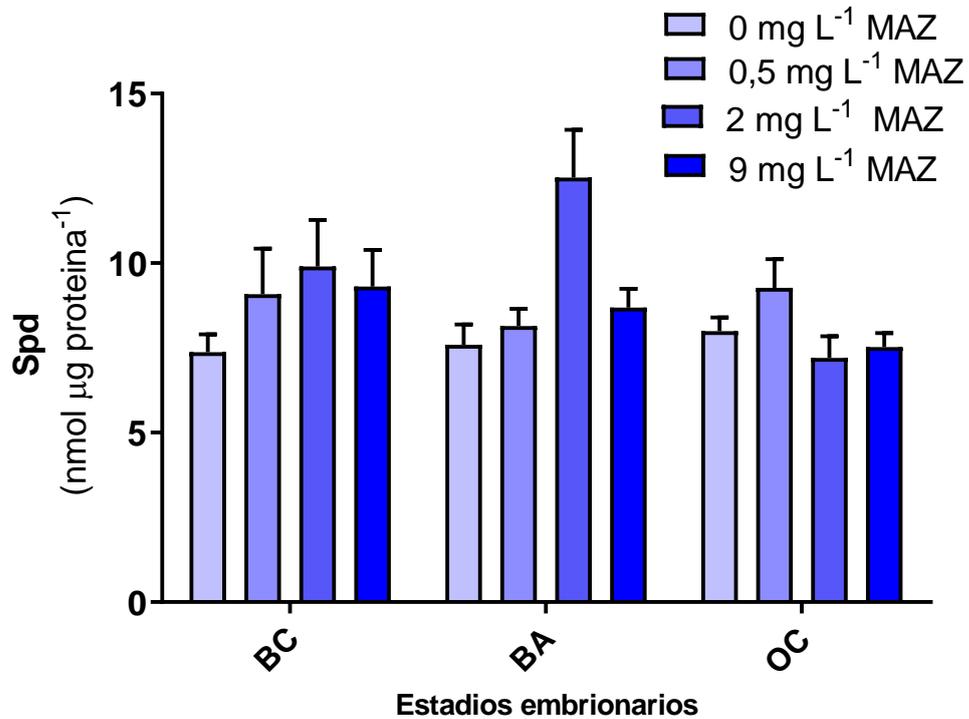


Figura 4.8: Efecto de MAZ en la concentración de Spd en embriones de *R. arenarum*. Los datos representan la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes con tratamientos por duplicado ($n = 6$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas

4.3.2.3 Espermina (Spm)

La concentración de espermina libre se vio aumentada en un 48% en los embriones expuestos a 2 mg L⁻¹ en estadio de BA ($p < 0,05$) (Figura 4.9). No observándose efectos significativos antes en BV, o posteriormente en OC.

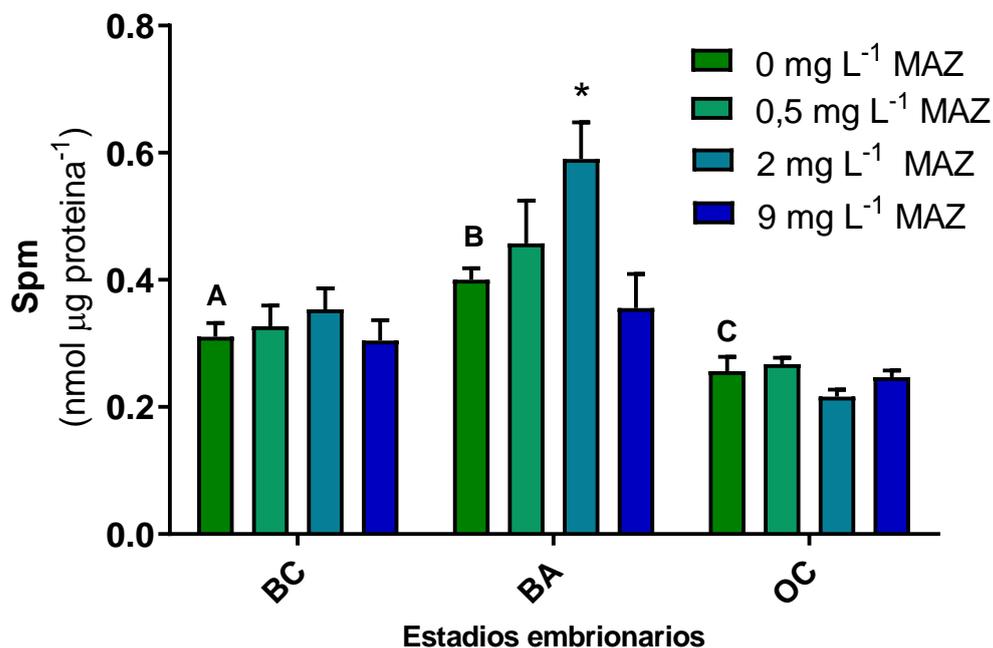


Figura 4.9: Efecto de MAZ en la concentración de Spm en embriones de *R. arenarum*. Los datos representan la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes con tratamientos por duplicado ($n = 6$). Los asteriscos representan las diferencias significativas entre los embriones expuestos y sus controles respectivos ($* p \leq 0,05$); letras diferentes indican diferencias significativas en los valores control a lo largo del desarrollo embrionario ($p \leq 0,01$), determinado mediante ANOVA y el test LSD de Fisher.

4.3.3 Concentración de poliaminas libres en embriones expuestos a CLP

No se observaron diferencias significativas en los niveles de Put, Spm y Spd durante el desarrollo de embriones de *R. arenarum* expuestos al organofosforado CLP (Tabla 4.1). Sin embargo, se observó una tendencia al aumento en los embriones expuestos a 0,5 mg L⁻¹ de CLP, en comparación al control, en la mayoría de los casos, y en otros para 1 mg L⁻¹ CLP.

Tabla 4.1: Contenido de poliaminas libres (nmol μg proteína⁻¹) en embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a CLP. Los valores están expresados como la media \pm error estándar. No se observan diferencias significativas.

PUTRESCINA			
	BC	BA	OC
0 mg L⁻¹ CLP	23,77 \pm 2,87	21,66 \pm 3,52	10,42 \pm 1,36
0.5 mg L⁻¹ CLP	26,73 \pm 0,99	25,85 \pm 3,19	13,20 \pm 0,40
1 mg L⁻¹ CLP	27,22 \pm 0,83	23,52 \pm 2,79	8,59 \pm 0,35
ESPERMIDINA			
	BC	BA	OC
0 mg L⁻¹ CLP	6,71 \pm 0,90	8,13 \pm 0,69	6,96 \pm 1,23
0.5 mg L⁻¹ CLP	7,42 \pm 0,20	9,08 \pm 0,45	8,78 \pm 0,84
1 mg L⁻¹ CLP	7,55 \pm 0,24	8,87 \pm 1,12	5,63 \pm 0,16
ESPERMINA			
	BC	BA	OC
0 mg L⁻¹ CLP	0,31 \pm 0,05	0,35 \pm 0,03	0,36 \pm 0,06
0.5 mg L⁻¹ CLP	0,43 \pm 0,16	0,36 \pm 0,04	0,42 \pm 0,08
1 mg L⁻¹ CLP	0,31 \pm 0,04	0,41 \pm 0,05	0,32 \pm 0,03

4.3.4 Poliaminas conjugadas

La concentración de poliaminas conjugadas estuvo por debajo de los niveles de detección para la técnica empleada, en todas las muestras.

4.4 Análisis de componentes principales (ACP)

Se llevó a cabo teniendo en cuenta datos previos publicados por el grupo de trabajo, con el fin de analizar la relación existente entre el metabolismo oxidativo de poliaminas, enzimas blanco de la acción de plaguicidas organofosforados y las enzimas de estrés oxidativo. Este análisis involucró datos obtenidos para acetilcolinesterasa (AChE) como marcador de exposición a plaguicidas organofosforados, catalasa (CAT), glutatión S- transferasa (GST) y glutatión reducido (GSH) en embriones y larvas expuestas a

MAZ y CLP (Ferrari et al., 2009; Lascano et al., 2011; Liendro et al., 2015; Sotomayor et al., 2015). El análisis en general sobre las respuestas de las enzimas metabolizantes de poliaminas y los niveles presentados en el estudio, junto con el metabolismo oxidativo, indicó una separación bien definida de las etapas embrionarias de *R. arenarum* en la primera componente C1, como se muestra en el plano de proyección (Figura 4.10).

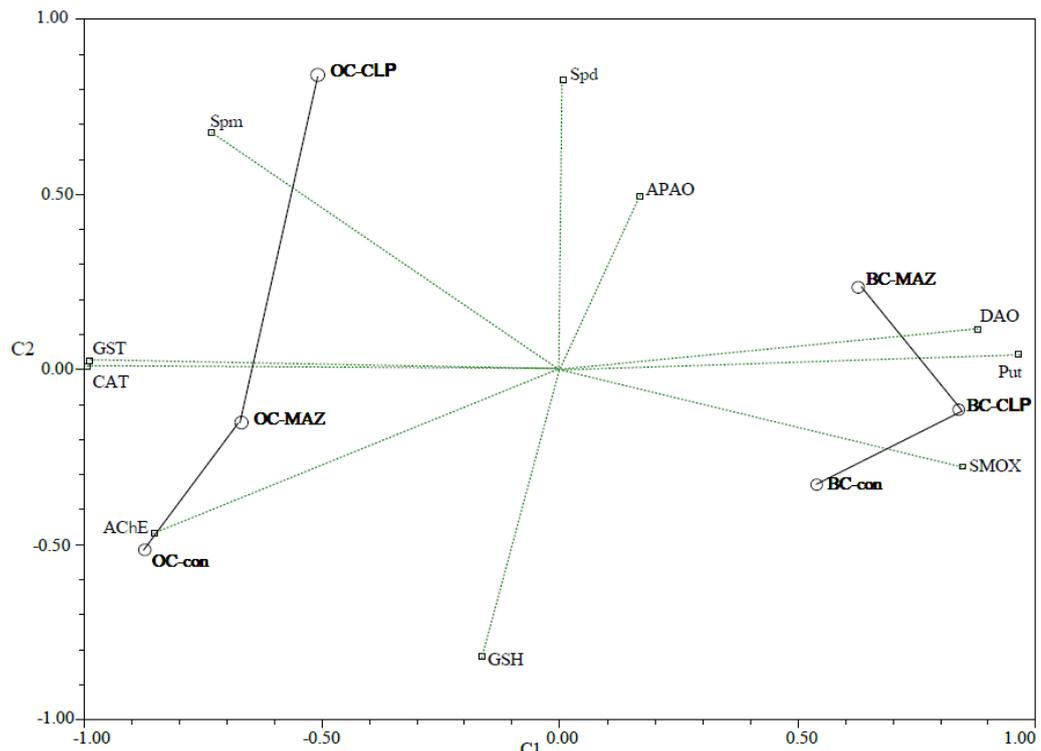


Figura 4.10: Análisis de componentes principales realizado en embriones de *R. arenarum* en los estadios de BC y OC. Dónde: AChE es acetilcolinesterasa; OC es opérculo completo; CLP es clorpirifós; APAO es N¹-acetilpoliamino oxidasa; BC es brote caudal; MAZ es metilazinfos; GSH es glutatión reducido; GST es glutatión s-transferasa, SMOX es espermina oxidasa y CAT es catalasa.

Los embriones en BC fueron posicionados por sus elevados niveles de Put y las actividades de DAO y SMOX, mientras que los embriones en OC fueron asociados con los niveles de espermina y las enzimas blanco y detoxificantes AChE, CAT y GST, en el sector opuesto. A su vez, los embriones en OC mostraron una segregación sustancial en la segunda componente C2 determinada por los diferentes tratamientos. En vista de la importancia de los estadios embrionarios en la variabilidad de las respuestas, se realizaron análisis

de componentes principales para los estadios de BC y OC por separado (Figuras 4.11 y 4.12).

En el estadio de BC, el primer componente C1 explica el 54,6% de la respuesta. Las variables que más contribuyeron fueron espermina, DAO, CAT y GST en una dirección y APAO y SMOX en la dirección opuesta. El segundo componente C2 explica el 45,4% de la respuesta, asociado con las variables Put, espermidina, APAO, AChE y GSH (Figura 4.11).

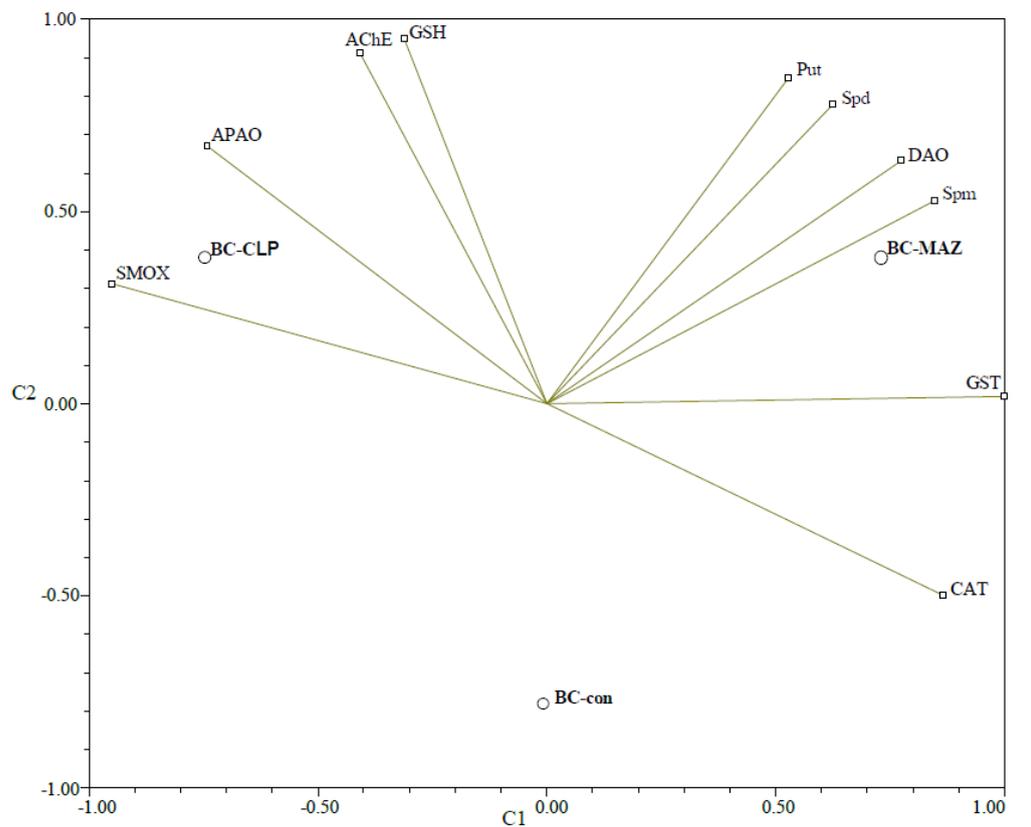


Figura 4.11: Análisis de Componentes Principales realizado en embriones de *R. arenarum* en el estadio de BC. Las variables usadas incluyen: contenido de poliaminas, actividad de enzimas oxidativas de poliaminas, parámetros de estrés oxidativo y actividad de acetilcolinesterasa (AChE). Donde: CLP es clorpirifós; APAO es N¹-acetilpoliamino oxidasa; BC es brote caudal; MAZ es metilazinfos; Put es putrescina; Spd es espermidina; Spm es espermina; DAO es diamino oxidasa; GSH es glutatión reducido; GST es glutatión s-transferasa, SMOX es espermina oxidasa y CAT es catalasa.

Los niveles de poliaminas se correlacionaron positivamente entre ellos y con la actividad de DAO (Tabla 4.2). APAO y SMOX se correlacionaron positivamente con AChE y GSH, y negativamente con las enzimas antioxidantes CAT y GST, mostrándose en direcciones opuestas en el plano del ACP. Los tratamientos con MAZ y CLP en embriones de BC se ubicaron en lados opuestos del eje C1. La exposición a MAZ se asoció con el elevado nivel de poliaminas y las actividades de DAO y GST, mientras que los tratamientos con CLP fueron relacionados con el aumento de las actividades de APAO, SMOX y AChE, y los elevados niveles de GSH. Los embriones control se separaron de ambos tratamientos y se proyectaron a lo largo del eje C2.

Tabla 4.2.: Matriz de correlación para embriones de *R. arenarum* en estadio de BC. Se muestra la matriz de correlación entre los niveles de poliaminas, enzimas de degradación oxidativa de poliaminas, parámetros oxidativos y actividad de colinesterasa en embriones de *Rhinella arenarum* en el estadio de BC. Las correlaciones significativas se muestran en negrita ($p \leq 0,05$).

Parámetros	Put	Spd	Spm	DAO	APAO	SMOX	ChE	CAT	GST	GSH
Put	1									
Spd	0,99	1								
Spm	0,90	0,94	1							
DAO	0,95	0,98	0,99	1						
APAO	0,18	0,058	-0,27	-0,15	1					
SMOX	-0,24	-0,36	-0,64	-0,54	0,91	1				
ChE	0,56	0,46	0,14	0,26	0,91	0,67	1			
CAT	0,035	0,15	0,47	0,36	-0,98	-0,98	-0,81	1		
GST	0,54	0,64	0,86	0,79	-0,73	-0,94	-0,39	0,86	1	
GSH	0,64	0,55	0,24	0,36	0,87	0,59	0,99	-0,74	-0,29	1

En embriones en el estadio de OC, el 78,2% de la variabilidad en la respuesta fue explicada por el componente C1, separando las variables Put, espermidina, espermina, DAO y APAO en dirección opuesta a AChE, GST, GSH y CAT. El 21,8% restante de la respuesta fue explicado por C2, asociado con las actividades de SMOX y DAO ubicadas en direcciones opuestas (Figura 4.12).

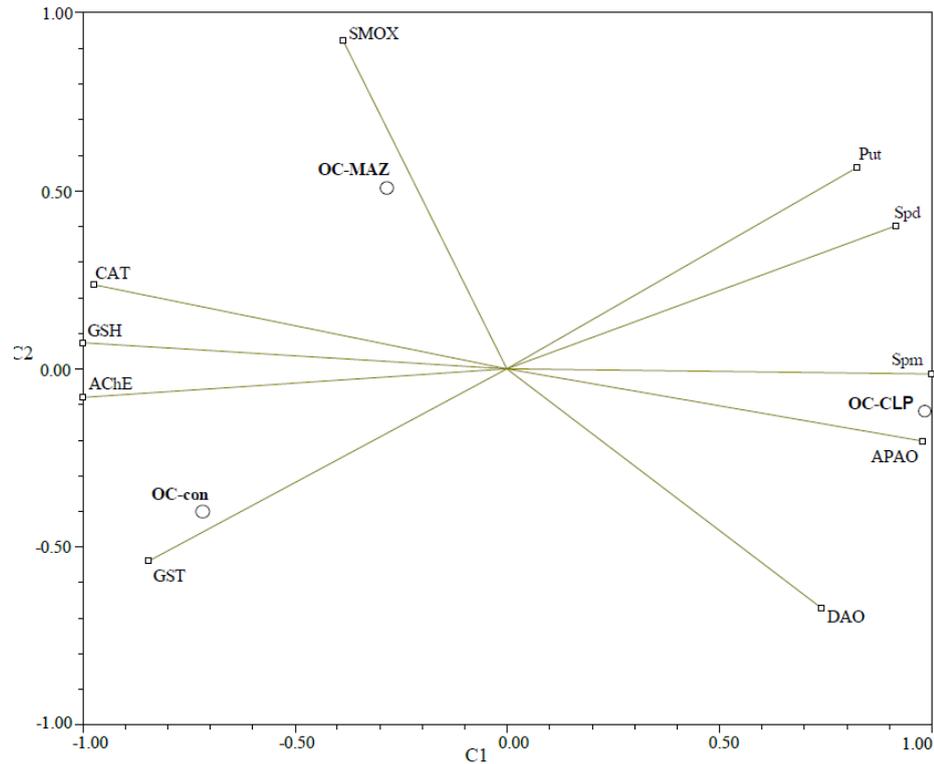


Figura 4.12: Análisis de Componentes Principales realizado en embriones de *R. arenarum* en el estadio de OC. Las variables usadas incluyen: contenido de poliaminas, actividad de enzimas oxidativas de poliaminas, parámetros de estrés oxidativo y actividad de acetilcolinesterasa (ChE). Dónde: DAO es diamino oxidasa; Spm es espermina; GSH es glutatión reducido; CAT es catalasa; Put es putrescina, Spd es espermidina; GST es glutatión s-transferasa y CLP es clorpirifós; APAO es N¹-acetilpoliamino oxidasa; OC es opérculo completo; y MAZ es metilazinfos.

La actividad de AChE y los parámetros antioxidantes se correlacionaron negativamente con los niveles de poliaminas y el metabolismo oxidativo de poliaminas (Tabla 4.3). La única excepción fue SMOX, que mostró una correlación positiva con CAT y GSH, y una correlación negativa con APAO y DAO. De acuerdo a la proyección de los tratamientos en el plano, la exposición a CLP en embriones en estadio de OC se encuentra claramente asociado al metabolismo oxidativo de poliaminas, mediante las actividades de APAO y DAO, y el aumento en los niveles de poliaminas y las bajas actividades de las enzimas antioxidantes, GSH y AChE. Los embriones expuestos a MAZ en estadio de OC se vieron asociados con un aumento en la actividad de SMOX y una disminución de DAO.

Tabla 4.3: Matriz de correlación para embriones de *R. arenarum* en estadio de OC. Se observa la correlación entre los niveles de poliaminas, enzimas de degradación oxidativa de poliaminas, parámetros oxidativos y actividad de colinesterasa en embriones de *Rhinella arenarum* en el estadio de OC. Las correlaciones significativas se muestran resaltadas en negrita ($p \leq 0,05$).

Parámetros	Put	Spd	Spm	DAO	APAO	SMOX	ChE	CAT	GST	GSH
Put	1									
Spd	0,98	1								
Spm	0,82	0,91	1							
DAO	0,23	0,41	0,75	1						
APAO	0,69	0,81	0,98	0,86	1					
SMOX	0,20	0,01	-0,4	-0,9	-0,56	1				
ChE	-0,87	-0,94	-0,99	-0,68	-0,96	0,31	1			
CAT	-0,67	-0,79	-0,97	-0,88	-0,99	0,59	0,95	1		
GST	-0,99	-0,98	-0,83	-0,26	-0,71	-0,17	0,88	0,69	1	
GSH	-0,78	-0,88	-0,99	-0,79	-0,99	0,45	0,99	0,99	0,8	1

4.5 Estudios moleculares

4.5.1 Verificación de la integridad del ARN purificado

Mediante la técnica de extracción mencionada 3.2.7.4, se logró obtener ARN a partir de hígado de machos adultos, de embriones y de larvas de *R. arenarum* (Figuras 4.13 y 4.14). Este ARN fue cuantificado mediante espectrofotometría, corroborando absorbancias a 260 y 280 nm.

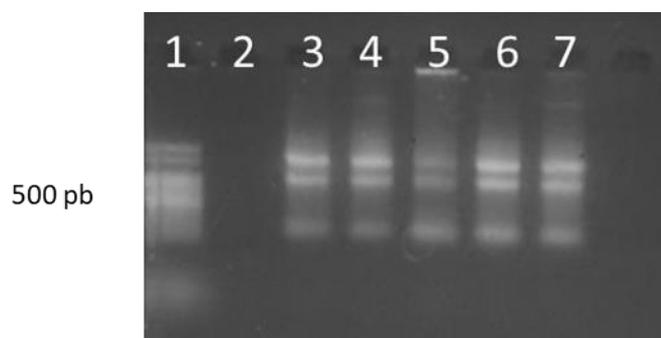


Figura 4.13: ARN purificado a partir de hígado de adultos de *R. arenarum*. Se observa una fotografía representativa de un gel de agarosa 2% obtenido mediante electroforesis. Se observan muestras de ARN purificado (calles 3-7) de hígado de especímenes adultos de *R. arenarum*. El marcador de peso molecular se observa en la calle 1. En el recuadro de la izquierda se marca el tamaño de la banda más brillante (500 pb).

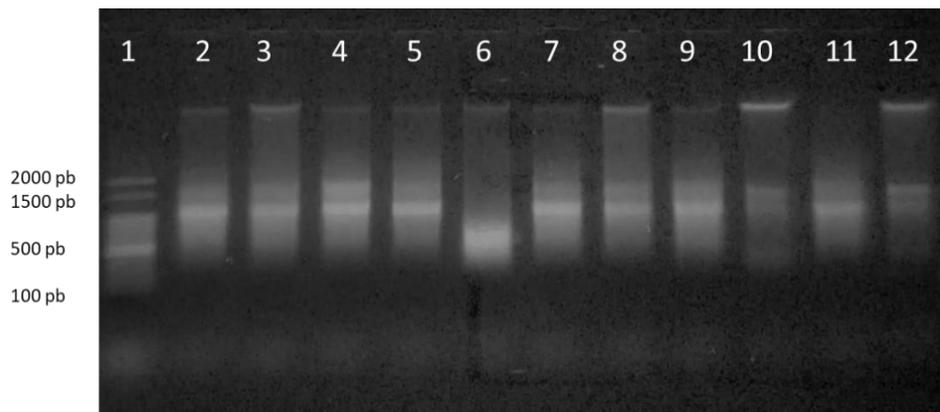


Figura 4.14: ARN purificado a partir de embriones y larvas de *R. arenarum* Se observa una fotografía representativa de un gel de agarosa al 2% obtenido mediante electroforesis. En las calles 2-6 se observan ARN purificados de embriones de *R. arenarum* expuestos a MAZ. En las calles 7-12 se observan ARN purificados de larvas de *R. arenarum* expuestas a CLP. El marcador de peso molecular se observa en la calle 1.

4.5.2 Diseño de cebadores para secuenciación y verificación de la PCR

4.5.2.1 Depuración de secuencias anotadas en el transcriptoma, para el diseño de cebadores específicos

Al realizar la búsqueda de los marcos abiertos de lectura para cada uno de los transcritos, se obtuvieron fragmentos de diferentes tamaños en cada uno de los transcritos anotados. Por esta razón, se seleccionaron para analizar únicamente aquellos cuya longitud fuera mayor a 100 nt. Cada uno de los ORFs arrojados por ORF FINDER fue corroborado primero por SMART BLAST y luego por blastx y blastp. En la mayoría de los casos no se obtuvieron resultados significativos, por lo cual se consideraron aquellos fragmentos más grandes y que dieran resultados significativos con las tres herramientas de BLAST. Es decir, se seleccionaron los fragmentos que correspondían a los genes/proteínas de interés con una identidad mayor al 70% contra especies filogenéticamente relacionadas a *R. arenarum*. En la tabla 4.4 se puede ver el total de transcritos obtenidos para cada gen y los transcritos confirmados por las herramientas de Blast.

Tabla 4.4 Total de transcritos confirmados. Se detalla el número de transcritos anotados para cada gen y el número de transcritos confirmados mediante Blast.

GEN	N° de Transcritos	N° confirmado por Blast
CAT	23	6
ODC	6	1
SOD	43	6
GR	8	3
GST-Pi	6	2
NRF2	2	2
c-JUN	4	3
JNK	2	1
c-FOS	12	3
APAO	2	2
DAO	3	1
AMD1(SAMDC)	2	1
SMOX	2	1
TOTAL	115	32

Las secuencias que cumplieron con dichas condiciones fueron utilizadas para el diseño de cebadores, mediante Primer3 y PrimerBlast. Se diseñaron cebadores para los genes: c-fos, c-jun, nrf2 (factores de transcripción), jnk (cascadas de fosforilación), gr, cat, sod (enzimas antioxidantes), gst (enzima detoxificante) y odc, samdc, apao, dao y smox (vía de poliaminas). Se eligieron los cebadores con las mejores características y que se ubicaron dentro de los marcos abiertos de lectura seleccionados. De esta forma, se pudieron diseñar cebadores para SAMDC y GST_pi (Figura 4.15), SOD y JUN (Figura 4.16), DAO y SMOX (Figura 4.17), SRM y ODC (Figura 4.18), CAT y FOS (Figura 4.19), GR y NRF2 (Figura 4.20) y JNK (Figura 4.21). En el caso de CAT, ODC y FOS no se obtuvieron cebadores de calidad, por lo cual se seleccionaron los que daban mejor amplificación, aunque su longitud excediera la del ORF seleccionado.

Resultados

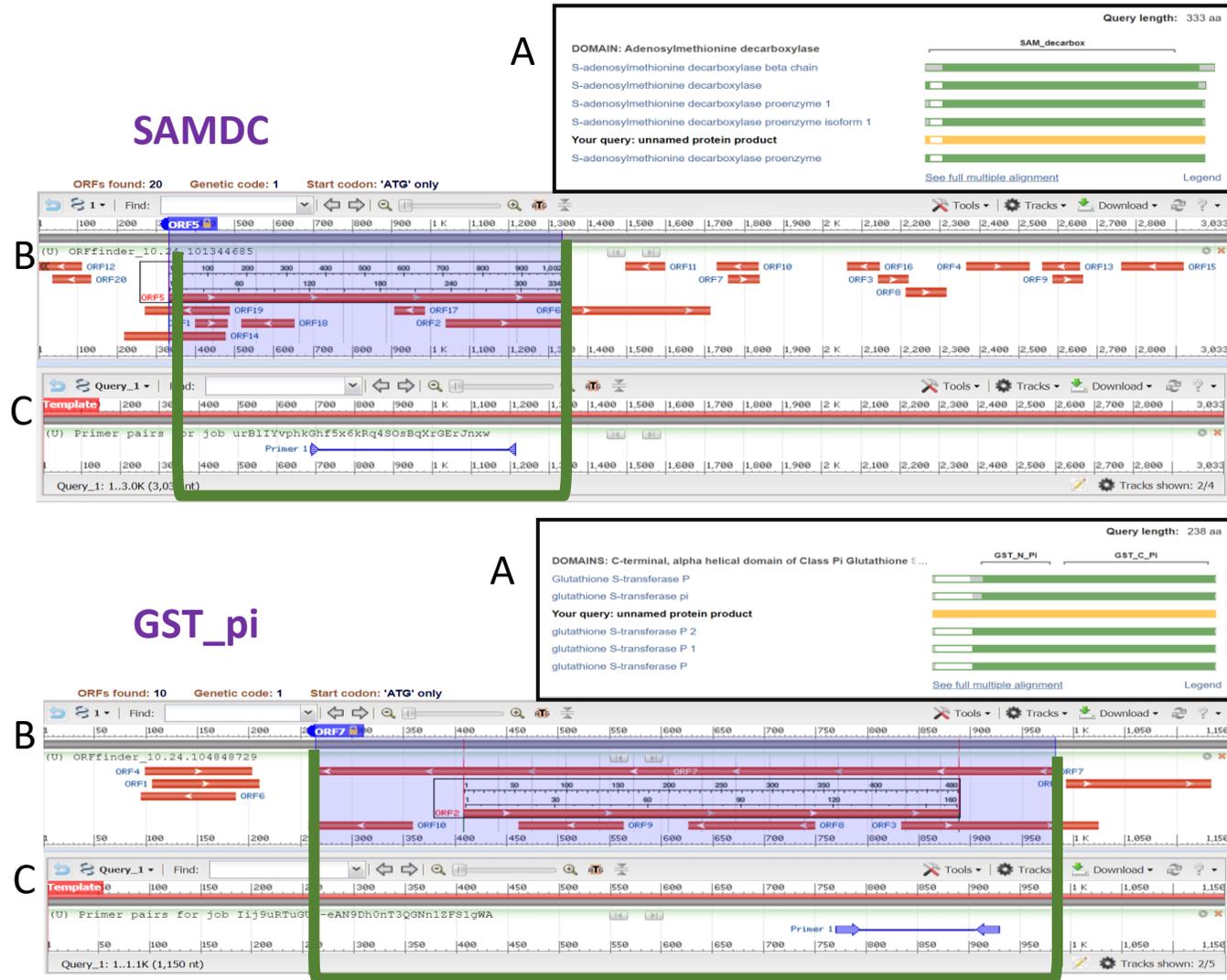


Figura 4.15: Diseño de cebadores para SAMDC y GST-pi. Se observan los resultados arrojados por SMART BLAST (A), ORF FINDER (B) y la ubicación del cebador elegido (C) (*PrimerBLAST*).

Resultados



Figura 4.16: Diseño de cebadores para SOD y JUN. Se observan los resultados arrojados por SMART BLAST (A), ORF FINDER (B) y la ubicación del cebador elegido (C) (PrimerBLAST).

Resultados

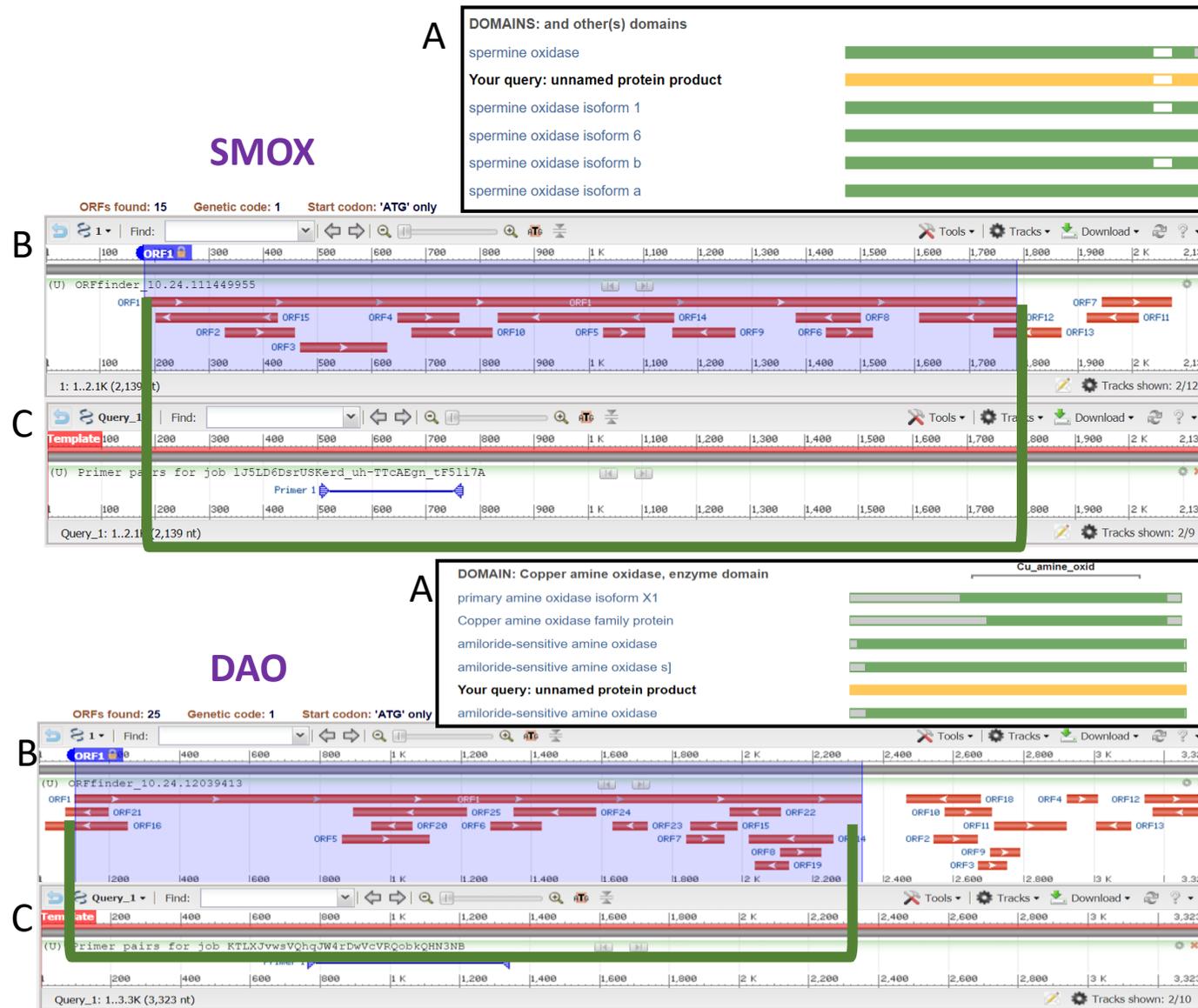


Figura 4.17: Diseño de cebadores para SMOX y DAO. Se observan los resultados arrojados por SMART BLAST (A), ORF FINDER (B) y la ubicación del cebador elegido (C) (*PrimerBLAST*).

Resultados



Figura 4.18: Diseño de cebadores para SRM y ODC. Se observan los resultados arrojados por SMART BLAST (A), ORF FINDER (B) y la ubicación del cebador elegido (C) (*PrimerBLAST*).

Resultados



Figura 4.19: Diseño de cebadores para CAT y FOS. Se observan los resultados arrojados por SMART BLAST (A), ORF FINDER (B) y la ubicación del cebador elegido (C) (*PrimerBLAST*).

Resultados



Figura 4.20: Diseño de cebadores para GR y NRF2. Se observan los resultados arrojados por SMART BLAST (A), ORF FINDER (B) y la ubicación del cebador elegido (C) (*PrimerBLAST*).

En el caso de los transcritos para JNK (Figura 4.20), no se obtuvieron buenos resultados en BLAST (blasx, blasp y SMART BLAST). Sin embargo, se decidió continuar con el diseño del par de cebadores para testear las secuencias.

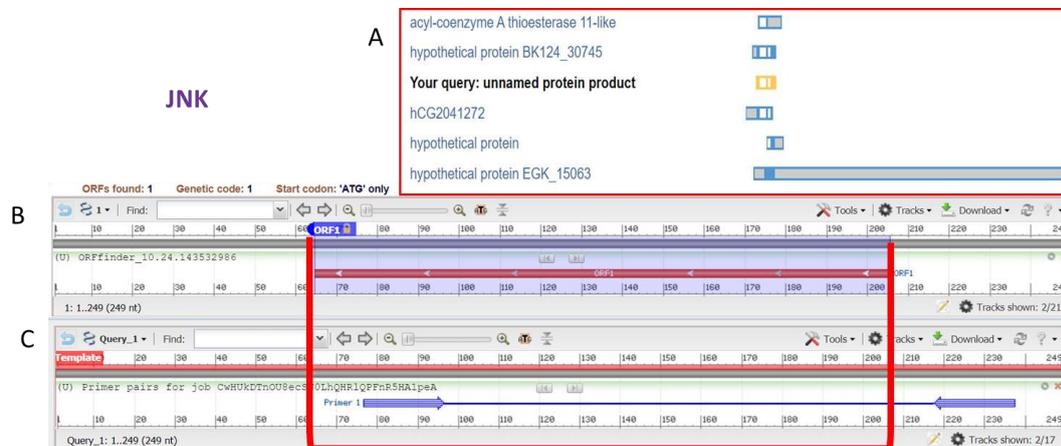


Figura 4.21: Diseño de cebadores para JNK. Se observan los resultados arrojados por SMART BLAST (A), ORF FINDER (B) y la ubicación del cebador elegido (C) (PrimerBLAST).

4.5.2.2 Verificación de los cebadores diseñados mediante PCR a punto final

La puesta a punto de la técnica de PCR para cada par de cebadores se logró en una reacción de volumen final de 20 μ L, con una concentración de 6 mM de $MgCl_2$, 50 μ M de dNTPs, 5 pmol de cada cebador y 0,5 U de la enzima Taq Polimerasa (PB-L). Para la puesta a punto se utilizó ARN de hígado de macho adulto y ARN de larvas de *R. arenarum*.

En las figuras 4.22-4.26 se observan las amplificaciones positivas obtenidas y cuyos productos fueron enviados a secuenciar. Todas las muestras fueron verificadas mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% y visualización en transiluminador UV. En cada caso, se utilizaron muestras de ADNc obtenidas mediante purificación de ARN de hígado de ejemplares adultos de *R. arenarum*, seguido de retrotranscripción.

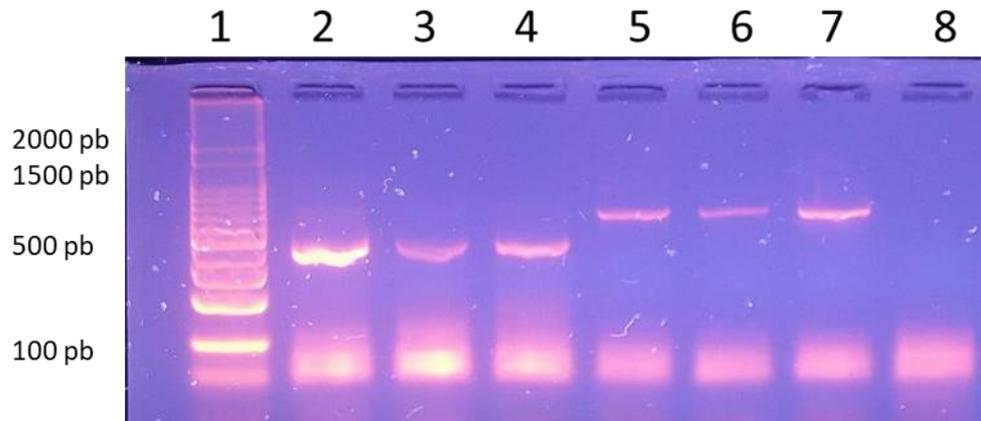


Figura 4.22: Amplificación de los transcritos de ODC y B-ACT1. Se observa la amplificación de dos fragmentos de 500 pb (B-ACT) y de 800 pb (ODC). Calle 1: marcador de Peso Molecular. Calles 2-4: muestras de hígado de adulto de *R. arenarum* amplificadas con los cebadores de B-ACT; Calles 5-7: muestras de hígado de adulto amplificadas con los cebadores de ODC.

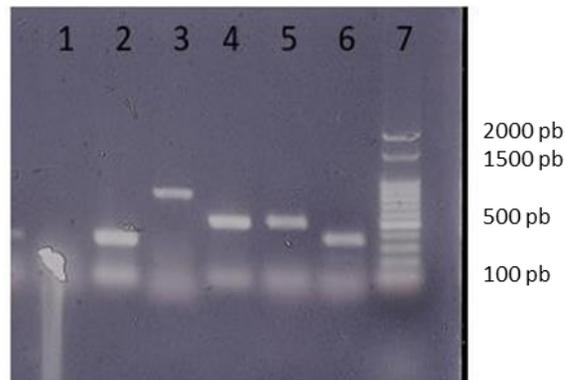


Figura 4.23: Amplificación de los transcritos de JUN, APAO, B-ACT y CAT. Calle 1: control negativo; calle2: fragmento de 200pb correspondiente a la amplificación del transcrito de c-JUN; calle 3: fragmento de 700 pb correspondiente a la amplificación del transcrito de APAO, calles 4 y 5: fragmentos de 500 pb correspondiente al gen control, B-ACT; calle 6: fragmento de 300 pb correspondiente a la amplificación del transcrito de CAT; calle7: Marcador de Peso Molecular.

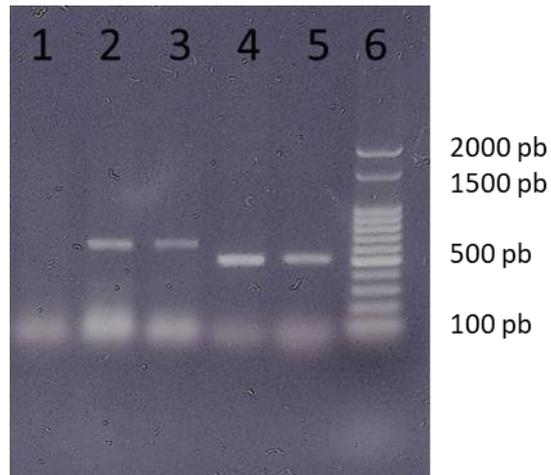


Figura 4.24: Amplificación de los transcritos de NRF2 y SOD. Calle 1: control negativo; calles 2 y 3: fragmentos de 600pb correspondientes a la amplificación del transcrito de NRF2; calles 4 y 5: fragmentos de 500 pb correspondientes a la amplificación del transcrito de SOD; calle 6: Marcador de Peso Molecular de 100 pb.

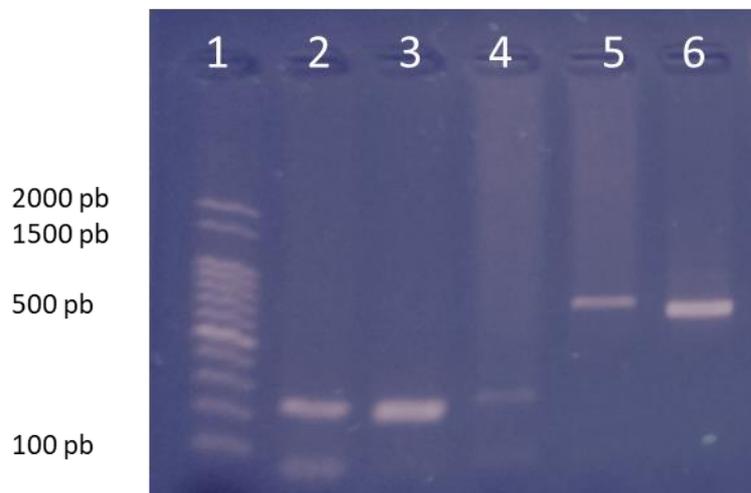


Figura 4.25: Amplificación de los transcritos de JUN, DAO y GST-pi. Calle 1: Marcador de peso molecular; calles 2 y 3: fragmentos de 200pb correspondientes a la amplificación del transcrito de GST-pi; calles 5: fragmentos de aproximadamente 700 pb correspondiente a la amplificación del transcrito de c-JUN; calle 6: fragmento de aproximadamente 700 pb, correspondiente a la amplificación del transcrito de DAO.

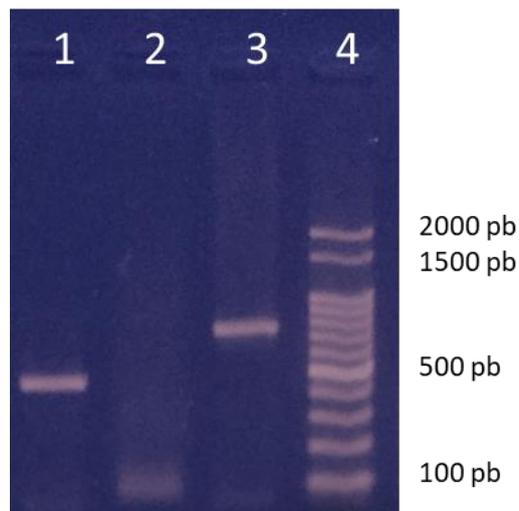


Figura 4.26: Amplificación de los transcritos de SAMDC y JUN. Calle 1: fragmento de 500 pb, correspondiente a la amplificación del transcrito de SAMDC; calle 2: muestra sin amplificar; calle 3: fragmento de aproximadamente 700 pb, correspondiente a la amplificación del transcrito de c-JUN; calle 4: Marcador de peso molecular.

4.5.2.3 Verificación de los productos de PCR mediante secuenciación

Debido a que no se pudieron amplificar todos los genes de interés a partir de los cebadores diseñados, se realizaron dos grupos de secuenciaciones. En el primer grupo se pudo obtener las secuencias de B-ACT, ODC, c-FOS, c-JUN, GST-pi, CAT, APAO, SOD y NRF2. Sobre esas secuencias se realizaron dos controles: un alineamiento contra el transcrito inicialmente utilizado para diseñar el par de cebadores, y un alineamiento en BLAST. El alineamiento entre los transcritos y cada una de las secuencias obtenidas mediante secuenciación se realizó con una versión gratuita del programa Geneious Prime. Los controles fueron hechos con el fin de corroborar que la secuencia amplificada fuera la seleccionada inicialmente, considerando que la información inicial proviene del transcriptoma ensamblado *de novo* y no de un genoma de referencia. En el caso de B-ACT solamente se realizó un alineamiento en BLAST, obteniendo como resultado una similitud del 80% con beta actina de diversas especies.

En los casos de APAO, c-FOS y ODC se pudo corroborar que la región amplificada se correspondía tanto con el transcrito inicial (Figura 4.27), como con el gen de interés en las bases de datos. Además, se pudo comprobar que la

región en donde coinciden ambas secuencias (aquella obtenida por secuenciación y aquella obtenida desde el transcriptoma) se corresponde con los ORFs seleccionados, para los tres genes.

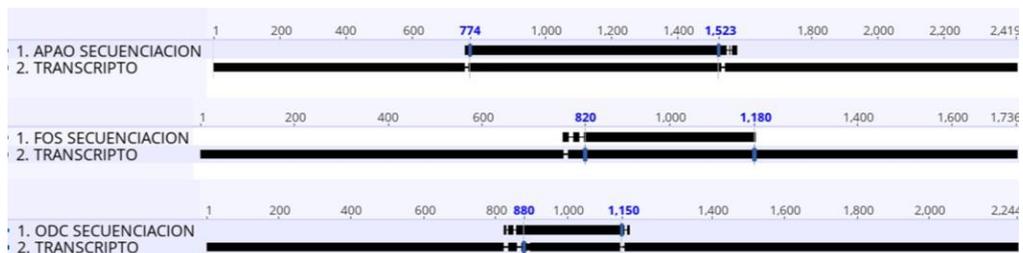


Figura 4.27: APAO, c-FOS y ODC. Se observan los resultados del alineamiento entre la región secuenciada y el transcripto originalmente utilizado. Los números en azul marcan la región con identidad del 100%.

En el caso de CAT, la secuencia obtenida no se corresponde con el transcripto inicialmente utilizado (Figura 4.28) y en el alineamiento con BLAST tampoco se obtuvieron resultados positivos.

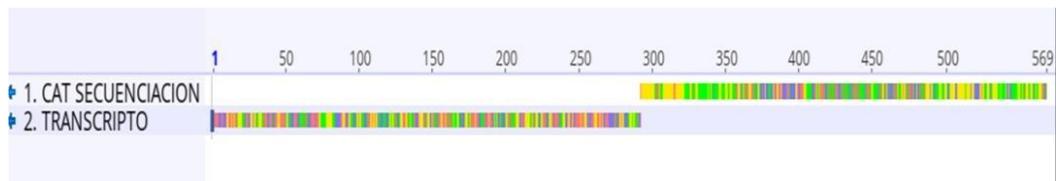


Figura 4.28: CAT. Se observan los resultados obtenidos del alineamiento entre la secuencia del transcripto de CAT utilizado para el diseño de cebadores y la secuencia obtenida mediante secuenciación. No hay regiones de similitud entre ambas secuencias.

Las secuencias obtenidas para GST-pi, SOD, NRF2 y c-JUN no coincidieron en las bases de datos para los genes buscados. Al realizar los alineamientos contra el transcripto original, se puede ver que no hay coincidencia en regiones bien conservadas, sino que solamente coinciden fragmentos entre

ambas secuencias (Figura 4.29), y ninguna se corresponde con el ORF elegido en cada uno de los transcritos.

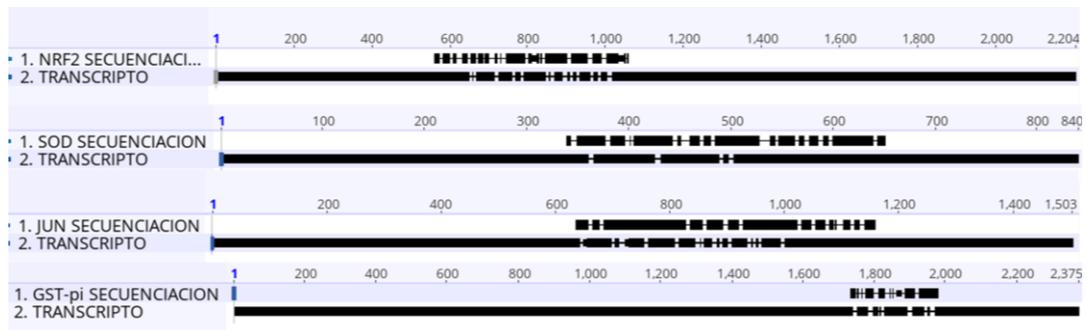


Figura 4.29: NRF2, SOD, c-JUN, GST-pi. Se observan los alineamientos entre ambas secuencias, donde solamente coinciden en fragmentos poco conservados.

En el segundo grupo se diseñaron cebadores para c-JUN, DAO, GST-pi y SAMDC. Para las secuencias de c-JUN y DAO se pudo comprobar que la región amplificada se corresponde con la región seleccionada del transcritto original (Figura 4.30), y que el alineamiento en BLAST arroja resultados positivos para cada caso. Sin embargo, en el caso de las secuencias obtenidas para GST-pi y SAMDC se puede observar que no hay coincidencia en regiones bien conservadas, sino en pequeños fragmentos (Figura 4.31). Al realizar el alineamiento en BLAST, no se encuentran resultados estadísticamente significativos.

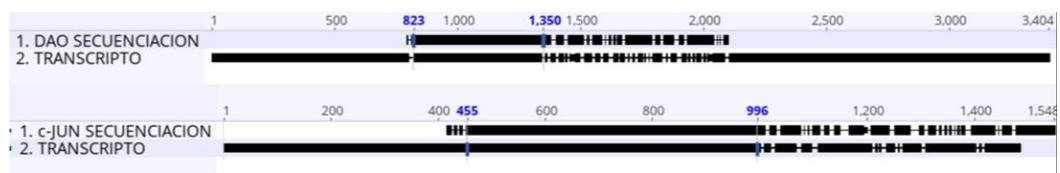


Figura 4.30: DAO y c-JUN. Se observan los resultados del alineamiento entre la región secuenciada y el transcritto originalmente utilizado. Los números en azul marcan la región con identidad del 100%.

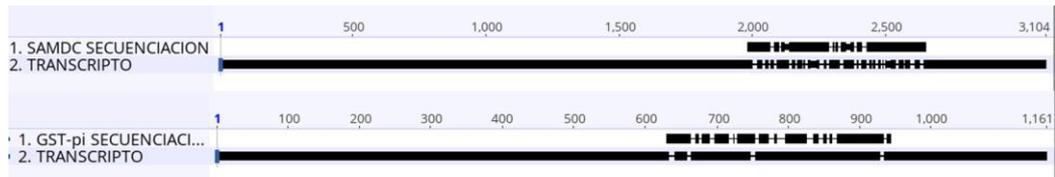


Figura 4.31: SAMDC, GST-pi. Se observan los alineamientos entre ambas secuencias, donde solamente coinciden en fragmentos poco conservados

4.5.3 Verificación del tratamiento con DNAsas

En el caso de las muestras utilizadas para qPCR, se realizó en primera instancia una verificación del tratamiento con DNAsas. Este proceso de verificación se llevó a cabo con los cebadores de B-ACT para cada una de las muestras utilizadas. Para ello se utilizaron como molde los ARN purificados sin tratamiento, ARN con tratamiento y ADNc obtenido a partir del ARN tratado con DNAsas. En la figura 4.32 se observa una fotografía representativa del proceso.

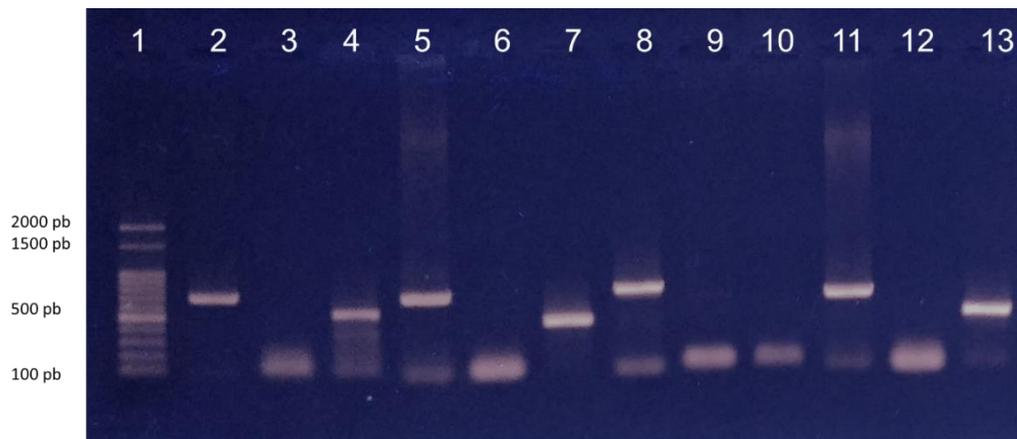


Figura 4.32: Verificación del tratamiento con DNAsa. Se observan muestras de ARN de larvas en estadio n°25 (Del Conte y Sirlin) expuestas y no expuestas a CLP, amplificadas con los cebadores de Beta actina. En las calles 2, 5, 8 y 11 se encuentran las muestras de ARN sin tratamiento con DNAsa; en las calles 3, 6, 9 y 12 se encuentran las mismas muestras de ARN, pero tratadas con DNAsa; y en las calles 4, 7, 10 y 13 se hallan las mismas muestras, pero como ADNc. El marcador de peso molecular se observa en la calle 1, donde la banda más brillante indica el peso de 500 pb.

4.5.4 Validación de cebadores para PCR en Tiempo Real (qPCR), rango dinámico y eficiencia de los mismos

Con el fin de validar los cebadores diseñados para qPCR, se realizaron curvas de estandarización partiendo de una dilución inicial 1/5, la cual representa la mínima concentración que evita la inhibición de la Taq polimerasa presente en la mix (Kit iQtm SYBR® GREEN SUPERMIX). Se realizaron diversas qPCR utilizando los juegos de cebadores indicados en la Tabla 3.2. El ADNc se diluyó 1/5 para generar el ADNc molde para el primer punto de la curva. A partir de este se generaron los moldes de los demás puntos de la curva. Cada punto de la curva se midió por triplicado para disminuir el error y aumentar la precisión. No se pudo calcular el rango dinámico para los cebadores de c-FOS, APAO, ODC, SMOX, SRM y DAO debido a que todas las curvas, en todos los casos ensayados, comenzaron en el orden de los 28-33 ct. Al utilizarse ADNc para la estandarización y debido a que las amplificaciones comenzaron en puntos muy tardíos, no se logró obtener curvas para ninguno de los cebadores mencionados (Figura 4.33). Con el fin de poder mejorar las condiciones, se realizaron dos series de pruebas. Por un lado, se probaron ciclos de pre-amplificación con 5, 10 y 20 ciclos, mediante PCR punto final. Por otro lado, se adicionó DMSO al 5% final al ADNc (Simonović et al., 2012). Dichos productos luego fueron utilizados como molde, a partir del cual se realizaron nuevamente diluciones seriadas. Sin embargo, en dichos ensayos se obtuvieron curvas erráticas, curvas de disociación o *melting* ineficientes y una eficiencia y R² por fuera de los límites permitidos (Figura 4.34).

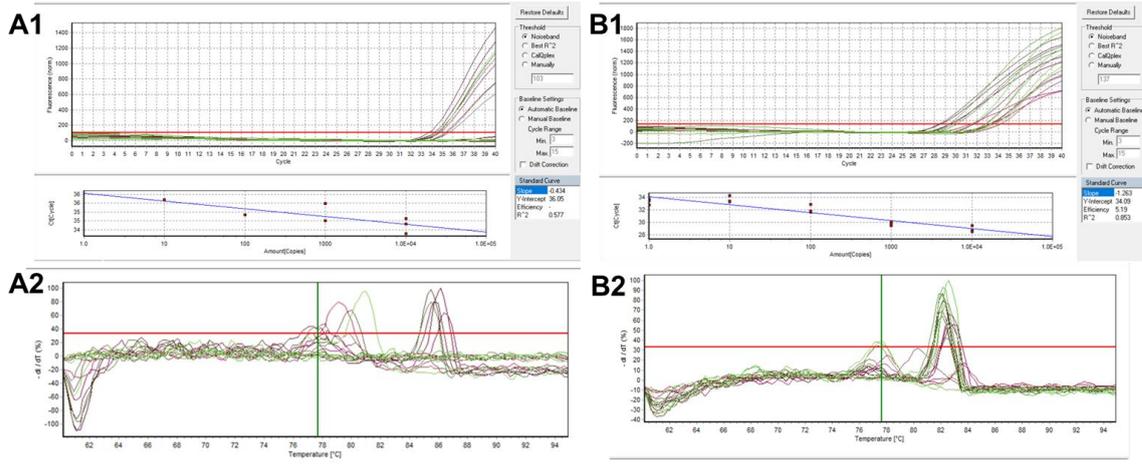


Figura 4.33: Curvas de estandarización de qPCR. Se observan las curvas obtenidas para APAO (A1) y ODC (B1) con sus respectivas curvas de disociación o *melting* (A2 y B2, respectivamente).

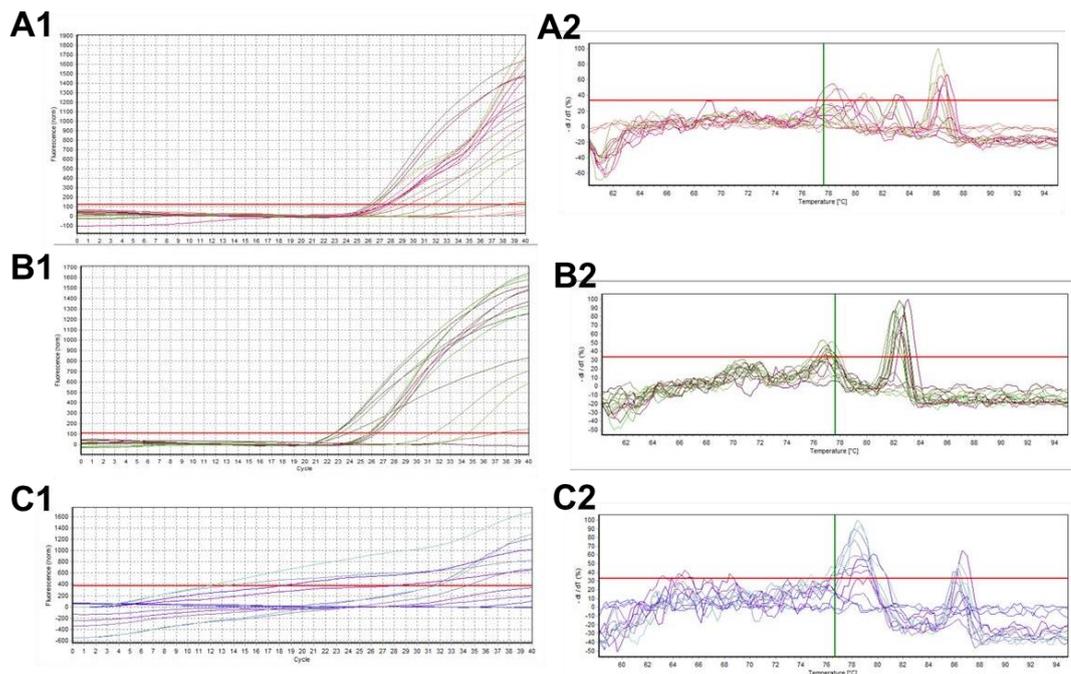


Figura 4.34: Pruebas para aumentar la eficiencia de los cebadores. Se observan las curvas obtenidas para APAO (A1) y ODC (B1) con pre-amplificaciones de 5, 10 y 20 ciclos, con sus respectivas curvas de disociación (A2 y B2, respectivamente). En C1 se observa la amplificación de APAO con adición de DMSO al 5% final y su respectiva curva de disociación en C2.

En el caso de los cebadores para SAMDC, B-ACT y SOD se pudieron realizar curvas de estandarización y cálculo de los RD (Rangos dinámicos) (Figuras 4.35-4.37).

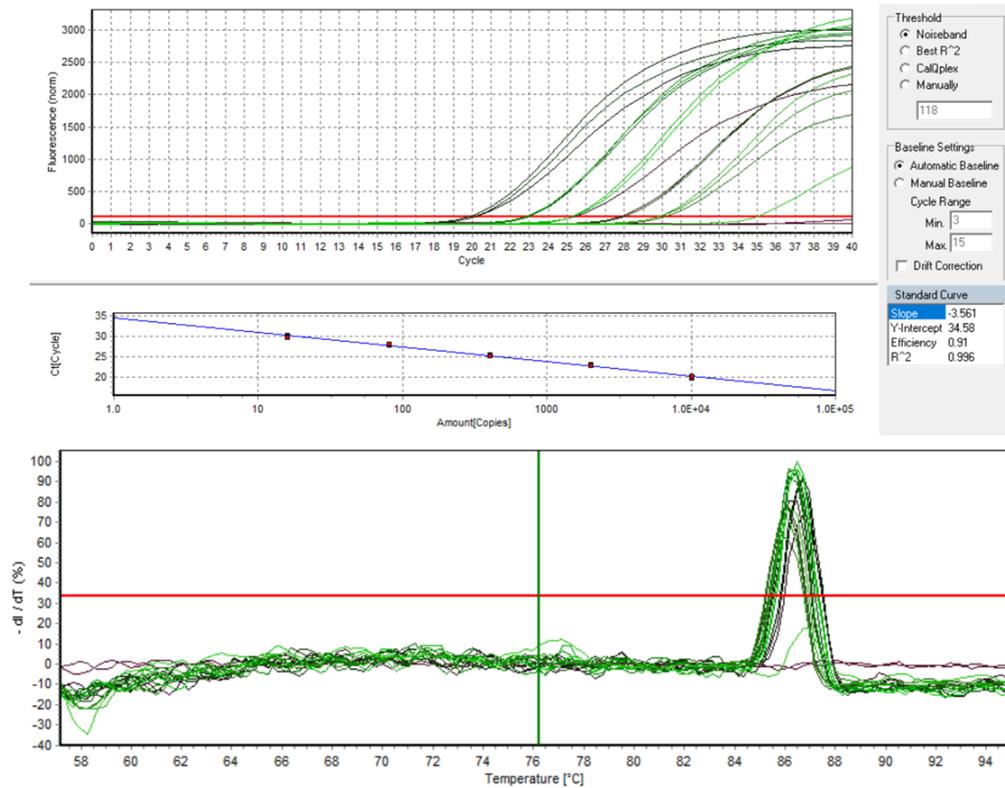


Figura 4.35: Curva de estandarización de B-ACT. Se observa la curva obtenida para los cebadores de B-ACT y su curva de disociación respectiva, obtenidas mediante amplificación de muestras de ADNc de larvas control.

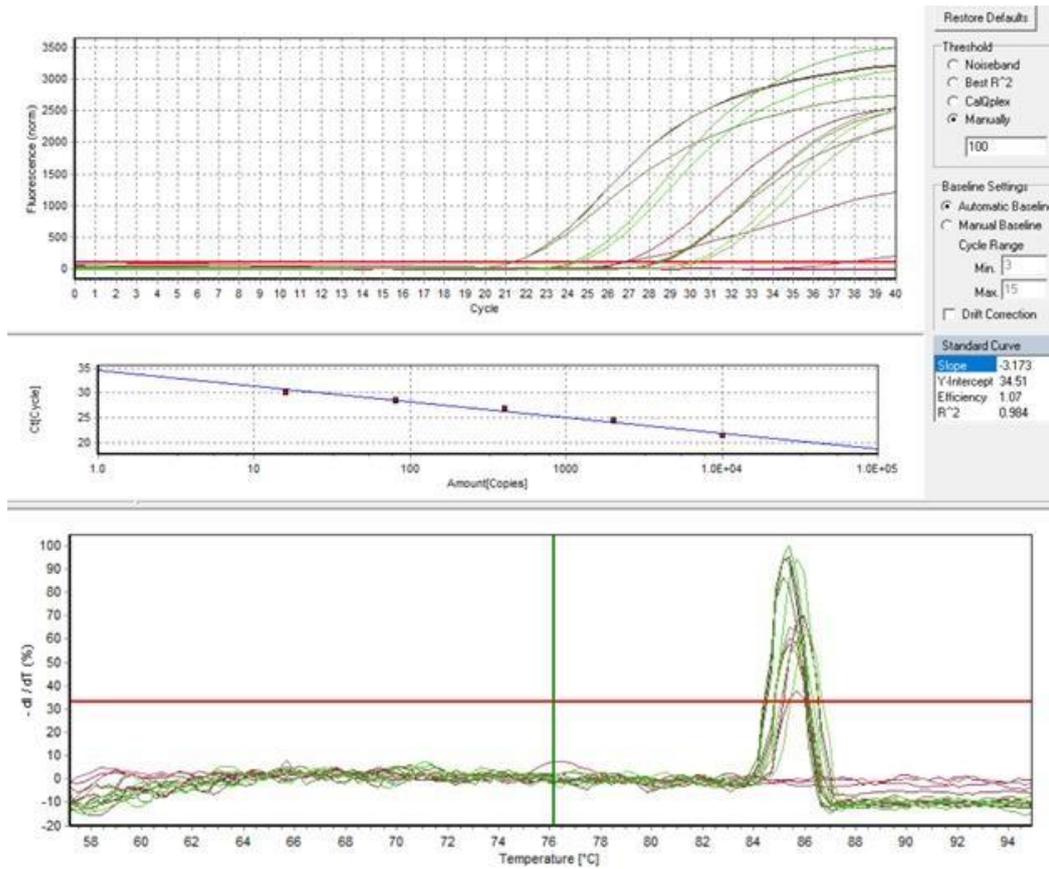


Figura 4.36: Curva de estandarización de SOD. Se observa la curva de estandarización obtenida para los cebadores de SOD y su curva de disociación correspondiente.

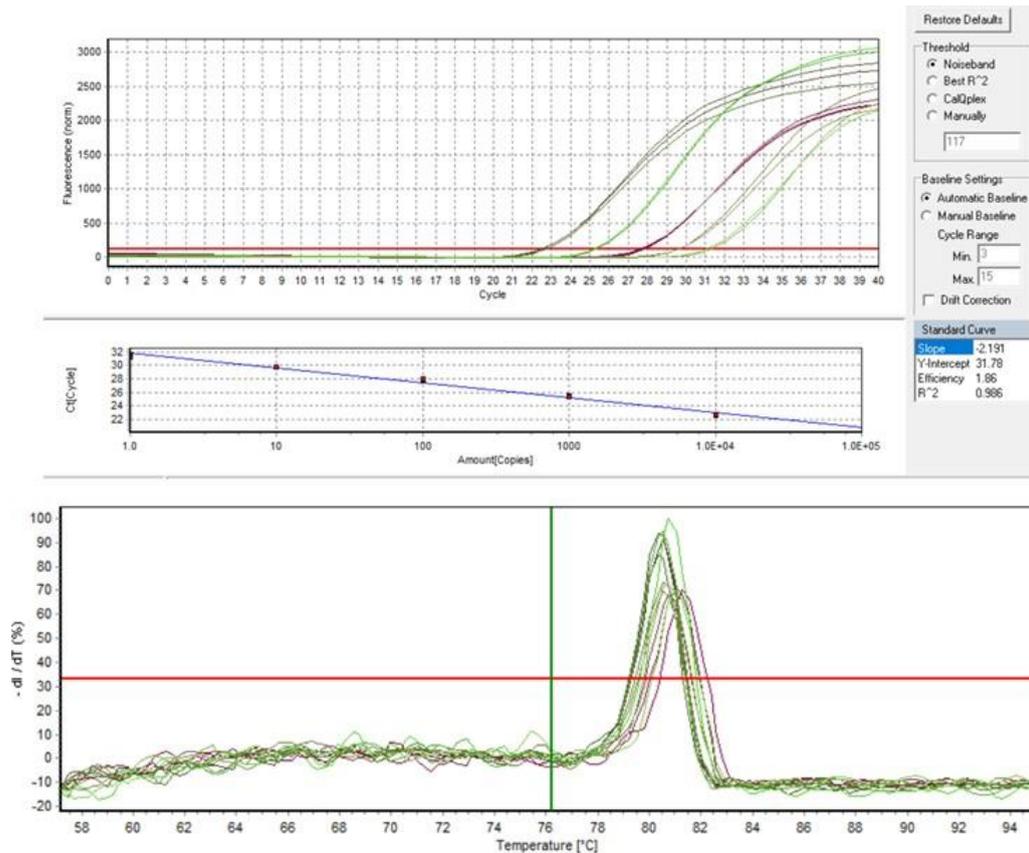


Figura 4.37: Curva de estandarización de SAMDC. Se observa la curva de estandarización obtenida para los cebadores de SAMDC, con su curva de disociación correspondiente.

Con el fin de realizar una cuantificación relativa sobre la expresión de los genes de SOD y SAMDC, utilizando como genes de referencia B-ACT y L8, se utilizó el ensayo de exposición aguda mencionado en la sección 3.2.3.2, con muestras de larvas en estadio n°25, expuestas a concentraciones subletales de CLP (0,5 mg L⁻¹ y 1 mg L⁻¹) y larvas control. El gen L8 (proteína ribosomal L-8) fue seleccionado en base a los genes de referencia más utilizados en *X. laevis* (Šindelka et al. 2006), mientras que el gen B-ACT fue seleccionado debido a su amplio uso como gen de referencia en diversos tipos de muestras y condiciones (Amé et al., 2009). Se realizaron pruebas con dos réplicas biológicas. Sin embargo, los resultados arrojaron una amplia diferencia entre las réplicas, tanto en cantidades como en el tipo de comportamiento de los genes respecto a los tratamientos. Por esta razón, se muestran únicamente los resultados obtenidos del primer lote. Esta selección fue realizada en base a los cambios observables para los 4 transcritos, que presentan un comportamiento más homogéneo en las muestras del lote 1. Sería necesario realizar más experimentos para aumentar el

número de réplicas y así poder determinar con mayor certeza la expresión de los genes mencionados (Figura 4.38).

Por otra parte, se pudo observar que B-ACT no posee una expresión estable para ser utilizada como gen de referencia, por lo cual son necesarios futuros análisis para determinar cuáles deberían ser los genes de referencia a utilizar en *R. arenarum*. En el caso de L8 se pudo observar una mayor estabilidad en su expresión, por lo cual se utilizó como gen de referencia para estas muestras.

Como puede verse en la figura 4.37, tanto B-ACT como SAMDC y SOD tienden a aumentar su expresión en las muestras expuestas a 0,5 mg L⁻¹ de CLP durante 12 h, para luego disminuir abruptamente a las 24 h, con respecto a las muestras control. En las muestras expuestas a 1 mg L⁻¹ se puede ver una tendencia al aumento continuo en la expresión de B-ACT y SAMDC, a lo largo del tiempo de exposición, mientras que SOD tiende a permanecer sin cambios en las muestras expuestas a lo largo de la exposición aguda.

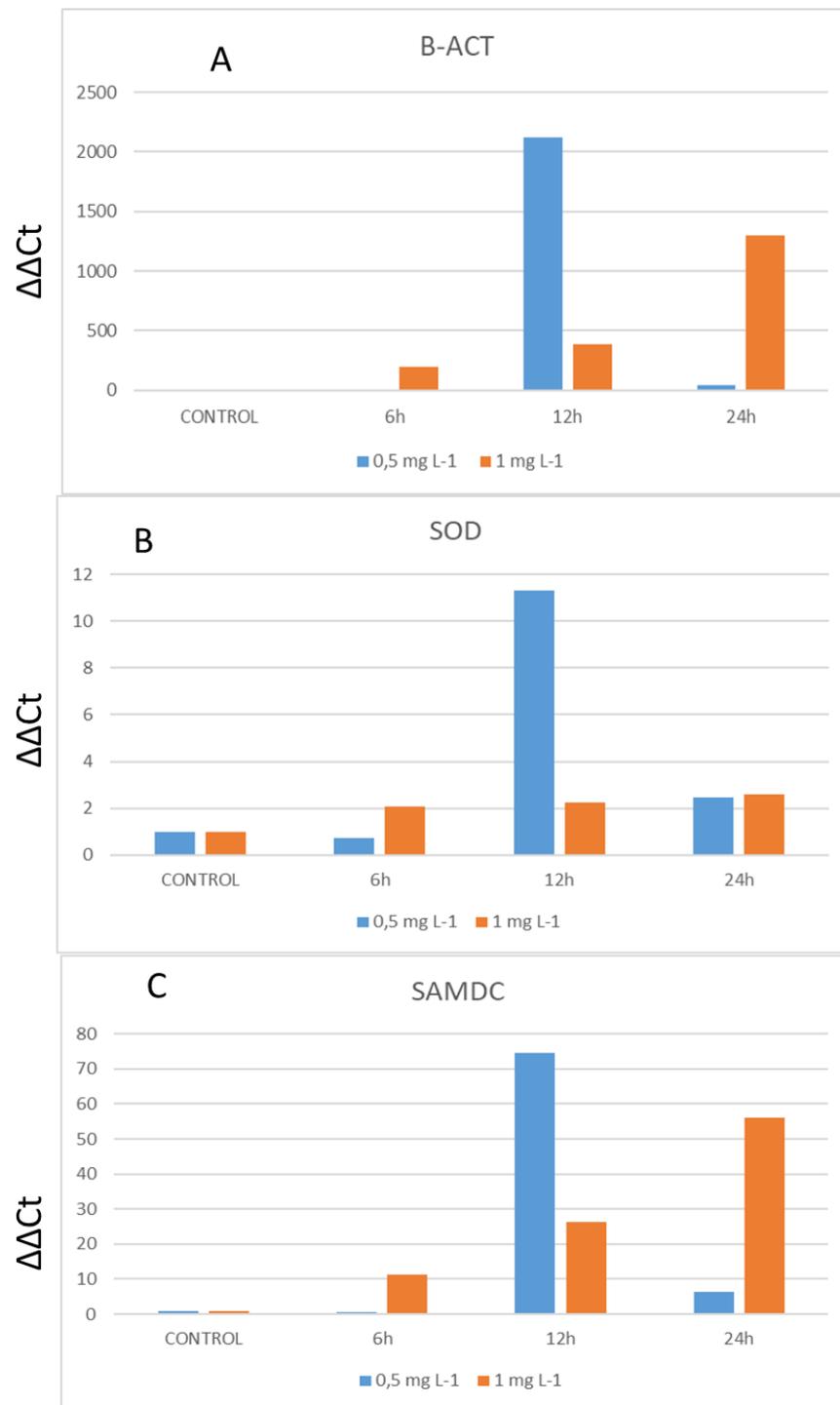


Figura 4.38: qPCR de B-ACT, SOD y SAMDC. Se observan los valores calculados de $\Delta\Delta C_t$ para cada uno de los genes, relativizados al gen de referencia L8. A: Beta actina; B: SOD; y C: SAMDC. Se observan las muestras de larvas control y las larvas expuestas a CLP 0,5 y 1 mg L⁻¹.

4.5.5 Análisis de la expresión mediante RNA-Seq

Mediante la secuenciación masiva del transcriptoma de *R. arenarum* se pudo obtener una cuantificación relativa de los genes de interés para este trabajo de tesis, lo que permitió evaluar su expresión diferencial. Las lecturas obtenidas fueron normalizadas mediante el método TMM (*Trimmed Mean of M-values*). Este es un método simple y efectivo para estimar los niveles relativos de los transcritos expresados desde los datos obtenidos por RNA-Seq. El método TMM permite estimar factores entre muestras que pueden ser incorporados a un método estadístico para el análisis de la expresión diferencial (Robinson and Oshlack 2010).

En la Tabla 4.5 se muestran los valores de TMM obtenidos para cada uno de los transcritos anotados, tanto en las muestras control como en las muestras expuestas a CLP y MAZ.

Tabla 4.5: Valores de TMM obtenidos para cada uno de los transcritos anotados como SAMDC, SOD, DAO, CAT, GSH, GSS (glutación sintetasa), GST-pi, B-ACT, ODC, L8, c-JUN, c-FOS, APAO, SRM, EF1G-A y NRF2.

SAMDC	Trinity_Id	Control	MAZ 6 h	MAZ 24 h	CLP 6 h	CLP 24 h
	DN1908_c0_g1	158,519	146,4455	134,68	129,626	133,0825
	DN11186_c0_g1	3,156	5,5475	2,487	5,9185	1,8595
	DN118331_c0_g1	0,556	0	0	0,3275	0,443
	DN88351_c0_g1	0,451	0,4875	0	0	0,5035
SOD						
	DN7703_c0_g1	716,2695	729,7995	642,971	533,5285	654,351
	DN101092_c0_g1	1,527	0	0	0	0,3375
	DN75929_c0_g1	0	0,3095	0	0,357	1,264
	DN10074_c0_g1	57,968	49,3565	56,193	43,389	77,6005
	DN10074_c0_g1_i7					
	DN26189_c0_g1	0,5875	0,5465	0,2915	0,449	0,4995
CATALASA						
	DN95098_c0_g1	114,2775	117,4775	112,886	107,605	106,5895
	DN15500_c0_g2	4,9285	4,8055	3,9125	3,4895	3,4965
	DN79504_c0_g1	0,5825	0	0	0,365	0,3285
	DN27063_c0_g1_i2	0,538	0,7615	0,4805	0,464	0,5865
	DN96242_c0_g1	0	0	0	0,5145	0,1615
	DN89452_c0_g1	0,669	0	0,159	0,1545	0
	DN92940_c0_g1	0,5865	0,3145	0	0	0
DAO (AOC1)						
	DN628_c0_g1_i1	60,289	46,798	46,526	31,064	46,7855
	DN3765_c0_g1_i1	21,8265	16,6115	13,8095	12,203	16,7855
	DN16691_c0_g1_i3	23,8135	16,983	15,0425	12,2705	14,537
	DN9213_c0_g1_i4	17,1835	14,3435	11,8725	8,571	11,022
	DN8997_c0_g1_i	10,303	7,859	9,58	5,9055	9,3815
	DN9524_c0_g1	10,0145	5,5055	6,1605	3,4145	5,03
	DN9075_c0_g1	2,606	1,863	3,2635	3,1815	4,7545
	DN6078_c0_g1	2,0965	2,617	2,394	3,4205	2,3815
SMOX						
	DN4607_c0_g2	13,5355	12,091	12,857	18,033	16,011
APAO						
	DN17055_c0_g1_i2	1,761	1,759	2,2035	2,1135	1,8495
	DN25296_c0_g1	5,1925	6,1165	5,073	6,7845	4,783
SRM						
	DN6580_c0_g1	52,6395	49,4675	50,4525	45,2585	43,082
	DN111437_c0_g1	0,8245	0,467	0	0	0,4795
	DN101127_c0_g1	0,1795	0,569	0	0,215	0
	DN50845_c0_g1	0,2305	0,32	0	0,3455	0,4685
	DN68233_c0_g1	0,165	0,528	0	0,7975	0,3525

Tabla 4.5: Continuación.

GSTpi						
	DN2602_c0_g1	423,076	463,872	531,549	481,634	483,4575
	DN1275_c0_g1	335,122	305,736	203,59	219,498	232,9575
GSH						
	DN1892_c0_g1	21,0185	16,575	17,8585	16,748	15,6475
	DN109410_c0_g1	0,281	0,3045	0,612	0,352	0,313
GSS						
	DN37853_c0_g1	5,941	6,853	5,0605	4,9335	4,894
JUN						
	DN5420_c0_g1	9,644	11,305	12,813	12,887	8,579
	DN7542_c3_g1	0,414	0,3265	0,4145	0,34	0,26
	DN1443_c0_g1	14,019	17,2215	19,557	20,8545	11,9195
	DN70281_c0_g1	23,309	23,7045	21,7365	24,043	21,549
	DN1815_c2_g1	0,435	0,4725	0,609	0,619	0,628
NRF2						
	DN15220_c0_g1	136,796	128,1215	107,588	101,712	101,3735
B-ACT						
	DN1137_c0_g1	341,014	326,236	393,843	379,594	383,546
ODC						
	DN108946_c0_g1	0,669	0,533	0,2	0	0,54
	DN74716_c0_g1	0,1165	0	0,1335	0,137	0,121
	DN97217_c0_g1	0,5235	0,2385	0	0,088	0,156
	DN1269_c0_g1	160,361	142,422	152,772	171,7005	148,586
	DN26825_c0_g1	0	0,432	0	0,54	0,4745
	DN53849_c0_g1	0,404	0,35	0	0,1555	0,0705
L8						
	DN7564_c0_g1	953,8685	986,3605	1261,9595	1131,618	1206,1055
	DN50910_c0_g1	1,39	0,2355	0,358	0,6935	0,3505
	DN103_c1_g1	1,287	0,811	0,102	1,0075	0,6935
EF1G-A						
	DN94221_c0_g1	3079,9865	3252,3885	2876,0835	2660,362	3099,4815
FOS						
	DN39561_c0_g1	1,909	0,7485	2,725	2,8965	1,4015

Tomando como referencia datos bibliográficos (Radonić et al. 2004, Šindelka et al. 2006) se consideraron como posibles genes de referencia a aquellos detallados en la tabla 4.6. Para estos transcritos se realizó un análisis con el fin de determinar en primera instancia su estabilidad, considerando los valores mínimos, máximos, el desvío estándar (DS) y la mediana. Sobre estos datos de TMM se realizó un test de medianas y Kruskal- Wallis, lo que permitió identificar aquellos transcritos que no serían apropiados para ser utilizados como potenciales genes de referencia: G3P (gliceraldehído-3P- deshidrogenasa), las tubulinas TBA2, TBA3, TBA4 y actina ACT3. De esta forma se seleccionaron 5 de los que poseen menor variación para normalizar los valores de TMM de cada transcripto de interés. Los transcritos seleccionados fueron: EF1A0, EF1GA, TBA1, ACTB, y L8.

Tabla 4.6: Valores de TMM para los genes de referencia utilizados.

Gen ID	Descripcion	Promedio	min	max	DS	mediana
EF1A0	Elongation factor 1-alpha, somatic form	7329,9019	6610,653	8457,653	586,431948	7265,417
EF1B	Elongation factor 1-beta	583,3611	498,613	676,856	64,3219937	589,3745
EF1D	Elongation factor 1-delta	922,0817	800,664	1074,688	98,2593517	910,409
EF1GA	Elongation factor 1-gamma-A	2993,6604	2611,192	3344,113	252,858381	2968,1705
G3P	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1821,9625	1289,485	2425,112	411,341907	1768,264
RL8	60S ribosomal protein L8	1107,9824	883,622	1309,297	134,766882	1131,618
TBA	Tubulin alpha chain	1001,8979	891,015	1071,425	68,3394498	1024,83
TBA	Tubulin alpha chain	371,3185	267,404	485,068	88,0813014	405,3
TBA	Tubulin alpha chain	239,7338	133,623	353,519	81,4424414	219,747
TBA	Tubulin alpha chain	216,9025	145,201	314,891	78,6279846	172,7365
TBA1	Tubulin alpha-1 chain	146,0541	98,146	195,541	31,752644	142,0985
TBB	Tubulin beta chain	312,2611	212,781	359,48	42,8372	322,152
TBB	Tubulin beta chain	206,1056	137,387	250,382	30,8916968	211,575
TBB4B	Tubulin beta-4B chain	219,0352	137,054	253,671	33,2660736	224,5065
ACTB	Actin, cytoplasmic 1	363,629778	301,679	394,429	37,1574461	380,349
ACT3	Actin, alpha sarcomeric/skeletal	90,1374	15,086	259,371	73,2537913	61,9065

Además, se realizó un análisis no paramétrico con el test de medianas y Kruskal-Wallis, utilizando los valores de TMM relativizados por el promedio de genes de referencia seleccionados y por control. Se analizaron los valores de expresión obtenidos a partir del experimento de RNA-Seq para los genes involucrados en estrés oxidativo (GR, GSH, GST-pi, CAT, SOD, GSS) y las enzimas blanco AChE y CbE; genes involucrados en el metabolismo de poliaminas (APAO, DAO, SMOX, SSAT, SAMDC/AMD1, ODC, SpmS); genes de referencia (EF1-a, EF1-GA, L8, B-ACT, Tubulina, GAPDH3, C-ACT) y genes de cuatro

factores de transcripción (c-JUN, c-FOS, NRF2 y eEIF5A).

En el caso de los genes que codifican enzimas involucradas en la respuesta antioxidante y las enzimas blanco, únicamente se observaron diferencias en GPX3 y AChE. En ambos casos se observa un aumento de la expresión (Figura 4.39). En el caso de GPX3, se observa una tendencia a aumentar en todas las muestras expuestas a MAZ y CLP, tanto a 6 como a 24 h de exposición, con respecto a las muestras control. El test de medianas arrojó un $p = 0,09$, y la prueba K-W arrojó un $p = 0,078$. En el caso de AChE, se puede observar un aumento de expresión en las muestras expuestas a MAZ durante 24 h y en las muestras expuestas a CLP por 6 h, con un $p = 0,09$ para el test de medianas y un $p=0,016$ para K-W.

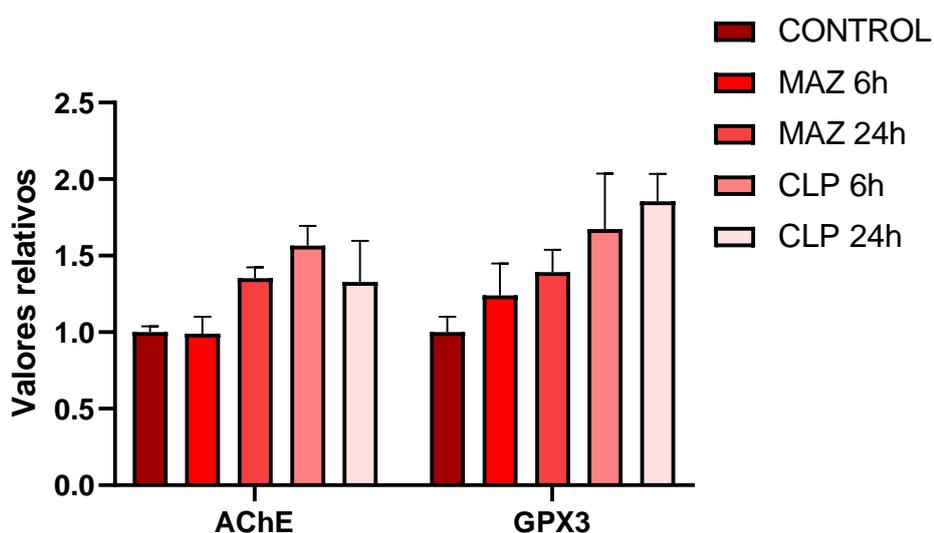


Figura 4.39: Niveles de expresión para AChE y GPX3. Se presentan los niveles expresados como valores relativos al control, para los transcritos de AChE y GPX3. Los niveles de expresión fueron evaluados en larvas control y larvas expuestas a MAZ y CLP, durante 6 y 24 h.

El análisis de la expresión de los genes relacionados con el metabolismo de poliaminas demostró que el gen de AdoMetDC (SAMDC) es el que muestra mayor variación en su expresión en larvas expuestas a plaguicidas OF respecto de las larvas control (Figura 4.40). Si se compara la expresión de SAMDC con la de APAO, se observa que ocurre algo similar en las muestras

expuestas tanto a MAZ como a CLP. Por un lado, se observa un aumento de la expresión de ambos genes en las larvas expuestas durante 6 h a MAZ, para luego disminuir en aquellas expuestas durante 24 h. En el caso de SAMDC, los niveles de expresión de las larvas expuestas por 24 h a MAZ disminuyeron respecto de las 6 h de exposición, pero continúan siendo aproximadamente 2,5 veces superiores a los niveles control ($p = 0,09$ para test de medianas y $p = 0,089$ para K-W); mientras que la expresión de APAO en los mismos individuos retorna a valores cercanos al control. En aquellas larvas expuestas a CLP durante 6 h, se observa un aumento de la expresión de ambos genes respecto del control. Al continuar la exposición a CLP hasta 24 h, la expresión de APAO retorna a valores cercanos al control mientras que la expresión de SAMDC continúa elevada.

En el caso del transcripto correspondiente a SSAT2 (SAT2) se observa una disminución de la expresión en las larvas expuestas a MAZ durante 6h, para luego volver a valores control a las 24 h; mientras que las muestras expuestas a CLP se mantienen en igual nivel de expresión entre sí a 6 y 24 h, pero con una disminución de la expresión con respecto al control ($p = 0,089$, K-W). Lo mismo ocurre en SSAT1 (SAT1), donde las muestras expuestas a CLP disminuyen su nivel de expresión en comparación con las muestras control. Una respuesta similar se observó en la expresión de este gen en larvas expuestas a MAZ durante 24 h. En el caso de SMOX, se pudo observar que las larvas expuestas a CLP mostraron un ligero aumento de la expresión de dicho gen, mientras que la exposición a MAZ no alteró de manera significativa su expresión (Figura 4.40).

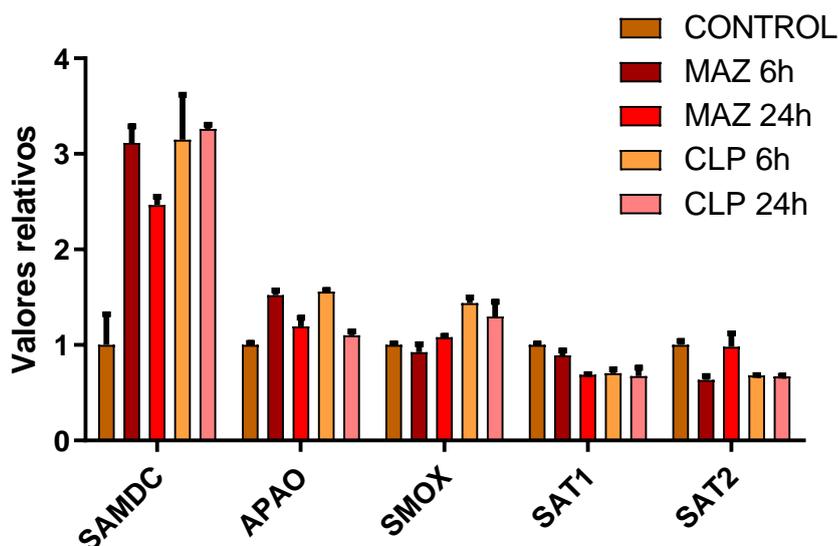


Figura 4.40: Niveles de expresión para genes del metabolismo de poliaminas. Se pueden observar los niveles expresados como valores relativos al control, para los transcritos de AdoMetDC (SAMDC), APAO, SMOX, SSAT1 (SAT1) y SSAT2 (SAT2). Los niveles de expresión fueron evaluados en larvas control y larvas expuestas a MAZ y CLP, durante 6 y 24 h.

En cuanto a ODC1-A, los niveles de expresión del transcripto fueron similares frente a la exposición con los dos plaguicidas: la expresión disminuyó a las 6 h y volvió a aumentar a las 24 h, tanto en MAZ como en CLP, con respecto a los niveles del control ($p = 0,09$, test de medianas y $p = 0,09$ con K-W, para ambos casos) (Figura 4.41). En lo que respecta al análisis de DAO, el tratamiento con MAZ generó una disminución en su expresión en larvas expuestas por 6 y 24 h, con respecto al control. De forma similar, en las larvas expuestas a CLP por 6 h se observó una disminución de la expresión de DAO, con respecto al control. Sin embargo, en aquellas larvas expuestas durante 24 h a CLP se observa un incremento de la expresión, respecto de las larvas expuestas por 6 h ($p = 0,017$ para el test de medianas y $p = 0,03$ para K-W). Sin embargo, estos valores siempre se encontraron por debajo de los niveles de expresión de larvas control (Figura 4.41).

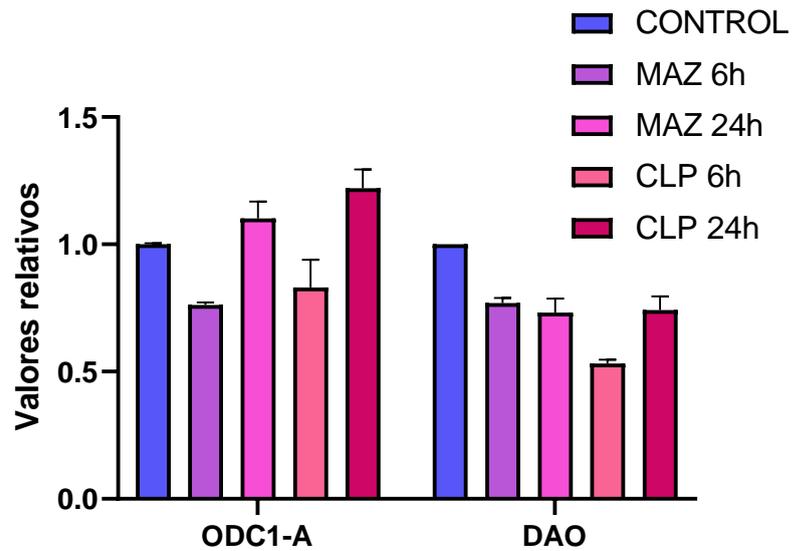


Figura 4.41: Niveles de expresión para ODC-1 y DAO. Se pueden observar los niveles expresados como valores relativos al control, para los transcritos de ODC1 y DAO. Los niveles de expresión fueron evaluados en larvas control y larvas expuestas a MAZ y CLP, durante 6 y 24 h.

En las Figuras 4.42, 4.43 y 4.44 se presentan los resultados obtenidos para aquellos genes considerados como potenciales genes de referencia. En la Figura 4.42 se observan los resultados obtenidos en el análisis de expresión de tubulinas, donde se puede observar que los transcritos de TBA2, 3 y 4 son los que más variación presentan en su expresión en las larvas expuestas por 6 y 24 h a MAZ y CLP.

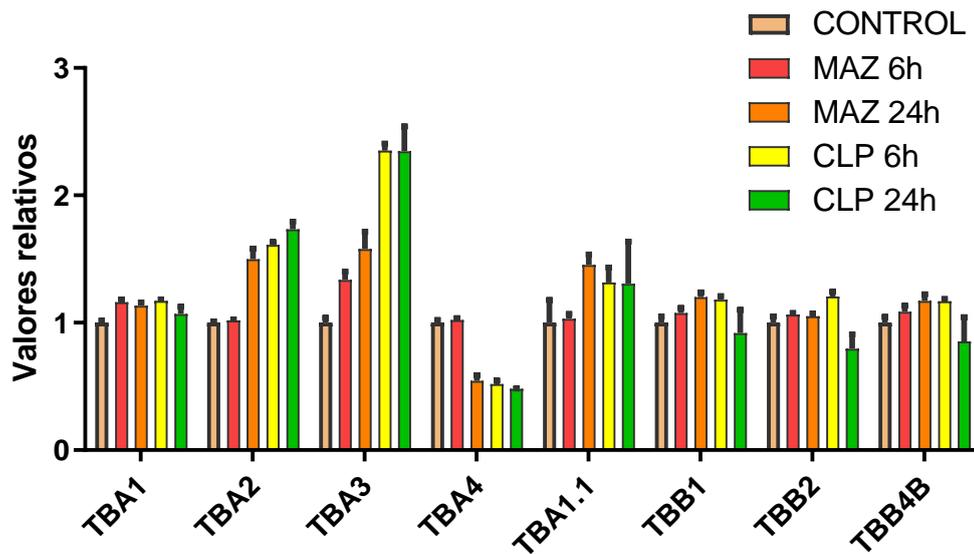


Figura 4.42: Niveles de expresión para los transcritos de Tubulina. Se pueden observar los niveles expresados como valores relativos al control, para las isoformas de los transcritos anotados como Tubulina alfa (TBA) y beta (TBB). Los niveles de expresión fueron evaluados en larvas control y larvas expuestas a 0,5 y 0,1 mg L⁻¹ MAZ y CLP, respectivamente, durante 6 y 24 h.

En la Figura 4.43 se puede observar los valores relativos de expresión de los transcritos de beta actina (B-ACT y ACT3), siendo ACT3 el transcripto que más variación presenta ($p = 0,09$, test de medianas). Los transcritos de G3P, L8 y B-ACT son los de expresión más estable dentro de este grupo.

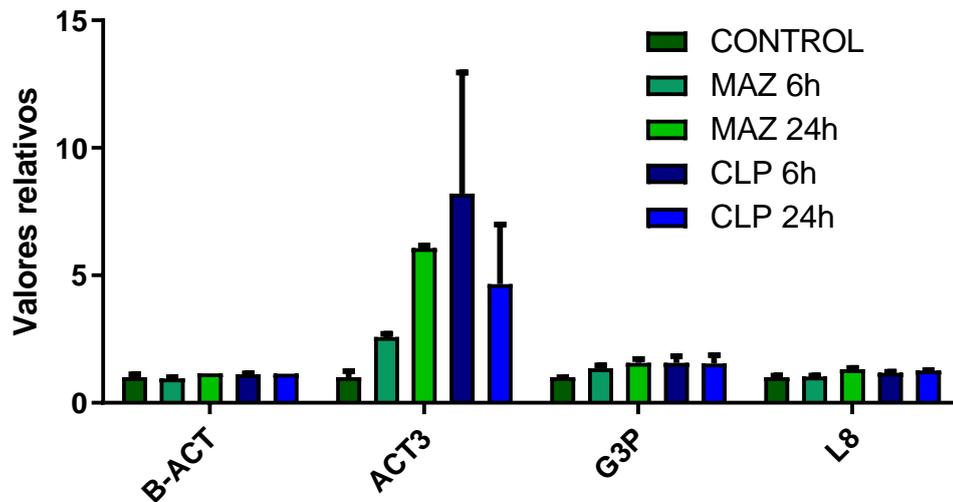


Figura 4.43: Niveles de expresión para actina, G3P y L8. Se pueden observar los niveles expresados como valores relativos al control, para los transcritos de beta actina (B-ACT), actina citoplasmática (ACT3), gliceraldehido-3P-dehidrogenasa (G3P) y la proteína ribosomal 60S (L8). Los niveles de expresión fueron evaluados en larvas control y larvas expuestas a MAZ y CLP, durante 6 y 24 h.

En el caso de los transcritos anotados como factor de elongación 1 (EF1) alfa, beta, delta y gamma (Figura 4.44), se puede observar que en general varían muy poco en su expresión.

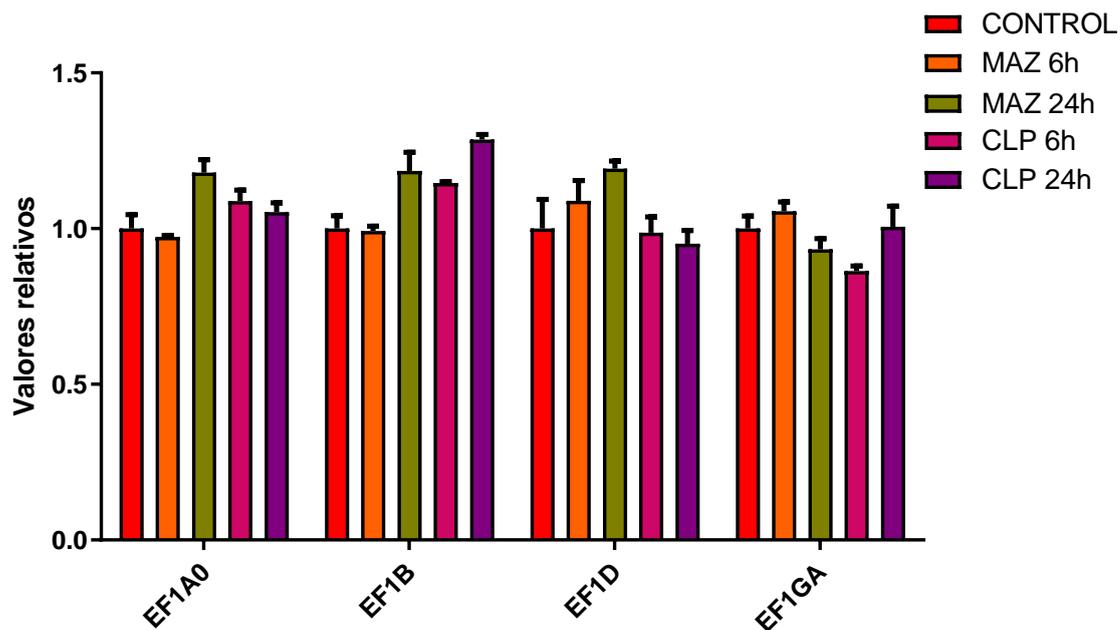


Figura 4.44: Niveles de expresión para los transcritos de EF1. Se pueden observar los niveles expresados como valores relativos al control, para los transcritos del factor de elongación alfa (A), beta (B), delta (D) y gama (G). Los niveles de expresión fueron evaluados en larvas control y larvas expuestas a MAZ y CLP, durante 6 y 24 h.

En el caso de los factores de transcripción (Figura 4.45), se hallaron diferencias significativas para NRF2 en las muestras expuestas a MAZ durante 24 h y en aquellas expuestas a CLP durante 6 y 24 h ($p = 0,09$ para test de medianas y $p = 0,16$ para K-W). También se observan diferencias en la expresión de c-FOS para las muestras expuestas a MAZ durante 6 h y a CLP, expuestas durante 6 y 24 h ($p = 0,09$ para test de medianas y $p = 0,07$ para K-W). Los niveles de expresión del factor de transcripción eIF5A también fueron evaluados, debido a su relación con espermidina, como se ha mencionado anteriormente. Estos niveles muestran una tendencia al aumento en las muestras expuestas a MAZ y CLP durante 24 h, con un $p = 0,09$ para el test de medianas y un $p = 0,11$ para K-W (Figura 4.45).

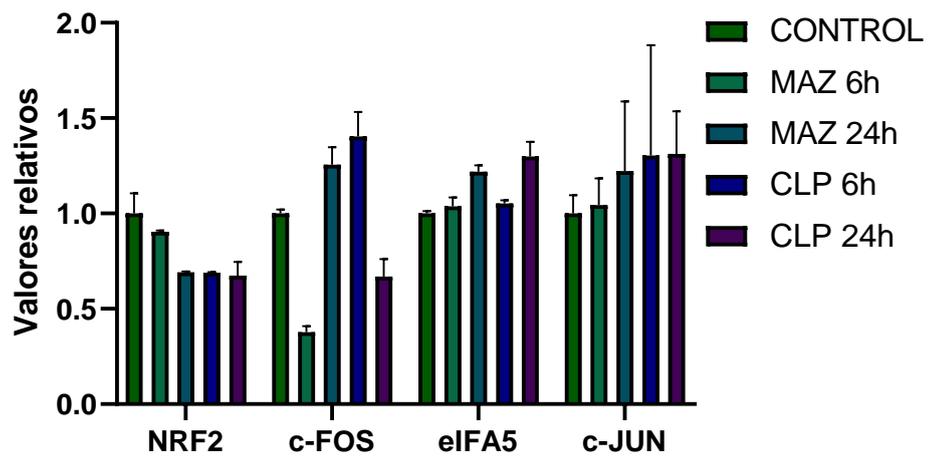


Figura 4.45: Niveles de expresión para NRF2, c-FOS y eIFA5. Se pueden observar los niveles expresados como valores relativos al control, evaluados en larvas control y larvas expuestas a MAZ y CLP, durante 6 y 24 h, mediante test de medianas y K-W.

5. DISCUSIÓN

5.1 Alteración del metabolismo de poliaminas en embriones de *R. arenarum* expuestos a plaguicidas OF

Las poliaminas ejercen un rol esencial durante el desarrollo embrionario y fetal (López-García et al. 2008; Fenelon and Murphy 2017). Estudios de Osborne et al. (1993) en el anfibio *Xenopus laevis* establecieron que una limitación inicial en la concentración de espermidina, con respecto a putrescina, es necesario para el desarrollo embrionario normal. La proporción Put:Spd:Spm en embriones de *R. arenarum* es aproximadamente 88:23:1 en el estadio de BC y de 28:26:1 cuando los embriones alcanzan el estadio de OC. A pesar de que los embriones en nuestro estudio están más avanzados en su desarrollo, podemos apreciar una proporción baja en la relación Spd/Put, siendo de 0,26 en el estadio de BC y su incremento a 0,93 en el estadio de OC, coincidiendo con los estudios de Osborne et al. (1993).

Los insecticidas MAZ y CLP pertenecen a la misma familia química de plaguicidas organofosforados y, por lo tanto, comparten el mecanismo de acción sobre el mismo blanco, AChE (Matsumura 1985). Sin embargo, impactan de forma diferente sobre el metabolismo de poliaminas. La exposición a MAZ no tuvo efectos sobre la actividad de APAO a lo largo del desarrollo embrionario, mientras que, frente a la exposición a CLP, fue la respuesta bioquímica más temprana observada en los embriones. Por otra parte, DAO aumentó de forma temprana en los embriones expuestos a MAZ, mientras que disminuyó en embriones de BA frente a la exposición a CLP. El efecto de MAZ y CLP en la actividad de SMOX fue evidente en embriones de BA, y el efecto fue completamente opuesto entre los plaguicidas. El perfil de actividad de las oxidasas control observadas en este trabajo es similar al desplegado por ODC1, la enzima limitante en la síntesis de poliaminas (Lascano et al. 2011b). Es interesante notar que SMOX despliega la actividad más elevada en general, entre las enzimas degradativas de poliaminas en *R. arenarum*, mientras que su sustrato se encuentra en las concentraciones más bajas, tal vez reflejando su especificidad para mantener a Spm en niveles bajos. A pesar de que la actividad de SMOX aumentó significativamente en embriones del estadio de OC expuestos a 0,5 mg L⁻¹ MAZ, las concentraciones de Spm se mantuvieron similares a los niveles de los controles. Estos resultados son similares a aquellos reportados por Ceci et al. (2017) en modelos de ratones transgénicos que sobre-expresaban SMOX, reflejando la buena amortiguación en

el contenido celular de Spm. Observamos un aumento significativo en las concentraciones de Put y Spm en embriones en estadio de BA, expuestos a 2 mg/L de MAZ, mientras que Spd mostró una tendencia a la disminución. Esto podría indicar un aumento general en la síntesis de poliaminas en dichos embriones, respaldado por una elevada actividad específica de ODC1 en embriones de BA cuando se comparan con los embriones en estadios de BC y OC (Lascano et al. 2011c).

5.1.1 Relación entre poliaminas y estrés oxidativo

La degradación oxidativa de las poliaminas a través de SMOX, APAO y DAO genera aldehídos reactivos y especies reactivas del oxígeno que podrían causar estrés oxidativo y daño macromolecular (Pegg 2013). Se sabe que el factor de transcripción NRF2 controla la expresión de los componentes claves en la defensa antioxidante y de las enzimas involucradas en la detoxificación de EROs, mediante su unión al elemento de respuesta antioxidante (ERA) encontrado en sus genes (Tonelli et al. 2018). Se reportó que el aldehído acroleína, producido como consecuencia de la oxidación de poliaminas y reactivo contra grupos sulfhidrilo, activa la vía NRF2-ERA y lleva a un aumento en la expresión de múltiples genes detoxificantes de la Fase 2 en la respuesta antioxidante (Kwak et al. 2003). También se ha reportado que el estrés oxidativo desencadena la transcripción de los genes ODC1 y SAT1, con acompañamiento del aumento de sus actividades (Smirnova et al. 2018). El aumento de la actividad de ODC1 podría colaborar en la respuesta antioxidante a través de un incremento de los niveles de poliaminas. En estudios previos, se ha observado que la actividad de ODC1 disminuye en embriones de estadios tempranos expuestos a CLP, en forma dependiente de la concentración (Sotomayor et al. 2012), mientras que la exposición a MAZ resulta en un aumento de la actividad de ODC1 a lo largo del desarrollo (Lascano et al. 2011b). Además, se pudo determinar que la exposición de embriones de *R. arenarum* a MAZ y CLP genera situaciones de estrés oxidativo (Lascano et al. 2009, 2011; Sotomayor et al. 2015; Liendo et al. 2015). Uniendo estos reportes y los resultados hallados en esta tesis dentro de un análisis de componentes principales, inferimos que los embriones expuestos a MAZ presentan una respuesta proliferativa en los estadios de BC, caracterizado por los elevados niveles de poliaminas y la actividad de DAO, junto con un aumento de la actividad

de GST. El aumento de la actividad de GST ha sido sugerido en estudios previos como una respuesta adaptativa y protectora frente a estrés oxidativo (Anguiano et al. 2001; Lascano et al. 2011b). Por otro lado, los embriones expuestos a CLP mostraron un aumento en las actividades de APAO y SMOX en el estadio de BC, unido a una situación de estrés oxidativo que fue evidenciado mediante el impacto sobre la actividad de CAT y su respuesta antioxidante y por los niveles elevados de GSH. Se conoce bien que el grupo hemo, presente en el sitio activo de CAT, es sensible al anión superóxido generado durante el estrés oxidativo, lo que lleva a la inhibición enzimática (Kono and Fridovich 1982). En el estadio de OC, los embriones expuestos a concentraciones subletales de MAZ mostraron un aumento en la actividad de SMOX, asociado con un bajo impacto del estrés oxidativo y los niveles normales de la actividad de las enzimas antioxidantes y AChE. Para los embriones expuestos a CLP a niveles subletales similares, el pronóstico es peor, ya que se observan niveles bajos de las enzimas antioxidantes y detoxificantes en asociación con el aumento de las actividades de APAO y DAO. Esto sugiere una situación de estrés oxidativo y una tendencia hacia niveles más altos de poliaminas, indicando una alteración del estado proliferativo.

5.1.2 DAO y APAO como biomarcadores de exposición a plaguicidas OF en *R. arenarum*

Las concentraciones de CLP y MAZ utilizados en esta tesis son concentraciones subletales, por lo que no se observó una mortalidad significativa debido a la exposición a plaguicidas. Las respuestas bioquímicas tempranas, que ocurren antes de cualquier indicación visible de toxicidad, pueden ser herramientas válidas en la determinación de riesgos ambientales para sustancias tóxicas. El incremento temprano de las actividades de DAO y APAO observadas en embriones de BC en este trabajo, sugiere que podrían ser útiles como biomarcadores frente a la exposición de MAZ y CLP, respectivamente. La utilidad de DAO y APAO como biomarcadores podría estar reforzada por el hecho de que los embriones de *R. arenarum* en estadios tempranos no mostraron inhibición significativa de la actividad de AChE (Lascano et al. 2011; Sotomayor et al. 2015). Esto podría atribuirse a un rol morfogénico donde la estructura de AChE es una propiedad crítica, pero no su actividad (Brimijoin and Koenigsberger 1999).

Se ha sugerido que DAO juega un papel protector frente a acumulaciones

patológicas de diaminas durante la proliferación de tejidos de vertebrados (Nikolaus Seiler, 2011) y que además tiene un rol directivo en el control homeostático de los niveles de aminas biogénicas intracelulares (Agostinelli et al. 2010). Además, se ha observado el efecto protector de DAO en convulsiones de embriones de *X. laevis* a través de la conversión de Put a ácido gamma-aminobutírico (Bell et al. 2011). Considerando estos efectos, podríamos suponer que el incremento de la actividad de DAO observada en estadios tempranos de los embriones de *R. arenarum* expuestos a MAZ podría servir como protección frente a los plaguicidas neurotóxicos, metabolizando rápidamente los niveles elevados de Put para mantener la proporción Spd/Put, necesaria para el desarrollo embrionario normal. Esta hipótesis está apoyada por el ACP y los resultados previos hallados en el grupo de trabajo, en los que tampoco se han observado diferencias significativas en el porcentaje de embriones malformados en el estadio de BC expuestos a MAZ, con respecto a los embriones controles (Ferrari et al. 2009; Lascano et al. 2011b). La exposición a CLP indujo un aumento temprano de la actividad de APAO, lo que está en concordancia con la necesidad de mantener una proporción baja de Spd/Put para permitir el desarrollo normal. APAO probablemente tenga un rol protector en la exposición a CLP, similar a aquel desarrollado por DAO en los embriones expuestos a MAZ.

5.2 *Rhinella arenarum* como organismo no-modelo

Cuando se trata de realizar estudios que involucren métodos de biología molecular y/o genética en organismos modelos, el trabajo de investigación se ve facilitado por contar con sus genomas secuenciados, parcial o completamente. Dentro del orden *Anura*, se encuentran parte de las secuencias genómicas de *Rhinella marina* (link de acceso GenBank: ONZH00000000.1), mientras que la secuencia del genoma completo se encuentra en los casos de *Nanorana parkieri*, *Xenopus tropicalis* y *Xenopus laevis* (Hellsten et al. 2010; Sun et al. 2015; Session et al. 2016). Sin embargo, al trabajar con organismos no-modelo, como es el caso de *Rhinella arenarum*, la información es escasa y se vuelve laborioso poder obtener resultados eficientes. Para estudiar la expresión de los diferentes genes abordados en esta tesis (sección 3.2.7), en primera instancia, se necesitaron cebadores adecuados que puedan ser utilizados en la amplificación. Al no contar con el genoma de *R. arenarum*, se diseñaron en primer lugar cebadores basados

en las secuencias de *X. laevis* y *X. tropicalis*. Sin embargo, todas las pruebas con dichos cebadores fueron fallidas, ya que no se obtuvieron productos de PCR (resultados no mostrados). Esta falla podría deberse a la amplia divergencia filogenética entre los géneros *Xenopus* y *Rhinella* (Session et al. 2016). El género *Xenopus* se encuentra dentro del clado *Pipidae*, denominadas “ranas sin lengua”, mientras que el género *Rhinella* se encuentra dentro del clado *Bufoidea*, denominados “sapos verdaderos” (<https://amphibiaweb.org>).

La revolución dentro de las tecnologías de secuenciación ha permitido avanzar en el estudio de diversos organismos tanto a nivel genómico como transcriptómico (Huang et al. 2016). Una de las aplicaciones más innovadoras de RNA-seq es poder obtener información acerca de secuencias funcionales y codificantes, para organismos que previamente contaban con limitada o escasa información genómica (Wang et al. 2009; Francis. et al. 2013; Huang et al. 2016). Una de las áreas que ha logrado emerger, gracias al avance de la bioinformática, es la disciplina denominada Ecotoxicogenómica (Gomase and Tagore 2008; North and Vulpe 2010). Esta disciplina combina los conocimientos en ecología, toxicología y genómica, para comprender los efectos celulares y moleculares de un compuesto químico (Ceschin 2017). Para avanzar en estudios de ecotoxicogenómica, se necesita contar con información precisa sobre la expresión génica bajo la influencia de un tóxico. La importancia de contar con secuencias precisas (ya sea del genoma o transcriptoma) pudo observarse durante el desarrollo de esta tesis. Gracias a la información obtenida mediante el proyecto de RNA-seq de *Rhinella arenarum* (Ceschin et al. 2019), se pudieron obtener las secuencias específicas y diseñar cebadores para los genes de: CAT, SAMDC, GST-pi, GSHR, ODC, APAO, DAO, SMOX, c-FOS, c-JUN, NRF2, SOD, SRM y JNK. De esta forma se pudieron amplificar 10 de los transcritos de interés a partir de los cebadores diseñados, y se corroboraron con fidelidad 6 de las secuencias amplificadas (B-ACT, APAO, DAO, c-FOS, c-JUN y ODC).

Por otra parte, no todos los productos obtenidos mediante PCR punto final pudieron ser secuenciados con éxito. Esto ocurrió con las secuencias de CAT, NRF2, SOD, SAMDC, GST-pi (en ambas instancias de secuenciación) y c-JUN (en la primera etapa de secuenciación). Estos resultados negativos podrían deberse, por un lado, a una necesidad de mayor depuración del transcriptoma ensamblado, que fue realizada después del diseño de los cebadores antes mencionados.

Debido a que la mayoría de las herramientas informáticas y estadísticas están diseñadas para trabajar con genomas de referencia, se vuelve mucho más laborioso obtener un transcriptoma ensamblado en organismos autóctonos (Collins et al. 2008; Todd et al. 2016; Da Fonseca et al. 2016). Esto se puso de manifiesto al intentar corroborar los primeros transcritos con las herramientas del BLAST. Del total de 115 transcritos obtenidos inicialmente, sólo se pudieron obtener coincidencias en 32. El claro ejemplo de esto es la secuencia de c-JUN. En la primera etapa de secuenciación se obtuvo una secuencia que no coincidía con aquella utilizada para el diseño de los cebadores. Además, tampoco alineaba con c-JUN en blastp, blastn y blastx. Luego de realizar un segundo control de calidad del transcriptoma, se diseñaron nuevos cebadores para c-JUN basados en otro transcripto, obteniendo así una secuencia que corresponde tanto al transcripto utilizado inicialmente como a c-JUN de diversas especies, según blastp, blastn y blastx.

Estas fallas en la anotación de secuencias pueden deberse a errores en el ensamblado del transcriptoma mediante el uso del Software utilizado (Trinity), o debido al hecho de que son genes con muy baja expresión, como pudimos comprobar. Huang et al. (2016) realizaron una comparación de 4 métodos diferentes de ensamblado: ensamblaje *de novo* con Trinity; re-ensamblaje utilizando como referencia datos proteómicos y genómicos; utilización de TransPS con información proteómica; y ensamblado mediante Cufflinks. Estos autores encontraron que Trinity posee más “contigs” redundantes, debiéndose a que los datos obtenidos de ARNm provenían de un pool de varios individuos. Además, se observó que el ensamblado mediante Trinity es más errático en aquellos genes con niveles de expresión muy bajos (McGettigan 2013). Tal es el caso de la mayoría de los genes seleccionados para el desarrollo de esta tesis. También se ha visto que los “contigs” muy redundantes podrían ser el resultado de re-arreglos, variantes alélicas, isoformas, parálogos recientemente duplicados o la formación de “contigs” quiméricos (Singhal 2013; Vijay et al. 2013).

5.2.1 Estudios de biología molecular en *R. arenarum* como organismo no-modelo

5.2.1.1 RT-qPCR con genes de baja expresión

Para explorar el rol de numerosos ligandos, receptores y vías de señalización que convergen en la regulación transcripcional, y para comprender el detalle de los mecanismos de eventos complejos a nivel tisular o celular, es necesario profundizar en estudios de genómica funcional. Para ello se deben utilizar técnicas que permitan el análisis a nivel transcriptómico, a fin de describir cambios de la expresión génica entre tejidos o tratamientos (Bustin and Nolan 2004). Una de las técnicas más utilizadas para lograr este objetivo, es la transcripción reversa (RT) seguida de la cuantificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). Si bien la RT-qPCR ha sido durante muchos años la técnica más sensible para la detección de blancos en el ARNm, ha introducido ciertos problemas que deben ser apreciados a la hora de utilizarla como técnica rutinaria en la cuantificación de la expresión génica (Bustin et al. 2009). En esta tesis se realizaron varios intentos por estandarizar los cebadores de c-FOS, ODC, SMOX, SRM y DAO, diseñados específicamente para ver sus niveles de expresión por RT-qPCR. Sin embargo, no se obtuvieron resultados positivos al respecto. Esto se debió a que todos los cebadores comenzaban su amplificación en los Ct >27. Teniendo en cuenta estos valores de Ct, se tomó la decisión de no continuar con la cuantificación de estos transcritos, al considerarse que los mismos poseen niveles de transcripción muy bajos en las muestras de larvas de *R. arenarum*. Este criterio también fue utilizado por Radonić et al. (2004), donde estudiaron la eficiencia de cebadores para 13 genes, con el fin de ser utilizados como genes de referencia. En dicho estudio hallaron que 7 de los transcritos estudiados, entre ellos actina y GAPDH (gliceraldehído-3P-deshidrogenasa), presentaron valores de Ct >30.

Por otra parte, se pudieron corroborar los bajos niveles de expresión a partir de los datos de la secuenciación masiva del transcriptoma de *R. arenarum*. Dichos valores se encuentran en el rango de 0 a 160 TMM (Tabla 4.5). Otro criterio para descartar en esta instancia la posibilidad de cuantificar por esta metodología los ARNm de ODC, DAO, SMOX, c-FOS y APAO, fueron los niveles de TMM de B-ACT. La amplificación de B-ACT se obtuvo con valores de Ct normales para qPCR (Ct entre 19-26) y presentó valores de TMM en el rango de 300-400, por lo cual fue un indicativo de cuáles serían los genes potenciales a estudiarse por RT-

qPCR. Si bien se realizaron diversas pruebas con aditivos para mejorar las amplificaciones por qPCR (Simonović et al. 2012), no se obtuvieron resultados favorables en ninguno de los casos. Al contrario, se obtuvieron curvas de disociación o *melting* con productos inespecíficos y curvas de estandarización con poca eficiencia (Figuras 4.33-4.34).

Los datos obtenidos para *R. arenarum* fueron comparados con las especies más cercanas filogenéticamente y cuyos genomas están secuenciados, *X. laevis* y *X. tropicalis*. De esta forma, se ha encontrado en la base de datos de *Xenopus* (*XenBase*) que los valores de expresión a nivel transcriptómico se asemejan a los valores de los genes con bajo nivel de transcripción, hallados en esta tesis. Tal es el caso de DAO, SMOX, c-FOS y APAO, como se puede visualizar en la Tabla 5.1 (Bowes et al. 2009).

Tabla 5.1: Valores de TPM (Transcriptos por millón) en *Xenopus laevis* y *Rhinella arenarum*. Comparación entre los valores de algunos transcritos, entre ambas especies (Bowea et al, 2009).

GEN	TPM	TPM
	<i>X. laevis</i>	<i>R. arenarum</i>
APAO	4,55	0
GST-pi	12,77	0,51
DAO	1,24	1,1
SMOX	108,25	0
NRF2	5,74	144,69
c-JUN	5,88	10,18
c-FOS	12,98	0
SAMDC	91,64	8,035
ODC1	1521	0

Sin embargo, hay que considerar que los transcriptomas del género *Xenopus* fueron medidos únicamente hasta el estadio 40. En comparación con los estadios del desarrollo de *R. arenarum*, el estadio 40 sería, relativamente, el más cercano al estadio n°25, utilizado para el transcriptoma. Por lo cual, si bien hay que considerar los sistemas diferentes utilizados para obtener los transcriptomas de *Xenopus laevis* y *Rhinella arenarum* y las diferencias en los estadios, se podría decir que hay una similitud en la expresión de DAO, c-FOS, SMOX y APAO, teniendo un nivel de transcripción bajo en las dos especies. Por estas razones, no

serían buenos candidatos para su análisis mediante RT-qPCR, sin la utilización de un kit comercial específico para transcriptos con bajos niveles de expresión.

La capacidad de detectar y medir cantidades mínimas de ácidos nucleicos, hace de la qPCR una de las técnicas más confiables para la cuantificación a nivel molecular. A nivel conceptual es una técnica sencilla, rápida, sensible y específica, en ensayos homogéneos (Bustin et al. 2009). Sin embargo, pueden existir fallas técnicas que afecten la calidad del ensayo. Algunas de esas fallas pueden deberse al inadecuado mantenimiento de las muestras, inadecuada preparación y purificación del ADN/ARN, llevando a resultados muy variables; mala elección de los cebadores utilizados para la retrotranscripción y PCR, llevando a ensayos menos robustos e ineficientes; y el inapropiado análisis estadístico, llevando a la interpretación errónea de los resultados (Bustin and Nolan 2004; Bustin et al. 2009). A pesar del amplio uso de la técnica en el estudio de diversos tipos de organismos, tejidos y condiciones, no existen muchas publicaciones actualizadas sobre las variables que podrían afectar a la utilización de la qPCR. Sin embargo, existen algunos estudios que resaltan la necesidad de cumplir con ciertas condiciones a fines de obtener resultados confiables (Bustin and Nolan 2004; Ståhlberg et al. 2004; Nolan et al. 2006; Huggett et al. 2008; Bustin et al. 2009a; Remans et al. 2014). Una de estas condiciones es la cantidad y calidad del ARN purificado y utilizado para obtener el ADNc. En cuanto a la cantidad, se aconseja que la relación entre la absorbancia a 260 nm y la absorbancia a 280 nm sea mayor o igual a 1,7. En cuanto a la calidad, se espera que en un gel de agarosa al 1% se observen las bandas del ARNr 28S y 18S. Sin embargo, el hecho de que el ARN posea algún nivel de degradación es factor suficiente para generar variabilidad dentro del ensayo, especialmente en aquellos blancos con bajos niveles de transcripción (Bustin et al. 2009). En el caso de las muestras utilizadas en esta tesis para evaluar los niveles de expresión de SOD, SAMDC, y los genes de referencia B-ACT y RL8 mediante qPCR, se obtuvieron grandes diferencias entre las 2 réplicas biológicas utilizadas. Un factor indicativo de dicha variabilidad es la calidad del ARN purificado. Si bien el protocolo de purificación utilizado fue el mismo para ambas réplicas, la calidad del ARN no fue la misma. Asimismo, el origen de dichas muestras podría contribuir a la variabilidad obtenida entre réplicas. En comparación, las muestras obtenidas para la primera réplica mediante ovulación inducida en el laboratorio fueron más homogéneas y de mayor calidad

en cuanto a los ARN purificados, mientras que en las muestras obtenidas de la segunda réplica obtenida por colecta en forma natural existió un cierto nivel de degradación en los ARN purificados (como se puede observar en la figura 4.16). Por los diferentes inconvenientes que se presentaron durante el desarrollo de la técnica, las muestras provenientes de embriones en los estadios de BC, BA y OC no pudieron ser utilizados para analizar la expresión de los genes de interés mediante qPCR.

Por ello, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta tesis y en vista de los diversos factores que pueden afectar a la repetibilidad de los resultados con qPCR, es un objetivo a futuro poder estandarizar las extracciones de ARN en diferentes tipos de muestra y estadios de *R. arenarum*.

5.2.1.2 Eligiendo genes de referencia para qPCR

Uno de los problemas en el análisis de la transcripción génica es poder determinar de forma precisa la amplificación del ácido nucleico presente en la reacción. Un enfoque comúnmente utilizado en la amplificación del ARNm es el uso de los denominados genes de referencia o “*housekeeping genes*”. Un gen de referencia debe ser, idealmente, aquel que no se encuentre regulado por la influencia del experimento, o sea, que se exprese de manera constitutiva. Además, su expresión debe ser estable, es decir, que debe mantenerse con muy poca variación entre las diferentes muestras, y su abundancia debe tener una correlación directa con la cantidad de ARNm de la muestra (Radonić et al. 2004; Bas et al. 2004; Verbrugghe et al. 2019). Además, los genes de referencia deberían expresarse en niveles semejantes a aquellos seleccionados como blanco (Bustin et al. 2009; Bustin 2017).

Por más que sean utilizados a menudo, la estabilidad de los genes de referencia no debe ser algo tomado a la ligera, ya que pueden presentarse dos problemas. Por un lado, la mayoría de estos genes tienen un nivel elevado de expresión, resultando en una discrepancia entre la abundancia del transcripto del gen blanco con respecto al gen de referencia. Por otra parte, su expresión puede variar dependiendo de la condición a la cual están siendo sometidos (Hruz et al. 2011). Si bien se han hecho publicaciones con un solo gen de referencia, en la actualidad se recomienda que los ensayos se normalicen con 3-5 genes de referencia (Huggett et al. 2005).

A través de los años, se han investigado muchos genes de referencia en diversos tejidos y condiciones. Por lo general, los más utilizados han sido G3P, B-ACT, 18S, 28S, HPRT (hipoxantina-guanina fosforiltransferasa), PPIA (peptidil prolil isomerasa A), G6PDH (glucosa 6-fosfato deshidrogenasa), TBP (proteína de unión a la caja TATA), B2M (beta microglobulina), α -Tub (Tubulina alfa), PBGD (porfobilinógeno deaminasa) y L13 (proteína ribosómica L13) (Radonić et al. 2004).

Sin embargo, se han encontrado variaciones en cuanto a la expresión de los genes de referencia antes nombrados, dependiendo del estudio realizado. En ensayos realizados en linfocitos humanos se observó que la expresión de B-ACT varía significativamente entre los estadios de activación, llevando a resultados inconsistentes dentro del estudio (Bas et al. 2004). También se ha visto que la expresión de B-ACT está influenciada en pacientes con trasplante renal, en células de corazón en ovejas, en tejidos tumorales de ovarios y en tejido bronquial de individuos asmáticos, invalidando el uso de este gen como gen de referencia para qPCR (Glare 2002; Gibbs et al. 2003; Yperman et al. 2004; Fu et al. 2010).

En un estudio exhaustivo realizado con *Xenopus laevis*, se analizaron 6 genes de referencia normalmente utilizados en esta especie (ODC1, histona H4, G3P, EEF1A, N-tubulina y L8) (Šindelka et al. 2006). En dicho estudio, además, realizaron las mediciones de cada gen en diferentes estadios del desarrollo embrionario. De esta forma pudieron determinar que ODC1 parece ser el gen más estable en los estadios iniciales (desde el estadio 1 al 10.5) y finales (desde el estadio 18 al 41, según Niewkoop y Faber 1994); L8 y GAPDH serían estables para ser utilizados en los estadios 1 al 19 y H4 mostraría las menores fluctuaciones a lo largo de todo el desarrollo embrionario. En otro estudio en *Xenopus laevis*, se realizó un screening de 6 genes de referencia (eEF1A1, RPL8, SUB1 L, CLTA, H4 y ODC1). Los investigadores pudieron identificar que eEF1A1 y SUB1 L eran los genes cuya expresión se mantenía más estable, lo que permitiría su utilización como genes de referencia (Verbrugge et al. 2019). Sin embargo, en un estudio similar realizado en *X. tropicalis*, han demostrado que ODC1, L8 y H4 no podrían ser considerados como buenos genes de referencia, debido a su variabilidad en los estadios embrionarios utilizados en el trabajo (Dhorne-Pollet et al. 2013).

Debido a las discrepancias encontradas a lo largo de los años con respecto a

los genes que inicialmente se consideraban *housekeeping*, actualmente se sugiere realizar un estudio exhaustivo de cuáles serían los genes de referencia más útiles de acuerdo al tipo de estudio, tejido, organismo y condiciones experimentales (Hruz et al. 2011; Bustin et al. 2013; Kozera and Rapacz 2013; Remans et al. 2014; Verbrugge et al. 2019). Esto puede resultar relativamente sencillo en aquellos modelos de estudio que posean genomas secuenciados y, por lo tanto, una información más completa. Sin embargo, en el caso de un organismo no modelo como *R. arenarum*, la búsqueda de genes de referencia para ser utilizados en qPCR puede ser compleja y de suma dificultad.

Inicialmente, en este trabajo de tesis se seleccionaron genes de referencia utilizados comúnmente, como es el caso de B-ACT, mientras que ODC y L8 fueron seleccionados posteriormente de acuerdo a los datos aportados por Šindelka et al. (2006). En el caso de B-ACT se observó una tendencia hacia el aumento de sus niveles de expresión en las larvas expuestas a 0,5 mg L⁻¹ de MAZ durante 6 h, mientras que, en las larvas expuestas por 24 h a la misma concentración, se observó una caída abrupta de su expresión. Esto sugiere que la expresión de B-ACT podría estar siendo influenciada por la exposición a MAZ y, por lo tanto, no podría ser considerado como gen de referencia en estos ensayos. Como se ha mencionado anteriormente, ODC no pudo ser amplificada con éxito debido a su bajo nivel de transcripción en *R. arenarum*. En el caso de L8, fue posible obtener una amplificación con valores de Ct normales (18-26) y que, además, mostró una variación de expresión mínima entre las muestras tratadas y las muestras control. Por lo tanto, sería un candidato potencial a ser designado como gen de referencia en estos ensayos.

Al obtener los datos del transcriptoma de *R. arenarum*, fue posible analizar los niveles de expresión de los potenciales genes de referencia, siempre en comparación a aquellos utilizados en *X. laevis*. De este análisis se puede concluir que los transcritos que menos variación presentan dentro de las muestras estudiadas son los transcritos de Tubulina: TBA1, TBB1, TBB2, TBB4B; el transcritos de ACTB; G3P; L8; y los transcritos del Factor de Elongación-1: EF1A0 y EF1D. El transcritos de Actina (ACT3) y los transcritos de Tubulina alfa 1.1, 2, 3 y 4, varían significativamente entre las muestras expuestas a MAZ y CLP con respecto a las muestras control.

Considerando los resultados obtenidos, queda evidenciado que los datos de

TMM permiten realizar un análisis a modo de *screening*, como paso previo al desarrollo de estudios a través de qPCR. Además, podemos decir que la información genómica o transcriptómica es una herramienta esencial al momento de desarrollar ensayos de biología molecular en organismos no-modelo. Confirmamos así, que los datos de RNA-Seq tienen el potencial de identificar aquellos genes con menor variación en su expresión, aunque no sea un método universalmente aceptado para seleccionar genes de referencia (Stanton et al. 2017, Zhuang et al, 2015, Yang et al, 2014).

5.3 Minería de datos para comparar niveles de expresión a nivel transcriptómico en *R. arenarum*

5.3.1 Niveles de las enzimas blanco de OF y enzimas antioxidantes

Si bien no existen muchos estudios a nivel transcriptómico sobre los niveles de las enzimas antioxidantes y las enzimas blanco de plaguicidas organofosforados, existen reportes sobre la actividad enzimática de estas en larvas expuestas a MAZ y CLP. Por un lado, Rosenbaum et al (2012) han observado que, en larvas expuestas durante un pulso de 4 h a 2 mg L^{-1} de MAZ, hay una inducción en la actividad de GST y una inhibición en la actividad de CbE. También se ha visto una disminución significativa de la actividad de CbE en larvas expuestas a 1 y 2 mg L^{-1} de CLP durante 96 h, mientras que la actividad de CAT se vio inhibida significativamente (Liendro et al, 2015). Sin embargo, en larvas de *R. arenarum* expuestas a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ MAZ y $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ CLP no se encontraron diferencias significativas en las actividades de CAT y GST (Ceschin 2017). Estos últimos coinciden con los resultados hallados en esta tesis, donde no se han encontrado diferencias significativas en los niveles de expresión de las enzimas mencionadas en ninguna de las concentraciones utilizadas para MAZ y CLP.

En cuanto al nivel de transcripción del gen que codifica la enzima blanco de acción de los plaguicidas OF, AChE, se observó un aumento en su expresión en muestras expuestas a MAZ y CLP durante 6h. Estos datos podrían corresponderse con estudios realizados anteriormente, en los que se pudo observar que, en animales expuestos a una situación de estrés, aumenta la actividad de AChE en ciertas regiones del cerebro (Kaufer et al. 1998). En larvas de *R. arenarum*, estudiadas en ensayos a campo y en ensayos de laboratorio, se vio una inducción sobre la actividad de AChE, generada por la exposición a

organofosforados. Esto sugiere que los plaguicidas organofosforados inducen la síntesis de la enzima y su sobreexpresión (Rosenbaum et al. 2012, Liendro et al, 2015).

Por otra parte, la sobreexpresión de AChE puede deberse al aumento de la expresión de c-FOS, tal como se ha comprobado en esta tesis. El factor de transcripción c-FOS posee sitios de unión en los promotores de genes colinérgicos claves, como los genes que codifican para AChE y la enzima colina acetiltransferasa (ChAT). Por lo tanto, un aumento de los niveles de c-FOS podría activar vías regulatorias que generen cambios en la expresión de las proteínas que median la neurotransmisión colinérgica en el cerebro (Kaufer et al. 1998).

5.3.2 Niveles de enzimas del metabolismo de poliaminas

En estudios sobre los efectos de la sobreexpresión del ARNm de SAMDC mediante inyección en embriones de *Xenopus*, se ha podido observar que hay una disociación celular desde el estadio de blástula hasta el estadio de gástrula, con interrupción del desarrollo embrionario normal (Shibata et al. 1998). En otro caso, donde realizaron la inyección del ARNm de SAMDC en estadios de 1-2 y 8 células, encontraron que la respuesta fue diferente, dependiendo del estadio. Los embriones inyectados en el estadio de 1-2 células sufrieron disociación celular y arresto del desarrollo normal en el estadio de gástrula, mientras que aquellos inyectados en el estadio de 8 células no alteraron su desarrollo, convirtiéndose en ranas normales a simple vista. Sin embargo, se observó que las células descendientes de aquellas inyectadas sufrían apoptosis (Kai et al. 2003). No obstante, la sobreexpresión de SAMDC no generó un aumento de la concentración de espermidina. Estos hallazgos sugieren que el programa materno de apoptosis heredado en *Xenopus* se activa por la sobreexpresión de SAMDC y podría servir para eliminar los daños celulares siendo así un mecanismo de defensa en la embriogénesis, sin alterar el desarrollo embrionario en su totalidad. En este trabajo de tesis se pudo observar que la expresión de SAMDC se ve aumentada en las larvas expuestas a MAZ y CLP, tanto a 6 h como a 24 h. Estos datos podrían corresponderse con aquellos hallados en *Xenopus*, ya que el aumento de su transcripción podría deberse a la necesidad de activar el mecanismo de apoptosis para eliminar los daños celulares causados, ya sea por la exposición a plaguicidas o por otros mecanismos. Por otro lado, el aumento de la transcripción de SAMDC

también podría deberse a la necesidad de sintetizar una mayor cantidad de espermidina. Espermidina actúa como donante del grupo aminobutil para las modificaciones post-traduccionales del residuo de lisina, en el factor de transcripción eIF5A. Esta modificación resulta esencial para la actividad del factor de transcripción, cuya función es contribuir a la transcripción, el transporte núcleo-citoplasma, la renovación de ARNm y la apoptosis (Nishimura et al. 2009). Los resultados hallados con respecto a la expresión incrementada de SAMDC, frente a la necesidad de sintetizar espermidina, se ve reforzada por los niveles de transcripción del factor eIF5A observados al analizar los datos obtenidos del transcriptoma, que muestran una tendencia al aumento en las larvas expuestas a MAZ y CLP durante 24 h, con respecto a las muestras control.

Smirnova et al. (2012) han analizado el estrés oxidativo como el causante de las alteraciones en el metabolismo de poliaminas, debido a la desregulación de ODC y SSAT. Las células de hepatoma humano fueron químicamente inducidas para aumentar la producción de EROs y los niveles de las tres poliaminas. En estas células hay una sobreexpresión de ODC y SSAT, reguladas transcripcionalmente. Esta regulación está dada por NRF2, debido a que tanto ODC como SSAT poseen una secuencia de reconocimiento para varios factores de transcripción, incluido NRF2 (Ceci et al. 2017). Los hallazgos al respecto en esta tesis indican que los niveles transcripcionales de ODC están aumentados en las muestras expuestas a MAZ a las 24 h y a CLP a 6 y 24 h. Esto podría deberse a la inducción de estrés oxidativo, causado por la exposición a los plaguicidas organofosforados (Ferrari et al. 2009; Lascano et al. 2009, 2011; Liendro et al. 2015). Sin embargo, los niveles transcripcionales de SSAT y NRF2 se ven disminuidos en las muestras expuestas a MAZ y CLP, tanto a 6 como a 24 h, siendo una discrepancia con los resultados hallados por Smirnova et al. (2012). No obstante, pareciera que NRF2 se encontraría en cantidades elevadas dentro del núcleo únicamente en aquellas células que sean capaces de expresar grandes cantidades de SSAT (Hyvönen et al. 2006), lo cual explicaría los bajos niveles de transcripción encontrados en las larvas utilizadas en la tesis, tanto en NRF2 como en SSAT.

La disminución de SSAT podría estar relacionada al aumento en la expresión de SMOX hallado en esta tesis. SMOX es la enzima encargada de oxidar espermina a espermidina. Estos hallazgos coinciden con aquellos realizados en

células humanas de hepatocarcinoma expuestas a etanol y acetaldehído, en las que se vio el aumento de la expresión de SMOX y la disminución de SSAT, sugiriendo que su regulación ocurre a nivel post-transcripcional (Uemura et al. 2013). Al verse aumentada la expresión de SMOX se podría deducir, además, que la cantidad de espermina disponible para ser acetilada por SSAT se encuentra disminuida. Por otra parte, esto también coincidiría con los niveles elevados de SAMDC, enzima necesaria para generar espermidina y espermina. Estos hallazgos sugieren que, debido a las funciones fisiológicas de espermidina, sería necesario un aumento de su concentración bajo estas condiciones en el estadio de larvas. Por ello, las enzimas encargadas de generarla, ya sea por síntesis o por degradación de otros sustratos, ven aumentados sus niveles de expresión.

Los niveles de expresión disminuidos en DAO en todas las muestras expuestas a MAZ y CLP sugieren que la cantidad de putrescina disponible para ser degradada también se encuentra disminuida. Esto podría deberse a la necesidad de generar espermidina como protección frente a la exposición a plaguicidas. La disminución de putrescina y espermina se observó claramente en embriones del estadio de OC expuestos a MAZ. El estadio de OC es el mismo utilizado en el proyecto de RNA-Seq, solo que en este último se utilizaron larvas a 10 días de alcanzado el OC. Por lo tanto, podríamos decir que hay una correspondencia entre los niveles de expresión encontrados a nivel transcriptómico y los niveles hallados con respecto al contenido de poliaminas. Por otra parte, espermidina no mostró variación a lo largo del desarrollo embrionario, siendo este un hallazgo similar al de Kai et al. (2003) con la sobreexpresión de SAMDC. Estos hallazgos están relacionados con la fina regulación que posee el metabolismo de poliaminas, tanto a nivel transcripcional como a nivel enzimático.

Por lo tanto, hemos podido observar, mediante minería de datos a nivel transcriptómico, que la exposición a MAZ y CLP genera alteraciones en el metabolismo de poliaminas, en ciertos factores de transcripción y en enzimas blanco, como AChE. Los resultados obtenidos permiten afirmar que RNA-Seq es una herramienta valiosa que permite seleccionar aquellas vías metabólicas que estén siendo afectadas en un organismo no-modelo, como *Rhinella arenarum*, para llevar adelante estudios de toxicología molecular.

En la figura 5.1 se esquematiza un resumen de los resultados hallados en esta tesis, donde se visualizan los cambios en la expresión a nivel transcriptómico y los cambios a nivel enzimático. Los cambios a nivel transcriptómico se vieron en larvas expuestas a MAZ y CLP durante 6 y 24 h. Mientras que los cambios observados a nivel enzimático fueron estudiados en embriones expuestos crónicamente. A nivel transcriptómico se puede ver que la exposición a OF induce la expresión de ODC, SMOX, SAMDC y eEIF5A, mientras que en SSAT y DAO generan la disminución de su expresión. La inducción de ODC, SMOX y SAMDC podría deberse a la necesidad de sintetizar espermidina, la cual induce la expresión del factor de transcripción eEIF5A. Por otra parte, la vía de degradación de las poliaminas genera EROs, al igual que la exposición por OF. Estas especies reactivas de oxígeno inducen, a su vez, la expresión de c-FOS, el cual también produciría un aumento de la expresión de AChE.

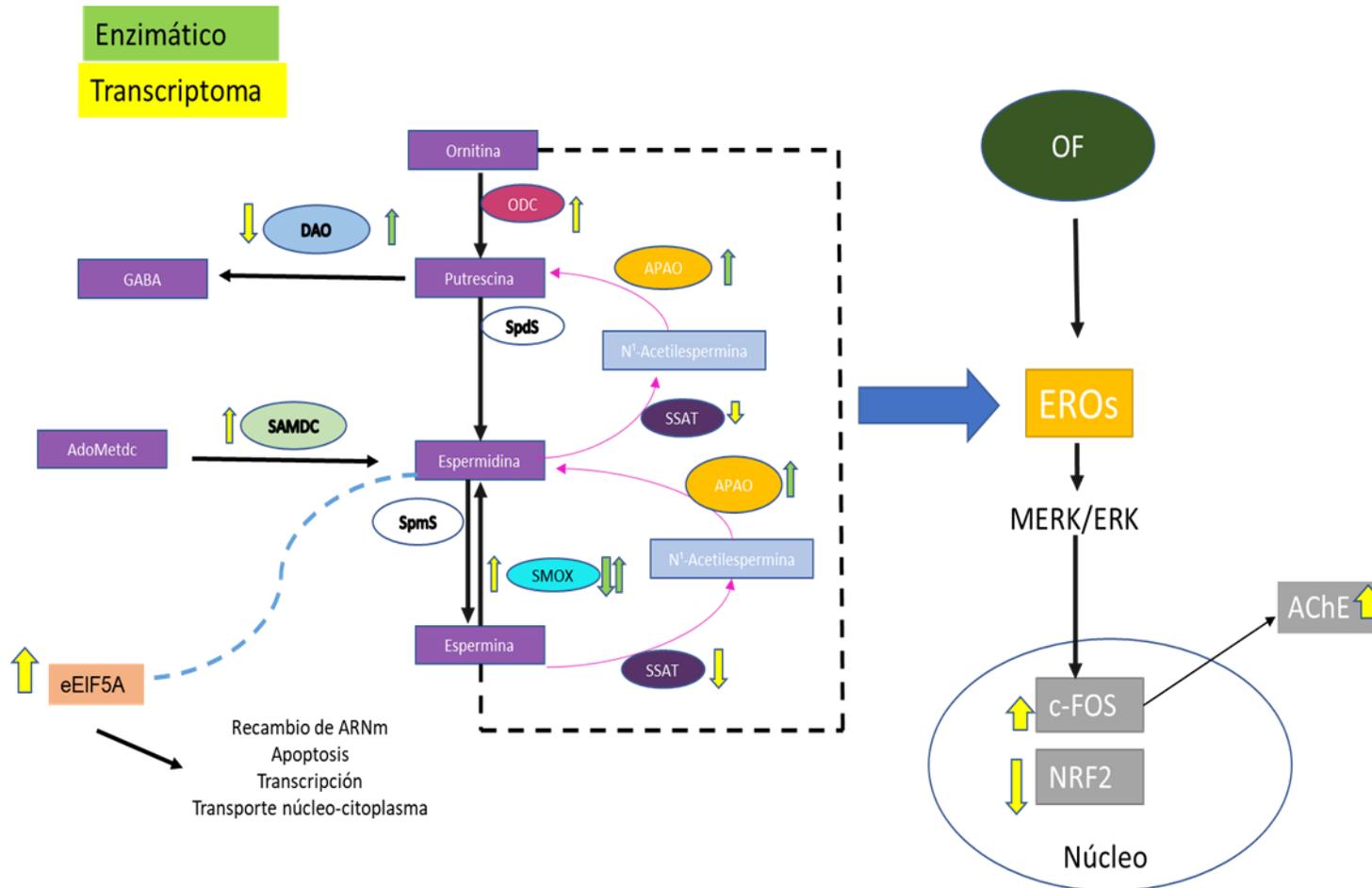


Figura 5.1: Efectos de MAZ y CLP a nivel bioquímico y molecular, sobre el metabolismo de poliaminas, factores de transcripción y la enzima blanco, AChE.

6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos y su análisis, podemos llegar a las siguientes conclusiones:

✓ La exposición a plaguicidas organofosforados genera alteraciones en el metabolismo de las poliaminas, en embriones y larvas de *R. arenarum*, tanto a nivel de la actividad enzimática como a nivel de la expresión de transcriptos.

✓ Estas alteraciones en el metabolismo de poliaminas por exposición a plaguicidas organofosforados generan por un lado un incremento en los niveles de las poliaminas que altera el estado proliferativo, y por otro un aumento en su degradación que genera estrés oxidativo.

✓ Ambos plaguicidas generan efectos diferenciales pese a tener el mismo mecanismo de acción como familia: DAO sería un biomarcador útil frente a la exposición a MAZ, mientras que APAO lo sería frente a la exposición a CLP, debido a sus respuestas tempranas en embriones de *R. arenarum*.

✓ La exposición de 24 h a concentraciones subletales de MAZ y CLP provoca cambios a nivel transcripcional en los factores de transcripción c-Fos y Nrf-2, que regulan a su vez la transcripción de ciertos genes asociados al metabolismo de las poliaminas y el blanco de acción tóxica AChE.

✓ Se pudieron determinar los potenciales genes de referencia para futuros estudios en el análisis de la expresión en *R. arenarum*: TBA1, TBB1, TBB2, TBB4B, ACTB, G3P, RL8 (L8), EF1A0 y EF1D.

✓ La información obtenida por RNA-Seq resulta ser una herramienta extremadamente útil a la hora de realizar un *screening* sobre los niveles de expresión y así definir genes de interés y genes de referencia.

✓ A partir de los resultados obtenidos mediante secuenciación masiva del ARNm de *R. arenarum* se pueden realizar estudios más profundos para confirmar mediante qPCR los niveles de expresión vistos en esta tesis.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agostinelli E, Arancia G, Dalla Vedova L, et al (2004). The biological functions of polyamine oxidation products by amine oxidases: Perspectives of clinical applications. *Amino Acids* 27:347–358
- Agostinelli E, Marques MPM, Calheiros R, et al (2010). Polyamines: Fundamental characters in chemistry and biology. In: *Amino Acids*. pp 393–403
- Amé MV, Baroni MV, Galanti LN, et al (2009). Effects of microcystin-LR on the expression of P-glycoprotein in *Jenynsia multidentata*. *Chemosphere* 74:1179–1186. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.068>
- Anguiano OL, Caballero de Castro A, Pechen de D'Angelo AM (2001). The role of glutathion conjugation in the regulation of early toad embryos' tolerance to pesticides. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 128:35–43
- Anguiano OL, Pechen de D'Angelo AM (2007). La problemática de los agroquímicos y sus envases, su incidencia en la salud de los trabajadores, la población expuesta y el ambiente estudio colaborativo multicéntrico
- Arias-Estévez M, López-Periago E, Martínez-Carballo E, et al (2008). The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agric. Ecosyst. Environ.*
- Armengaud J, Trapp J, Pible O, et al (2014). Non-model organisms, a species endangered by proteogenomics. *J Proteomics* 105:5–18. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.01.007>
- Akaike H (1973). A new look at the statistical model identification, *IEEE Trans. Aut. Contr* 19: 716-723.
- Babini MS, de Lourdes Bionda C, Salinas ZA, et al (2018). Reproductive endpoints of *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae): Populations that persist in agroecosystems and their use for the environmental health assessment. *Ecotoxicol Environ Saf* 154:294–301. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.050>

- Bachrach U, Wang YC, Tabib A (2001). Polyamines: New cues in cellular signal transduction. *News Physiol Sci* 16:106–109. <https://doi.org/10.1152/physiologyonline.2001.16.3.106>
- Bas a, Forsberg G, Hammarstrom S, Hammarstrom M-L (2004). Utility of the Housekeeping Genes 18S rRNA, beta-Actin and Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase for Normalization in Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Analysis of Gene Expression in Human T Lymphocytes. *Scand J Immunol* 59:566–573. <https://doi.org/10.1111/j.0300-9475.2004.01440.x>
- Becker CG, Fonseca CR, Haddad CFB, Prado PI (2010). Habitat Split as a Cause of Local Population Declines of Amphibians with Aquatic Larvae. *Conserv Biol* 24:287–294. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2009.01324.x>
- Bell MR, Belarde JA, Johnson HF, Aizenman CD (2011). A neuroprotective role for polyamines in a *Xenopus* tadpole model of epilepsy. *Nat Neurosci* 14:505–512. <https://doi.org/10.1038/nn.2777>
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, et al (2012) Oxidative Stress and Antioxidant Defense
- Bowes JB, Snyder KA, Segerdell E, et al (2009). Xenbase: Gene expression and improved integration. *Nucleic Acids Res* 38:607–612. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp953>
- Brimijoin S, Koenigsberger C (1999). Cholinesterases in neural development: new findings and toxicologic implications. *Environ Health Perspect* 107:59–64. <https://doi.org/10.1289/ehp.99107s159>
- Bustin SA (2017). Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse- Transcription Polymerase Chain Reaction
- Bustin SA, Benes V, Garson J, et al (2013) The need for transparency and good practices in the qPCR literature. *Nat. Methods* 10:1063–1067

- Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55:611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Bustin SA, Nolan T (2004). Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. *J Biomol Tech* 15:
- Ceci R, Duranti G, Leonetti A, et al (2017). Adaptive responses of heart and skeletal muscle to spermine oxidase overexpression: Evaluation of a new transgenic mouse model. *Free Radic Biol Med* 103:216–225. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.040>
- Ceschin DG (2017). Toxicogenomics: New strategies for ecotoxicology studies in autochthonous species II. the “Omic” era in non-model species. Transcriptome analysis for biomarker screening. In: *International Journal of Environment and Health* 8 (3): 213
- Ceschin DG, Pires NS, Mardirosian M, Venturino A, Lascano C. (2020). The *Rhinella arenarum* transcriptome: *de novo* assembly, annotation and gene prediction. *Scientific Reports* 10: 1053.
- Cichón L, Garrido S (2012). Implicancia de los cambios en el manejo sanitario de frutales de pepita en el Alto Valle. *Rev INTA*
- Cichón L, Garrido S, Lago J (2015). Balance fitosanitario. 14–35
- Cochón AC, González N, San Martín De Viale LC (2002). Effects of the porphyrinogenic compounds hexachlorobenzene and 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine on polyamine metabolism. *Toxicology* 176:209–219. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00145-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00145-2)
- Collins LJ, Biggs PJ, Voelckel C, Joly S (2008). An Approach to Transcriptome analysis of Non-Model organisms using short-read sequences. In: *Genome Informatics 2008*. IMPERIAL COLLEGE PRESS, pp 3–14
- Crawford AJ, Lips KR, Bermingham E (2010). Epidemic disease decimates amphibian abundance, species diversity, and evolutionary history in the highlands of central Panama. *Proc Natl Acad Sci*.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0914115107>

- Da Fonseca RR, Albrechtsen A, Themudo GE, et al (2016) Next-generation biology: Sequencing and data analysis approaches for non-model organisms. *Mar Genomics* 30:3–13. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2016.04.012>
- Das KC, Misra HP (2004). Hydroxyl radical scavenging and singlet oxygen quenching properties of polyamines. *Mol Cell Biochem* 262:127–133. <https://doi.org/10.1023/B:MCBI.0000038227.91813.79>
- Davies KJ (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.*
- Dhorne-Pollet S, Thélie A, Pollet N (2013). Validation of novel reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in *Xenopus tropicalis* during embryonic and post-embryonic development. *Dev Dyn* 242:709–717. <https://doi.org/10.1002/dvdy.23972>
- Eason C, O'Halloran K (2002). Biomarkers in toxicology versus ecological risk assessment. *Toxicology* 181–182:517–521. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00472-9](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00472-9)
- Fenelon JC, Murphy BD (2017). Inhibition of polyamine synthesis causes entry of the mouse blastocyst into embryonic diapause. *Biol Reprod* 97:119–132. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox060>
- Ferrari A, Anguiano L, Lascano C, et al (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.* <https://doi.org/10.1002/jbt.20236>
- Ferrari A, Lascano CI, Anguiano OL, et al (2009). Antioxidant responses to azinphos methyl and carbaryl during the embryonic development of the toad *Rhinella (Bufo) arenarum* Hensel. *Aquat Toxicol* 93:37–44. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.03.003>

- Ferrari A, Venturino A, Pechén AM, Angelo DD (2007). Muscular and brain cholinesterase sensitivities to azinphos methyl and carbaryl in the juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. 146:308–313. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.04.002>
- Ferrari A, Venturino A, Pechen de D'Angelo AM (2004). Time course of brain cholinesterase inhibition and recovery following acute and subacute azinphosmethyl, parathion and carbaryl exposure in the goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol Environ Saf* 57:420–425. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00069-6](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00069-6)
- Francis. WR, Christianson. LM, Kiko. R, et al (2013). A comparison across non-model animals suggests an optimal sequencing depth for *de novo* transcriptome assembly. *BMC Genomics* 14:167
- Fu J, Bian L, Zhao L, et al (2010). Identification of genes for normalization of quantitative real-time PCR data in ovarian tissues. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmq062>
- Fujisawa S, Kadoma Y (2005). Kinetic evaluation of polyamines as radical scavengers. *Anticancer Res* 25:965–969
- Gibbs PJ, Cameron C, Tan LC, et al (2003). Housekeeping genes and gene expression analysis in transplant recipients: A note of caution. *Transpl Immunol*. [https://doi.org/10.1016/S0966-3274\(03\)00010-8](https://doi.org/10.1016/S0966-3274(03)00010-8)
- Glare EM (2002). beta-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. *Thorax* 57:765–770. <https://doi.org/10.1136/thorax.57.9.765>
- Gomase VS, Tagore S (2008) Toxicogenomics. *Curr Drug Metab* 9:250–254
- Goodwin AC, Murray-Stewart TR, Casero RA (2011). A simple assay for mammalian spermine oxidase: a polyamine catabolic enzyme implicated in drug response and disease. *Methods Mol Biol*. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-034-8_10

- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, et al (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. 29:1. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>
- Guasco Herrera C, Chávez Servín JL, Ferriz Martínez RA, et al (2014). Poliaminas: pequeños gigantes de la regulación metabólica. *REB Rev Educ bioquímica* 33:51–57.
- Guerreño M, López-Armengol, MF, Luquet C, Venturino A (2016). Comparative study of toxicity and biochemical responses induced by sublethal levels of the pesticide azinphosmethyl in two fish species from North Patagonia, Argentina. *Aquatic Tox* 177: 365-372.
- Ha HC, Sirisoma NS, Kuppusamy P, et al (1998). The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11140–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.19.11140>
- Halliwell B (2011). Free radicals and antioxidants - Quo vadis? *Trends Pharmacol. Sci* 32 (3): 125-130.
- Han Y, Gao S, Muegge K, et al (2015). Advanced applications of RNA sequencing and challenges. *Bioinform Biol Insights*. <https://doi.org/10.4137/BBI.S28991>
- Hellsten U, Harland RM, Gilchrist MJ, et al (2010). The genome of the western clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Science* (80) 328:633–636. <https://doi.org/10.1126/science.1183670>
- Hou M-H (2001). Effects of polyamines on the thermal stability and formation kinetics of DNA duplexes with abnormal structure. *Nucleic Acids Res.* <https://doi.org/10.1093/nar/29.24.5121>
- Hruz T, Wyss M, Docquier M, et al (2011). RefGenes: identification of reliable and condition specific reference genes for RT-qPCR data normalization. *BMC Genomics* 12:156. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-156>
- Huang X, Chen X, Armbruster PA (2016). Comparative performance of transcriptome assembly methods for non-model organisms. *BMC Genomics* 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2923-8>

- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A (2005). Real-time RT-PCR normalisation ; strategies and considerations. 279–284. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364190>
- Huggett JF, Novak T, Garson JA, et al (2008). Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: An important and unrecognised phenomenon. BMC Res Notes 1:1–9. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-1-70>
- Hyvönen MT, Uimari A, Keinänen TA, et al (2006). Polyamine-regulated unproductive splicing and translation of spermidine / spermine N 1 - acetyltransferase. RNA J 12:1569–1582. <https://doi.org/10.1261/rna.39806.cell>
- Igarashi K, Kashiwagi K (2010). Modulation of cellular function by polyamines. Int J Biochem Cell Biol 42:39–51. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.07.009>.
- International Union of Pure and Applied Chemistry. 2019. Chlorpyrifos (Ref: OMS 971). Record last updated 2019 Jan 24. Zurich, Switzerland. [Cited 2019 October 5]. Available from <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/154.htm>.
- Janssens BJ, Le Gall R, Rees JF (2002) Peroxide-triggered erythrocytes haemolysis as a model for the study of oxidative damage in marine fishes. J Fish Biol. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2002.tb01737.x>
- Jokanović M (2001). Biotransformation of organophosphorus compounds. Toxicology 166:139–160. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00463-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00463-2)
- Kai M, Kaito C, Fukamachi H, et al. (2003). Overexpression of S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) in Xeno-pus embryos activates maternal program of apoptosis as a “fail-safe” mechanism of early embryogenesis. Cell Res 13:147–158. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290159>
- Kaufer D, Friedman A, Seidman S, Soreq H (1998). Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. Nature 393:373–377. <https://doi.org/10.1038/30741>

- Kono Y, Fridovich I (1982). Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem*
- Kozera B, Rapacz M (2013). Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet* 54:391–406. <https://doi.org/10.1007/s13353-013-0173-x>
- Krüger A, Vowinckel J, Mülleder M, et al (2013). Tpo1-mediated spermine and spermidine export controls cell cycle delay and times antioxidant protein expression during the oxidative stress response. *EMBO Rep* 14:1113–1119. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.165>
- Kwak MK, Kensler TW, Casero RA (2003). Induction of phase 2 enzymes by serum oxidized polyamines through activation of Nrf2: Effect of the polyamine metabolite acrolein. *Biochem Biophys Res Commun* 305:662–670. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00834-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00834-9)
- Kwet SR, Silvano D, Úbeda C, et al (2004). *Rhinella arenarum*. IUCN 2011 IUCN Red List Threat Species <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/54576/0> 8235:
- Lascano CI, Ferrari A, Gauna LE, et al (2011). Organophosphorus insecticides affect normal polyamine metabolism in amphibian embryogenesis. *Pestic Biochem Physiol* 101:240–247. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.10.001>
- Lascano CI, Sotomayor V, Ferrari A, Andrés V (2009). Alteraciones del desarrollo embrionario, poliaminas y estrés oxidativo inducidos por plaguicidas organofosforados en *Rhinella arenarum*. *Acta Toxicológica Argentina* 17:8–19
- Liendro N, Ferrari A, Mardirosian M, et al (2015). Toxicity of the insecticide chlorpyrifos to the South American toad *Rhinella arenarum* at larval developmental stage. *Environ Toxicol Pharmacol* 39:525–535. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.12.022>
- Livingstone D. (1998). The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol* 120:43–49. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(98\)10008-9](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(98)10008-9)

- Loewy M, Kirs V, Caravajal G, et al (1999). Groundwater contamination by azinphos methyl in the Northern Patagonic Region (Argentina). *Sci Total Environ* 225:211–218. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00365-9](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00365-9)
- Loewy RM, Carvajal LG, Novelli M, Pechen de D'Angelo AM (2003). Effect of Pesticide Use in Fruit Production Orchards on Shallow Ground Water. *J Environ Sci Heal Part B* 38:317–325. <https://doi.org/10.1081/PFC-120019898>
- Loewy RM, Monza LB, Kirs VE, Savini MC (2011). Pesticide distribution in an agricultural environment in Argentina. *J Environ Sci Heal - Part B Pestic Food Contam Agric Wastes*. <https://doi.org/10.1080/03601234.2011.592051>
- López-García C, López-Contreras AJ, Cremades A, et al (2008). Molecular and morphological changes in placenta and embryo development associated with the inhibition of polyamine synthesis during midpregnancy in mice. *Endocrinology* 149:5012–5023. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0084>
- Lushchak VI (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat Toxicol* 101:13–30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>
- Macchi, P, Lowey, R, Lares, B, Latini, L, Monza, L, Guiñazú, N, Montagna, CM (2018). The impact of pesticides on the macroinvertebrate community in the water channels of the Río Negro and Neuquén Valley, North Patagonia (Argentina). *Env Sci and Poll Res* 25(11): 10668-10678.
- Mardirosian MN, Ceschin DG, Lascano CI, Venturino A (2017). Molecular effectors in the chronic exposure to arsenic as early and sensitive biomarkers in developing *Rhinella arenarum* toads. *Aquat Toxicol* 186:19–27. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.02.019>
- Matsumura F (1985). *Toxicology of Insecticides*. Springer US, Boston, MA
- McGettigan PA (2013). Transcriptomics in the RNA-seq era. *Curr. Opin. Chem Biol* 17 (1): 4-11.
- Michael AJ (2016). Biosynthesis of polyamines and polyamine-containing molecules. *Biochem. J.* 473:2315–2329

- Mileson B (1998). Common Mechanism of Toxicity: A Case Study of Organophosphorus Pesticides. *Toxicol Sci* 41:8–20. <https://doi.org/10.1006/toxs.1997.2431>
- Miller-Fleming L, Olin-Sandoval V, Campbell K, Ralser M (2015). Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. *J Mol Biol* 427:3389–3406. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.06.020>
- Mitchell JLA, Judd GG, Leyser A, Choe CY (1998). Osmotic stress induces variation in cellular levels of ornithine decarboxylase-antizyme. *Biochem J*. <https://doi.org/10.1042/bj3290453>
- Nishimura K, Okudaira H, Ochiai E, et al (2009). Identification of proteins whose synthesis is preferentially enhanced by polyamines at the level of translation in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 41:2251–2261. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.04.021>
- Noctor G (2002). Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J Exp Bot*. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.372.1283>
- Nolan T, Hands RE, Bustin SA (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc*. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.236>
- North M, Vulpe CD (2010). Functional toxicogenomics: Mechanism-centered toxicology. *Int J Mol Sci* 11:4796–4813. <https://doi.org/10.3390/ijms11124796>
- Osborne HB, Cormier P, Lorillon O, et al (1993). An appraisal of the developmental importance of polyamine changes in early *Xenopus* embryos. *Int J Dev Biol*
- Panemangalore M, Bebe FN (2000). Dermal exposure to pesticides modifies antioxidant enzymes in tissues of rats. *J Environ Sci Heal - Part B Pestic Food Contam Agric Wastes*. <https://doi.org/10.1080/03601230009373279>
- Pegg. AE, Casero. RA (2011). *Polyamines*. Humana Press, Totowa, NJ
- Pegg AE (2014). The function of spermine. *IUBMB Life* 66:8–18. <https://doi.org/10.1002/iub.1237>

- Pegg AE (2008). Spermidine/spermine- N 1 -acetyltransferase: a key metabolic regulator. *Am J Physiol Metab* 294: E995–E1010. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90217.2008>
- Pegg AE (2009). S-Adenosylmethionine decarboxylase. *Essays Biochem* 46:25–46. <https://doi.org/10.1042/bse0460003>
- Pegg AE (2013). Toxicity of Polyamines and Their Metabolic Products. *Chem Res Toxicol* 26:1782–1800. <https://doi.org/10.1021/tx400316s>
- Pegg AE (2009). Critical Review Mammalian Polyamine Metabolism and Function. 61:880–894. <https://doi.org/10.1002/iub.230>
- Pegg AE (2006). Regulation of Ornithine. 281:14529–14532. <https://doi.org/10.1074/jbc.R500031200>
- Pegg AE, Michael AJ (2010). Spermine synthase. *Cell Mol Life Sci* 67:113–121. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0165-5>
- Pérez M, Rojo C, Encinas MT (2009). Modelos animales en anfibios. *Rev Complut Ciencias Vet* 3:315–323. <https://doi.org/10.5209/RCCV.23591>
- Pilliod DS, Muths E, Scherer RD, et al (2010). Effects of Amphibian Chytrid Fungus on Individual Survival Probability in Wild Boreal Toads. *Conserv Biol* 24:1259–1267. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2010.01506.x>
- Pinto E, Ferreira I (2015). Changes in the content of free and conjugated polyamines during Lettuce (*Lactuca sativa*) growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63 (2): 440-446. <https://doi.org/10.1021/jf505453s>.
- Pope CN, Karanth S, Liu J, Yan B (2005). Comparative carboxylesterase activities in infant and adult liver and their in vitro sensitivity to chlorpyrifos oxon. *Regul Toxicol Pharmacol*. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2005.01.004>
- Pope CN, Liu J (1997). Age-related differences in sensitivity to organophosphorus pesticides. In: *Environmental Toxicology and Pharmacology*.

- Quiroga LB, Sanabria EA, Fornés MW, et al (2019). Sublethal concentrations of chlorpyrifos induce changes in the thermal sensitivity and tolerance of anuran tadpoles in the toad *Rhinella arenarum*? *Chemosphere* 219:671–677. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.059>
- Radonić A, Thulke S, Mackay IM, et al (2004). Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 313:856–862. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.11.177>
- Remans T, Keunen E, Bex GJ, et al (2014). Reliable gene expression analysis by reverse transcription-quantitative PCR: Reporting and minimizing the uncertainty in data accuracy. *Plant Cell*. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.130641>
- Rhee HJ, Kim EJ, Lee JK (2007). Physiological polyamines: Simple primordial stress molecules. *J Cell Mol Med* 11:685–703. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00077.x>
- Rider JE, Hacker A, Mackintosh CA, et al (2007). Spermine and spermidine mediate protection against oxidative damage caused by hydrogen peroxide. *Amino Acids*. <https://doi.org/10.1007/s00726-007-0513-4>
- Robinson MD, Oshlack A (2010). A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data
- Rosenbaum EA, Caballero de Castro A, Gauna L, Pechen de D'Angelo AM (1988). Early biochemical changes produced by malathion on toad embryos. *Arch Environ Contam Toxicol*. <https://doi.org/10.1007/BF01061988>
- Rosenbaum EA, Duboscq L, Soleño J, et al (2012). Response of biomarkers in amphibian larvae to in situ exposures in a fruit-producing region in North Patagonia, Argentina. *Environ Toxicol Chem* 31:2311–2317. <https://doi.org/10.1002/etc.1950>
- Russell JJ, Theriot JA, Sood P, et al (2017). Non-model model organisms understanding biology. *BMC Biology*

- Sagor GHM, Berberich T, Takahashi Y, et al (2013). The polyamine spermine protects *Arabidopsis* from heat stress-induced damage by increasing expression of heat shock-related genes. *Transgenic Res.* <https://doi.org/10.1007/s11248-012-9666-3>
- Schenkel E, Dubois JG, Helson-Cambier M, Hanocq M (1996). Cytotoxicity of polyamines to *Amoeba proteus*: Role of polyamine oxidase. *Cell Biol Toxicol* 12:1–9. <https://doi.org/10.1007/BF00143389>
- Seiler N (2011). Functions of polyamine acetylation. *Can J Physiol Pharmacol* 65:2024–2035. <https://doi.org/10.1139/y87-317>
- Session AM, Uno Y, Kwon T, et al (2016). Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature19840>
- Shibata M, Shinga J, Yasuhiko Y, et al (1998). Overexpression of S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) in early *Xenopus* embryos induces cell dissociation and inhibits transition from the blastula to gastrula stage. *Int J Dev Biol* 42:675–686. <https://doi.org/10.1387/ijdb.9712522>
- Simonović A, Trifunović M, Raspor M, et al (2012). Dimethyl sulfoxide improves sensitivity and specificity of RT-PCR and QRT-PCR amplification of low-expressed transgenes. *Arch Biol Sci* 64:865–876. <https://doi.org/10.2298/ABS1203865S>
- Šindelka R, Ferjentsik Z, Jonák J (2006). Developmental expression profiles of *Xenopus laevis* reference genes. *Dev Dyn* 235:754–758. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20665>
- Singhal S (2013). De novo transcriptomic analyses for non-model organisms: an evaluation of methods across a multi-species data set. 403–416. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12077>
- Slack JM, Forman D (1980). An interaction between dorsal and ventral regions of the marginal zone in early amphibian embryos. *J Embryol Exp Morphol* 56:283–99

- Smirnova OA, Bartosch B, Zakirova NF, et al (2018). Polyamine Metabolism and Oxidative Protein Folding in the ER as ROS-Producing Systems Neglected in Virology. <https://doi.org/10.3390/ijms19041219>
- Sotomayor V, Chiriotto TS, Pechen AM, Venturino A (2015). Biochemical biomarkers of sublethal effects in *Rhinella arenarum* late gastrula exposed to the organophosphate chlorpyrifos. *Pestic Biochem Physiol* 119:48–53. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.02.006>
- Sotomayor V, Lascano C, de D'Angelo AMP, Venturino A (2012). Developmental and polyamine metabolism alterations in *Rhinella arenarum* embryos exposed to the organophosphate chlorpyrifos. *Environ Toxicol Chem* 31:2052–2058. <https://doi.org/10.1002/etc.1921>
- Sparling DW, Fellers G (2007). Comparative toxicity of chlorpyrifos, diazinon, malathion and their oxon derivatives to larval *Rana boylei* 147. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.10.036>
- Sparling DW, Fellers GM (2009) Toxicity of two insecticides to California, USA, anurans and its relevance to declining amphibian populations. *Environ Toxicol Chem* 28:1696–1703. <https://doi.org/10.1897/08-336.1>
- Ståhlberg A, Håkansson J, Xian X, et al (2004). Properties of the Reverse Transcription Reaction in mRNA Quantification. *Clin Chem*. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.026161>
- Stanton KA, Edger PP, Puzey JR, et al (2017). A Whole-Transcriptome Approach to Evaluating Reference Genes for Quantitative Gene Expression Studies: A Case Study in *Mimulus*. *G3 Genes, Genomes, Genetics* 7:1085–1095. <https://doi.org/10.1534/g3.116.038075>
- Storti L, Bevilacqua M (2017). Cadena de valor manzana y pera. Minist Hacienda la nación, Secr política económica, Subsecr Program microeconómica
- Stuart SN (2005). Response to Comment on “Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide.” *Science* (80-) 309:1999c-1999c. <https://doi.org/10.1126/science.1113265>

- Sun Y, Xiong Z, Xiang X, et al (2015). Whole-genome sequence of the Tibetan frog *Nanorana parkeri* and the comparative evolution of tetrapod genomes. 1257–1262. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501764112>
- Tabor CW, Tabor H (1976). 1,4-Diaminobutane (Putrescine), Spermidine, and Spermine. *Annu Rev Biochem* 45:285–306. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.45.070176.001441>
- Tkachenko A, Nesterova L, Pshenichnov M (2001). The role of the natural polyamine putrescine in defense against oxidative stress in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol*. <https://doi.org/10.1007/s002030100301>
- Todd E V., Black MA, Gemmell NJ (2016). The power and promise of RNA-seq in ecology and evolution. *Mol Ecol*. <https://doi.org/10.1111/mec.13526>
- Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA (2018). Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid Redox Signal* 29:1727–1745. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7342>
- Uemura T, Tanaka Y, Higashi K, et al (2013). Acetaldehyde-induced cytotoxicity involves induction of spermine oxidase at the transcriptional level. *Toxicology* 310:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.05.008>
- Venturino A, Bergoc RM and Pechen AM (1998). "Kinetic models of lipophilic compound uptake and bioelimination in amphibians during the aquatic stages". *J. Biol. Sys.* 6: 85-94. ISSN 0218-3390.
- Venturino A, Gauna L, Bergoc, RM and Pechen de D'Angelo AM (2001). "Toxokinetics of malathion in larval stages of the toad *Bufo arenarum* (Hensel). Effect of exogenous spermidine". *Pest. Biochem. Physiol.* 70: 142-150. ISSN 0048-3575.
- Venturino A, Rovedatti MG, Gauna L, Loewy M and Pechen de D'Angelo AM (2001). "Model study of factors influencing steady state clearance for lipophilic toxicants in aquatic microcosms" *J. Biol. Sys.* 9: 123-143. ISSN 0218-3390.

- Venturino A, Anguiano OL, Gauna L, et al (2001). Thiols and polyamines in the potentiation of malathion toxicity in larval stages of the toad *Bufo arenarum*. *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol*. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(01\)00241-1](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00241-1)
- Venturino A, Rosenbaum E, Caballero De Castro A, et al (2003). Biomarkers of effect in toads and frogs. *Biomarkers* 8:167–186. <https://doi.org/10.1080/1354700031000120116>
- Verbrugghe E, Martel A, Pasmans F (2019). Reference Gene Validation for Quantitative Real-time PCR Studies in Amphibian Kidney-derived A6 Epithelial Cells. 47:63–70. <https://doi.org/10.1177/0261192919862936>
- Vijay N, Poelstra JW, Künstner A, Wolf JBW (2013). Challenges and strategies in transcriptome assembly and differential gene expression quantification. A comprehensive in silico assessment of RNA-seq experiments. *Mol Ecol* 22:620–634. <https://doi.org/10.1111/mec.12014>
- Voronkova YS, Voronkova OS, Gorban VA, Holoborodko KK (2018). Oxidative stress, reactive oxygen species, antioxidants: a review. *Ecol Noospherology* 29:52–55. <https://doi.org/10.15421/031809>
- Wang Y, Casero RA (2006). Mammalian polyamine catabolism: A therapeutic target, a pathological problem, or both? *J Biochem* 139:17–25. <https://doi.org/10.1093/jb/mvj021>
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10:57–63. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>
- Yperman J, De Visscher G, Holvoet P, Flameng W (2004). Beta-actin cannot be used as a control for gene expression in ovine interstitial cells derived from heart valves. In: *Journal of Heart Valve Disease (2011) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*.
- Yang, HLJ, Liu, SM, Huang TT, Guo, LB. Selection and evaluation of novel reference genes for quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) based on genome and transcriptome data in *Brassica napus* L. *Gene* 538(1): 113-122.

Zhuang, HY, Fu, W, He, L, Wang, y, Wei, Y (2015). Selection of appropriate reference genes for quantitative real-time PCR in *Oxytropis ochrocephala* Bunge using transcriptome datasets under abiotic stress treatments. *Front. Plant Sci.* 6: 475.

8. ANEXO

Secuencias obtenidas mediante secuenciación de productos de PCR**BETA ACTINA**

>180517-R01_E06_B-ACT_B-ACT_F.ab1 94

GGGGGGGCGGGGCGGTGCCATGTACACTGGGACGACATGGAGAAGATCTGCATCACACCTTCTACAATGAGCTGCGTGTTGCCCCAG
AGGACA

>180517-R01_G06_B-ACT_B-ACT_R.ab1 104

GGGGAAGCGAATAGGCTTGGCAGAGTTCTCTTGATGTCACGCACGATTTCTCTTTTCGGCTGTGGTGGTGAAGCTGTAGCCTCTCTCAG
TCAAGATCTTCATGAG

FOS

>180514-028_E14_FOS_FOS_F.ab1 406

TAA AATTGGTTTTTTAAGGCATCTTTCCGGTCGGCATCTCCAGTCTTCCCTTCCCGGAGAAGGAGAGCTCCCAGCTGCAGATATCACTAG
ACCTCAAATCCGAGCCCCTGGACGACTTCTCTTCAGCTCTCCGGCTGCCGGACCCTGTGACGCCGCCCGCTCCGTGCCAAACGTGG
ATCTGTCCAGCACCCCTGTACTCGTCTGACTGGGAGCCCCTGTACAGCACCCCTGTCCGGCAGAAGTGGAGCCCCTGTGCACGCCCGTGG
TTACCTGCACGCCAACATGTACCACCTACACCACCTCGTTTGTCTTCACCTACCCTGAGTCCAACCTTTTTCTAACTGCGGAGCCGCC
CATCGCCGAGGAAGCAGCAGCAACGAGCAGTCGTCCGGACTCC CTCAACTCTCCC

>180514-028_G14_FOS_FOS_R.ab1 442

AGAGAGAAGCAATTA AATTGTCAGTAAGGTGGGAGAGTTGAGGGAGTCCGACTACTGCTCGTTGCTGCTGCTTCCCTCGGCGATGGGC
GGCTCCGCAGTTAGGAAAAGAGTTGGACTCATGGTATGTGAATACTA ACTATGTGGTGTATGTGGTACATGTTGGCGTGCAGGTAACCA
CGGGCGTGCACTGGGGCTCCACTTCTGCCGACAGGGTGCTGTACAGGGGCTCCCAGTCAGACGAGTACAGGGTGCTGGACAGATCC
ACGTCTGGCACGGAGCGGGCGGCGTCACATGGTCCGGCAGCCGGAGAGCTGAAGAGGAAGTCGTCCAGGGGCTCGGATTTGAGGTC
TAGTGCTATCTGCAGCTGGGAGCTCTCTTTCTCCGGGACGGAATTCTGGGAGATGCCTACGGGAAAGAGGGGCTCAGACGAAACCTC
ATGAGC

NRF2

>180514-028_K12_NRF2_NRF2_R.ab1 401

TGGTTGTTTTTTTTTAATCTTCCCAACCCATGTGAACATACCTATTGTTGCTTCGGCGGGATTGCCCCGGGCGCCTCGTGTGCCCCGG
 ATCATGCGCCCGCCTAGGAACTTCAACTCTTGTTTTATTTGAATCTTCTGAGTACTTTTTACAAATAAATAAAAACCTTCAACAACGGAT
 CTCTTGGTTCTGGCATCCATGAAGAACGCAACGAAATGCGATAATTAATGTGAATTGCTGAATTCAGTGATTCATTGAATCTTTGAACGC
 TTATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCTGACCGTCATTTCAACCCTCATGCCCCCTAAGGCGTGGTGTAGGGATCGG
 CCAAACCCGCGTGGGACGGCCAGTCCCTAAATCTTTGTCGTG

ODC

>180514-028_M10_OSD_OSD_F.ab1336

ACCGCTTCGTCATCACATGTTGGCCCAATGCTGCTTGAGTAGTATTTTTTCATCCAATTTAGGCTTCTTCTGGAGCACAGGCTTGACATG
 AGCATGGTCATACAAAATGCAATTGAAGGATCCGTAGACACCATCGTTGACATAATACATGAGCGTTTTGGGACATGAAGTATCATCTTC
 ATCATCGGATCCAGACTGTTTCAGTCAACATGACCTTCTTTGCAATGATATTGACTGCGAGGGTGAAGGCTGAAGCAACATAGTATCTTC
 CAGGTTCTGCAATAATTTGCACGCCGGAGTCAACTGGAAAGTAAACGGCGAAAGGCAAAGACATATG

>180514-028_O10_OSD_OSD_R.ab1363

AAGGGAAGCTGGCGGACTGGAGATACTATGTTGCTTCAGCCTTCACCCTCGCAGTCAATATCATTGCAAAGAAGGTCATGTTGACTGAA
 CAGTCTGGATCCGATGATGAAGATGATACTTCATGTCCCAAACGCTCATGTATTATGTCAACGATGGTGTCTACGGATCCTTCAATTGC
 ATTTTGTATGACCATGCTCATGTCAAGCCTGTGCTCCAGAAGAAGCCTAAATTGGATGAAAATACTACTCAAGCAGCATTGTTGGGGGCC
 AACTTGTGATGGACTGGATCGTATAGTTGAGCGTTTCGACCTACCAGAAAATGGGTGAATATATGTTTCATTGATT
 CTTTTCTCCTTAAATTCT

APAO

>180517-R01_M06_PAO_PAO_F. ab1815

TGGGAAGTTCAATTGTCCATTGGTATAAGACCCTCGTATGTAGGGGTTACTATGCCATGTGGAGCGCAGCACCCCTCGCAGTTCTGTCA
CTGGCCAACTTGTAATTGCTTCAATAATCTGACACATACTTCTCCCACTTCACTTTTCAGGGAGGGTCTCCATGTGCTCCGCAGCCAATC
CAGTGATCCAACCACAGAGGGTGCTTCTATGCATTGGAACGCAGTCAAACCTCCAATCTTCTTGAACCACTCTGAACGCCACGTTTGT
TGCCTGCACCCATCAGAATAGCCCTTCAGGCTCTCTGGGCCTTGTCCCATACCAGCTGTATTCCGGCACAATCATCCGGCCAAAAGG
GCTTTGAAAACCTCTAAGAAGATCTTGGCCACTGTGCCAAACCCCAATCGCTGGATGGCCTCCATCTTTCCCTTTGGCAGGGGAGGGTC
AAAAAGAGTAGACGCTCGTTCCTTCATGCACCCAAGAGACACAGTGACAATGACATGATCTGCTGGAAACTGCTCACCGTCTTACAAA
CCACATTGACCGGATGTTTTGATACCTTCGAAGGTGATGAAGATCCGTCCCACTGGACGCATCGAACAGGCTTACGGCAGCGAAGGGA
ATTAGGCGGCAGCTGGTCTATGAAGACGTCTAGTAGAGCTTGGTAGCCCTTACTGCCCAAGGAGTTAAAAAAGGGTCCCTCGAGAGCA
GTGTATAAGCCAAGCTGACTCAACGAGAACTCATACATGGAGTTACAAGCCTCGTCCACGAAATTTGTCTTTTTTTTAAAGAATCTATAATA
T TTATAAAATTTTAT

>180517-R01_O06_PAO_PAO_R.ab1 842

TGGGCAGTAACTCTTGTTGAGTAGCTTGGCTTATACTGCTCTCGAGGGACCCTTTTTTAACTCCTTGGGCAGTAAGGGCTACCAAGC
TCTACTAGACGTCTTCATAGACCAGCTGCCGCCTAATTCCCTTCGCTGCCGTAAGCCTGTTTCGATGCGTCCAGTGGGACGGATCTTCAT
CACCTTCGAAGGTATCAAACATCCGGTCAATGTGGTTTGTGAAGACGGTGAGCAGTTTCCAGCAGATCATGTCATTGTCAGTGTGTCT
CTTGGGTGCATGAAGGAACGAGCGTCTACTCTTTTTGACCCTCCCCTGCCAAAGGGAAAGATGGAGGCCATCCAGCGATTGGGGTTTG
GCACAGTGGCCAAGATCTTCTTAGAGTTTTCAAAGCCCTTTTGGCCGGATGATTGTGCCGGAATACAGCTGGTATGGGAACAAGGCC
AGAGAGCCTGAAGGGCTATTCTGATGGGTGCAGGCAACAACGTGGCGTTCAGAGTGGTTCAAGAAGATTGGAGGTTTTGACTGCGTT
CCAATGCATAGAAGCACCTCTGTGGTTGGATCACTGGATTGGCTGCGGAGCACATGGAGACCCTCCCTGAAAGTGAAGTGGGAGAA
GTATGTGTCAGATTATTGAAGCAATTTACAAGTTGGCCAGTGACAGAACTGCGAGGGGTGCTGCGCTCCACATGGCATAGTAACCCCT
ACATACGAGGGTCTTATAACCAATGTGCCTTTGGGGGTGGATGCAGTGAAAGAGCAAATGGACCCTAACCTTTTTTACCTTTTATTATACTC
TCTC TATATCTCACCCCTCCCCACCCACCTCCCGCTTCCTCTCCTA

SOD

>180517-R01_I06_SOD_SOD_F.ab1 266

CAAAAAGGAAGGGGGGGGTTGAGTAAATGTTTTTGGTGGAGAGTTACACCGGGTATGGGGGGGGATAACGTCCCGACTCTAGGTTTTT
TTGTGAACACGATGGGTATCGGAAAGCCTTCCGAGATGCGGTGTGAGACACGAATTTGTGGCTTGGATGGATTGAATGGGGGGGTAG
GGGGGGACACACCGAGGTCGTTGTGTGACAGGGGGAGGGAATCGGCC
CGGGCTTTTTCCATCCCCTGGCCGCACGGGGGAATCGTGGAGT

>180517-R01_K06_SOD_SOD_R.ab1 309

CGGAAGGATGAAAGAATTTGGTATGGAGACAGAGCAGAGGTGAAACAACCGGCCGGGCTGAAAATATCACCATCTAAAGTCATAAGGG
GTTGGAAGGAGGACCTGGGGTCCCGGAGAAGACTCCCAGAAGTCTAGGTAAGCCAAGAATTACCAGGATTTGGAACAATTAAGGGAT
AGGTGGCAGGGGAGACATCAAGGGTCTCGGTGCCGTGAGTATAAGGGAGACAGCGATGGCTATTTCCGCTTCACTGGCTCTGAGAGG
GAATGCAGGGCCCTTTCTTTTAAACCGCTTATGAAATGATTGAAGT

SAMDC

>191021-056_G01_SAMDC_Fw-SAM.ab1 633

TGGAGAAAAAATGAATGGAAAGGACCTTGTTTCTACTGTCCTTCATCTTGATGATTCTCTCGGTGGCAGCACAGTTATCTCTAACCTGAG
ACCGCTCATATTACTTAAATATCTGACCCGGATTGAGTTAATACCGCCTGCCCCCGAGAACGAGAAGGAAATTTTCACTTGACCTTGTG
GTAACACAGCAGCGAATGTGCAAATTTGCTATACCTGGGTTTGCAGTTGACCAATGGGGCAATGAATTCCTTAATCGACAGTGGGCCAC
CTGGTTGGGGAGGAAAACATGGACCAGACTCCTACAAAATGACCCTAGATCAATTATGGACTTTGCAGAGGCCTGGTGAATATCCCT
GCTCCCCTATAACGCCTTAGCCTTGTAAGCAATTGGTCGAAAAGAACTGTTATGTGGGTTACCCCTGTACTTTCCGAGCCTGTGAATA
AGCACTGACCAACTAAAGCCAGCAACCCTACCGTACTTAATAATCACCGGGAAACGGATTTACGGGACAGCCAGCGGTACACAAAACG
CGGACAGACGATGTTAAGTACCTATTCAACTTTTGAAGCTGCATTCTCACTCTCGATTAGAGTGTTTTGTAATTTTTTTCATTTCTCTGT
CTGCGTGAC

c-JUN

>191021-056_A01_JUN_Fw-JUN.ab1 1044

AAAATGTACCCATCCAGTTCTCTGCCCTAAAATGTCACGGACGAGCAGGAGGGCTTTGCGGAGGGATTTGTCCGGGCGTTGCAAGAAC
TTCATAAC

CAGAACAACCTTGCCCAATGTCCCCTCTGCCCCCCAGCCGCCACCTGCACCGGACTGACCTCCGGCGTCTCCTCCATAGCAGGGAAC
AGTGGATA

CAATAACCCCTTGACACAACGAGCCGCCGTCTATGCCAACCTGAACAACCTCAACCCGACCACCATCAGCACCACCCTGCCTTCAAC
AGCAACGCCATGGGCTTCGCCTCTCAGCATCACACCAGCCCCCATCCCGTTTCAGCACCCCGGCTCCAGGCTCTGAAAGAAGAG
CCCCAGACGGTGCCCGAGATGCCCGGCGAGACGCCTCCCCTCTCCCCATCGACATGGAGTCTCAGGAGAGGATAAAAGCCGAGCG
GAAGCGTATGAGGAACCGGATCGCCGCCTCCAAGTGCAGGAAGAGGAAGCTGGAACGCATCGCCCGGCTGGAAGACAAAGTGAAAA
ACTTAAAGTCGCAGAACTCTGAACTGGCGTCAAATGACCCAACTCTCACTCTGCACCCTGCCTTCTCCCTGGTGCCTTATTGTGGTTAA
TGGCGTGGACATTTTCTCGAAGCGAGCAATGGCATAGCTTACGCATGACCCAATGGCCAACCTACCCATAATGAACGACCCTGATCTT
CCGATTTGGGAATGAGACGGCTTCTTTCCCGCGTTCCACCCCAAAAATTATCGACTAACTTAGGCACCATAACCTTTACGGAACGACTA
AGCTTAAGCGACGCATTGAATACTGCGCAAGTAAAATCTCTGCTTGCTGTGGCCTCCAAGAGGCAAATGATAATCGAACCAGCAAAGG
TATAGCGTCTGAATCATGTATTACAAAATCCTTACCATACTAACTTAAAATCTGTACACCTCGGACCCAA
GGAGGATTGTATATCCCCTATGGAGCCCCTTCTTTACTGGGAGTATACCGAAATCGATCTCCTACCCTCCACTTTTGCAT

GST-pi

>191021-056_E01_GST_Fw-GST.ab1 263

GGGGGTATCTCTTCATTCAGCTCCCTGGTCAGCCATGAGCATTTCGCATGGCTTCACAGCGACCTGACAAGGAAATCAAACAGAGAAAT
AAAACCTCGAACCCTGCAGCTCCTGACCACAATGCAGTTTTCCCCCCCCAAACGTTACAAAATGAAAAACCAGTCGTCTTCTATTATT
GACTCTTCCTTACAGCAGCTTGGTATTCTGACCAGGGCTAAACTGCAGT ACCAGAAACTGCTACTCGTGGTTGGGAATGCCCTGG

DAO

>191021-056_C01_DAO_Fw-DAO.ab1 1271

GGGGACCTGGAAAAGGAACTGGGTATAACGGCCAATACTTTGATAGCGTCAAGGAGCTAGTCCATAAGTATGAGAAGAATGAACTCAC
CAAGCTACAGCTATCAGATGACAGTGACGATCCTTATTCCACCTTCATGCCCCGTGGAGAATTTAAGACAAAAACAGATATTTATGGTCC
AAAAATATGTGAACCACAAGGAAAACGTTACCAAGTTCTGGGCAACTATGTTGAGTACACCGGCTGGAGCTTTGCTTACCGGGTCCGTC
CATCGGCTGGCCTCCAGATATTTGATATCCAGTATAATAATGAGAGGATAGCCTATGAGGTGAGCATAACAGGAGGCCATAGCCTTCTAT
AGCGGGGCTCGCCCGCTGATATGCAAACACAGTACATTGACTCTGGTTGGGGGATGGGGACAGAACATTATGAGCTGGCAAAGGA
ATCGACTGCCCTGAGGGGGCCACCTACCAGGATCTCTACAGTTATTACGACACGGACAAACCATTGCGATATAAGAATGCATTGTGTAT
CTTTGAGCAGCCCAAAAAAATTATTTTTGTTTCCATTATATGGCTCA

ATGTGAGTTCGAAACTGCGCATAGGCATGTGAATTCCGGGGTTAGATGGAAGGTCACCTTTATCAAGAAAGCCATTTTTTCAGGCTTCCCC
CGGTTATC

TTTAATTTTTTGGTTTCCTTTAGGGTTTACCCCAAATGGAGGATTTGGATAAACTTTAACCAACGGGATTCAGGAAAAACGGATGGGA
AAGGGGCGGATTGCCAAACCAGGGCCTTATATTAACGCCTTCCCCCCTACTGTGCAAGACCCCTAAAAAAATATTTAATCTGTTT
CCAATTGCTTTTTCGGGCTCGCCCCCTTTCTATTTTTCTTCATTGCGAAATACCCTGGGCCGTTTTAACGCCTTAAAGTCCTTTCAGAG
ATGAAATTTGGAAATGAAGTTTCCACATCCAAAAGGCATAAAGGAACTTTTTTATTTGCGCTTTTCACCTTTGGTAAGTTCCAGTTCCCAA
AAAATTTGTAATGTTTCATAAATTTAACACAGAAAATGTTTTGCTCCTGACATCTTCAATTTTCTAATATTATTCCCCCTTCTAAATCTG
GTATGATTCTTAACCTTCCCCCCCCCTCAGGGAGGAGTTTTATTATTCCCCCTTTAGGGGGTGCTTTTATTCTTGTTCCAAAAGGGAAT
AATGGCCCCCTCAAGGGCTCTCCCCCTCAACCCCGGGATGGGGTTAAACAT



Contents lists available at ScienceDirect

Pesticide Biochemistry and Physiology

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

Differential effects of azinphos-methyl and chlorpyrifos on polyamine oxidative metabolism during the embryonic development of *Rhinella arenarum* and its relation to oxidative stress

Natalia Pires^{a,c}, Santiago Maiale^b, Andrés Venturino^{a,d}, Cecilia Lascano^{a,d,*}

^a Centro de Investigaciones en Toxicología Ambiental y Agrobiotecnología del Comahue (CITAAC), Universidad Nacional del Comahue-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Buenos Aires 1400, 8300 Neuquén, Neuquén, Argentina

^b Instituto Tecnológico Chascomús, Universidad Nacional de General San Martín-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (INTECH/UNSAM-CONICET).

Av. Intendente Marino, Km 8, 200 CC 164, 7130 Chascomús, Buenos Aires, Argentina

^c Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional del Comahue. Toschi y Arrayanes, 8324 Cipolletti, Rio Negro, Argentina

^d Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue. Ruta 151, Km 12,5, 8303 Cinco Saltos, Rio Negro, Argentina

ARTICLE INFO

Keywords:

Organophosphorus pesticides
Spermine oxidase
N¹-acetylpolyamine oxidase
Diamine oxidase
Oxidative stress
Polyamine content

ABSTRACT

The organophosphorus pesticides azinphos-methyl (AZM) and chlorpyrifos (CPF) exert their toxic action by inhibition of acetylcholinesterase, but non-target processes such as polyamine metabolism can also be affected. Our objective was to evaluate the effects of different concentrations of AZM (0.5-, 2- and 9 mg L⁻¹) and CPF (0.5- and 1 mg L⁻¹) on polyamine oxidative metabolism along *Rhinella arenarum* embryonic development and to explore its relationship to oxidative stress. Free and conjugated polyamines were measured by HPLC. The activity of spermine oxidase (SMOX), N¹-acetylpolyamine oxidase (PAOX) and diamine oxidase (DAO) were measured through kinetic spectrofluorometry. Free putrescine and spermine were significantly increased in open mouth embryos exposed to AZM. Free polyamine levels were not affected by CPF exposure. In embryos exposed to AZM, DAO was increased in tail bud stage and SMOX was increased in open mouth stage, while embryos exposed to CPF showed an increase of PAOX activity in tail bud stage and a decrease of DAO and SMOX activity in open mouth stage. Polyamine levels and oxidative degradation enzymes respond differently if *R. arenarum* embryos are exposed to AZM or CPF, despite that both insecticides belong to the same chemical family. The early increase of DAO and PAOX would play a protective role to guarantee the normal progression of embryonic development. The increased production of reactive species might contribute to an oxidative stress situation generated by exposure to the insecticides and to the alteration of the antioxidant defense system.

In tail bud stage embryos, PAOX and SMOX were positively correlated to acetylcholinesterase activity and reduced glutathione levels (GSH), and negatively correlated to the antioxidant enzymes catalase (CAT) and glutathione S-transferase (GST). In complete operculum embryos, a negative correlation between antioxidant parameters and polyamine levels and polyamine oxidative metabolism was observed, except for SMOX, which showed a low positive correlation with CAT and GSH and a negative correlation to PAOX and DAO. We suggest the use of DAO and PAOX as biomarkers of exposure to AZM and CPF, respectively, as they respond earlier than the classical biomarker acetylcholinesterase.

1. Introduction

Polyamines are aliphatic polycations that are involved in different physiological roles, such as cell cycle progression, proliferation and cell growth (Wang et al., 2004; Zahedi et al., 2007; Mandal et al., 2013). The most abundant polyamines in vertebrates are putrescine (Put), spermidine (Spd) and spermine (Spm). Due to their polycationic nature,

polyamines are capable of interacting with negatively charged macromolecules, resulting in the stabilization of DNA, RNA, membranes and proteins (Bachrach, 2005; Moinard et al., 2005). Intracellular polyamine levels are maintained within a narrow range through a delicate balance between the activity of biosynthetic and degradative enzymes and a transport system. The biosynthetic enzyme ornithine decarboxylase is the rate-limiting factor in the production of Put, and S-

* Corresponding author at: CITAAC, Universidad Nacional del Comahue-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires 1400, CP-8300, Neuquén Capital, Argentina.

E-mail address: cecilia.lascano@faca.uncoma.edu.ar (C. Lascano).

<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.10.007>

Received 19 July 2019; Received in revised form 8 October 2019; Accepted 11 October 2019

Available online 23 October 2019

0048-3575/© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

adenosylmethionine decarboxylase controls the supply of decarboxylated S-adenosylmethionine to build Spd and Spm through spermidine synthase and spermine synthase, respectively (Pegg, 2009). Polyamine oxidative degradation comprises the activity of spermine oxidase (SMOX), spermidine-spermine N¹-acetyl transferase, N¹-acetyl polyamine oxidase (PAOX) and diamine oxidase (DAO). The oxidative activity generates reactive aldehydes and H₂O₂, which may trigger oxidative damage and stress (Pegg, 2013, 2009).

Pesticide use has greatly increased the quantity and quality of food for the growing human population but, at the same time, the concern about their effects on non-target organisms has also risen (Arias-Estévez et al., 2008). The common south american toad, *Rhinella arenarum*, is a widely distributed species in Argentina (Kwet et al., 2004). In the north Patagonia region, *R. arenarum* breeding and early development occur during spring and summer in water bodies and temporary pools often associated with agricultural areas, so they can be exposed to different pesticides. Among them, chlorpyrifos (CPF) and azinphos-methyl (AZM) are organophosphorus insecticides that exert their neurotoxic action by inhibition of acetylcholinesterase. Nevertheless, they can also alter polyamine synthesis (Lascano et al., 2011a; Sotomayor et al., 2012) and cellular redox status (Lascano et al., 2011b; Sotomayor et al., 2015; Liendro et al., 2015) in *R. arenarum*. Amphibians are among the vertebrate taxa with a higher proportion of endangered species and pesticide-related pollution is one of the main factors affecting amphibian populations (IUCN, 2018). Ortiz-Santaliestra et al. (2017) report that there is a lack of information on pesticide toxicity to amphibians when compared to other vertebrates because birds, fish and mammals are used as amphibians' surrogate species in environmental risk assessment of pesticides. We have previously demonstrated that early *R. arenarum* embryos exposed to AZM displayed a protective response through an increase in glutathione S-transferase (GST) activity, while late embryos were significantly malformed and showed a decrease of reduced glutathione levels (GSH) (Lascano et al., 2011b). Organophosphorus pesticides also altered polyamine synthesis and decreased the rate of embryonic development in *R. arenarum* embryos by increasing Put and decreasing Spd and Spm levels (Lascano et al., 2011a). The objective of the present study was to determine the impact of CPF and AZM on polyamine oxidative degradation by assessing the activities of SMOX, DAO and PAOX, as well as polyamine levels, and to explore the relationship between polyamine oxidative metabolism and oxidative stress.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Azinphos-methyl (O,O-dimethyl S-[(4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3(4H)-yl)methyl] phosphorodithioate); 99.0% purity) was purchased from Chem Service (West Chester, PA, USA). Chlorpyrifos (O,O-diethyl O-(3,5,6-trichloropyridin-2-yl) phosphorothioate) as PESTANAL® (analytical standard), putrescine dihydrochloride, bovine serum albumin, spermidine trihydrochloride, spermine tetrahydrochloride, N¹-acetylspermine trihydrochloride, dansyl chloride, peroxidase from horseradish (type VI) and luminol sodium salt were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All other reagents used were also of analytical grade.

2.2. Toad embryo development and exposure

Adult *R. arenarum* males and females were collected during the breeding season (spring) at Los Barreales lake (S38.45344 W68.72918), a pesticide-free environment. Animals used in this study were maintained and treated to alleviate their suffering according to recommended guidelines (National Research Council, 2011, 2009). Upon collection, adults were transported to an outdoor terrarium. Three independent experiments, using three different pairs of parents, were

performed for each pesticide. The ovulation of females was induced by an intraperitoneal injection of 2500 international units (IU) of human chorionic gonadotropin (Ferring Pharmaceuticals). Eggs were laid between 12 and 16 h post-injection. Females were gently held and squeezed to help with the process. Eggs were fertilized with a testicular homogenate. Groups of 400 newly fertilized embryos were transferred to glass recipients containing either amphibian Ringer's solution (0.65 g L⁻¹ NaCl; 0.01 g L⁻¹ KCl; 0.02 g L⁻¹ CaCl₂) (control group with 0.3% acetone) or pesticide solution, keeping a ratio of 1 embryo per mL of solution. Pesticide solutions were prepared by diluting the insecticide standard solution, prepared in acetone, with an appropriate amount of amphibian Ringer's solution, keeping acetone to 0.3%. The exact concentration of the insecticides in the standard solutions was checked by gas chromatography with a nitrogen and phosphorus detector (GC-NPD). The concentrations of AZM tested were 0.5 mg L⁻¹, 2 mg L⁻¹, and 9 mg L⁻¹, and those of CPF were 0.5 mg L⁻¹ and 1 mg L⁻¹. Treatments were carried out by duplicate. Samples were taken at tail bud (TB, 76 h post-fertilization), open mouth (OM, 5 ½ days post-fertilization) and complete operculum stages (CO, 10 days post-fertilization). Embryonic stages were assessed according to Del Conte and Sirlin (1952). Embryos were maintained at 18–20 °C in a 12:12 h light/dark photoperiod. Solutions were renewed every 48 h until embryos reached the stage of CO.

2.3. Enzyme preparation and activity determination

Each sample consisted of a total of fifty embryos at TB stage or twenty-five embryos at OM and CO stages. Embryos were thoroughly washed with cold Ringer solution, briefly cooled on ice and homogenized in 1 mL of 143 mM potassium phosphate buffer pH 7.5 with 6.3 mM EDTA. The homogenates were centrifuged at 10,000 ×g for 20 min at 4 °C and the resulting supernatants were frozen until the enzymatic activity determinations were performed. PAOX, DAO and SMOX activities were measured according to Goodwin et al. (2011), with modifications. This technique is based on the coupling of the production of H₂O₂ by SMOX, PAOX or DAO with the generation of chemiluminescence due to luminol oxidation (0.25 mM) catalyzed by horseradish peroxidase (0.5 U). The quantification of the luminescence in real-time and the activity determination was carried out with a fluorescence spectrophotometer at 500 nm absorbance. The substrates employed were spermine 1.5 mM to measure SMOX activity, N¹-acetylspermine 1.5 mM to measure PAOX activity and putrescine 1.5 mM to measure DAO activity.

2.4. Polyamine content determination

Fifty embryos at TB and twenty-five embryos at OM and CO stage were homogenized in 1 mL of 143 mM potassium phosphate buffer pH 7.5 with 6.3 mM EDTA and 0.2 N HClO₄. Samples were incubated on ice for 1 h and centrifuged 10 min at 3000 ×g. The supernatant was derivatized with 20 mg mL⁻¹ dansyl chloride and free polyamine content was assessed by HPLC reverse-phase separation and fluorometric quantification (Marcé et al., 1995). Samples for the quantification of conjugated polyamines were prepared as follows: perchloric acid extracts were mixed with HCl 12 N (1:1), followed by incubation at 70 °C for 24 h to achieve acid hydrolysis. The samples were dried until complete evaporation. The remaining residue was dissolved in 5% HClO₄ and derivatization with dansyl chloride was performed. The column employed was a Luna® reverse phase, 250 mm × 4 mm, 5 μm of particle size (Phenomenex, CA, USA). 1,7-diamine heptane was used as an internal standard both for samples and calibration standards.

2.5. Protein determination

Protein content was determined according to Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as standard.

2.6. Statistical analysis

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

Principal Components Analysis (PCA) was performed using the NTSYSp21 program to determine the contribution of the different response variables and the correlations between them, as well as the influence of the treatments (AZM or CPF) on the separation or aggragation of the individual factors. The analysis was first globally performed, and then separately applied to TB and CO stages. The variables used to perform the PCA were Put, Spd and Spm levels, the activities of polyamine oxidative enzymes (DAO, PAOX and SMOX), and the activities of the enzymes catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) and acetylcholinesterase, along with reduced glutathione levels (GSH). Data regarding oxidative stress parameters and acetylcholinesterase activity were obtained from our previously published works (Lascano et al., 2011b; Liendro et al., 2015; Sotomayor et al., 2015).

3. Results

3.1. Polyamine oxidative metabolism

In control embryos, we observed a common profile of PAOX, DAO and SMOX activities along embryonic development, with an increase of activity from TB to OM stage, followed by a decline towards CO stage. Control values for PAOX, DAO and SMOX are informed in Table 1.

DAO specific activity was differentially affected depending on the organophosphorus pesticide employed. Exposure to AZM elicited a significant increase of DAO activity in TB embryos exposed to all the concentrations tested (Fig. 1A), with a maximum of 62% increase for the lowest AZM concentration ($p < .01$). No significant changes were observed in OM and CO embryos exposed to AZM when compared to their respective controls. On the other hand, exposure to CPF elicited a significant decrease of DAO activity in OM embryos exposed to 0.5 mg L^{-1} (31%; $p < .05$) (Fig. 1B). OM embryos exposed to 1 mg L^{-1} CPF showed a decreasing trend (25%; $p = .068$). No significant differences were observed between controls and CPF-exposed embryos at TB and CO stages.

Exposure to AZM did not alter PAOX activity along embryonic development (Fig. 2A), while exposure to CPF elicited a 270% increase in TB embryos exposed to 1 mg L^{-1} CPF ($p < .05$) (Fig. 2B).

A 33% increase in SMOX activity was observed in OM embryos exposed to 0.5 mg L^{-1} AZM ($p < .01$) (Fig. 3A), while a 25% decrease was observed in OM embryos exposed to 0.5 mg L^{-1} CPF ($p < .05$)

Table 1

Control values of DAO, PAOX and SMOX activity (expressed as $\text{nmol min}^{-1} \mu\text{g protein}^{-1}$) and polyamine levels (expressed as $\text{nmol } \mu\text{g protein}^{-1}$) in control *Rhinella arenarum* embryos. Values are expressed as Mean \pm SEM. Different letters indicate significant differences between embryonic stages ($p \leq 0.05$).

Control parameter	Embryonic stage		
	TB	OM	CO
DAO	$3.1 \pm 0.24\text{a}$	$4.9 \pm 0.48\text{b}$	$2.4 \pm 0.33\text{c}$
PAOX	$2.0 \pm 0.14\text{a}$	$3.6 \pm 0.20\text{b}$	$2.8 \pm 0.41\text{c}$
SMOX	$2.9 \pm 1.47\text{a}$	$5.7 \pm 0.30\text{b}$	$3.4 \pm 0.09\text{a}$
Putrescine	$25.1 \pm 1.30\text{a}$	$22.9 \pm 1.32\text{a}$	$9.4 \pm 0.96\text{b}$
Spermidine	$7.0 \pm 0.33\text{a}$	$7.6 \pm 0.27\text{a}$	$7.5 \pm 0.52\text{a}$
Spermine	$0.31 \pm 0.001\text{a}$	$0.4 \pm 0.024\text{b}$	$0.31 \pm 0.052\text{a}$

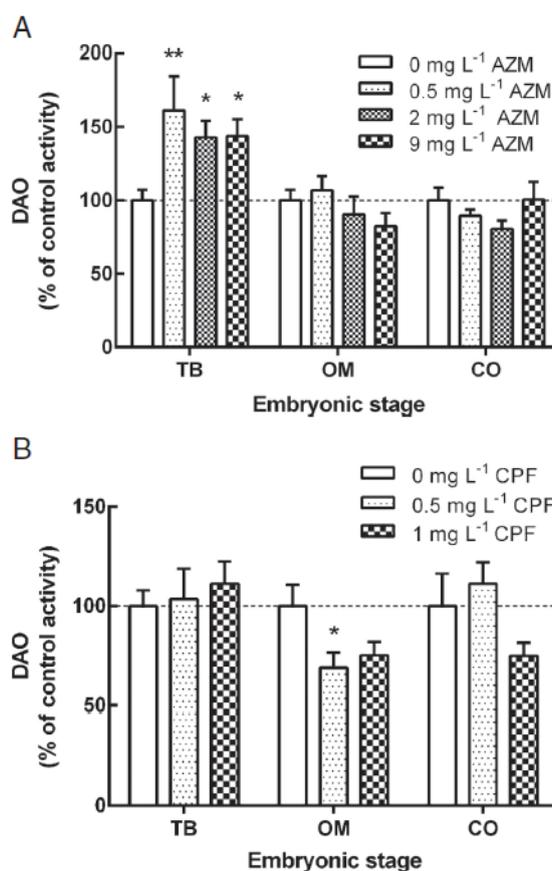


Fig. 1. Effect of AZM (A) and CPF (B) on DAO activity, expressed as a percentage of control activity, in *Rhinella arenarum* embryos. Data represent mean \pm standard error of 3 independent experiments with duplicate treatments ($n = 6$). Asterisks indicate significant differences between AZM and CPF-exposed embryos and their corresponding control (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$) as determined by ANOVA and Fisher's LSD test. Abbreviations: AZM: azinphos-methyl; CO: complete operculum stage; CPF: chlorpyrifos; DAO: diamine oxidase; OM: open mouth stage; TB: tail-bud stage.

(Fig. 3B). No significant differences were observed in TB and CO embryos exposed to AZM and CPF.

3.2. Polyamine levels

Control Put concentration in *R. arenarum* embryos did not vary between TB and OM stage but declined in CO embryos; control Spd concentration showed no variation throughout embryonic development and Spm levels followed a similar pattern to that of the oxidases (Table 1).

Embryos exposed to AZM showed increased levels of Put and Spm. Particularly, exposure to AZM led to a 46% increase in free Put concentration in OM embryos exposed to 2 mg L^{-1} AZM ($p < .05$) and a 53% increase in CO embryos exposed to 9 mg L^{-1} AZM ($p < .05$) (Fig. 4A). Also, free Spm concentration was increased by 48% in OM embryos exposed to 2 mg L^{-1} AZM ($p < .05$) (Fig. 4C). Spd was the only polyamine whose concentration was not significantly affected by exposure to AZM (Fig. 4B).

Exposure of *R. arenarum* embryos to CPF did not result in statistically significant differences in the levels of free Put, Spd or Spm throughout their development (Table 2). An increasing trend of free polyamine levels was observed in embryos exposed to 0.5 mg L^{-1} CPF

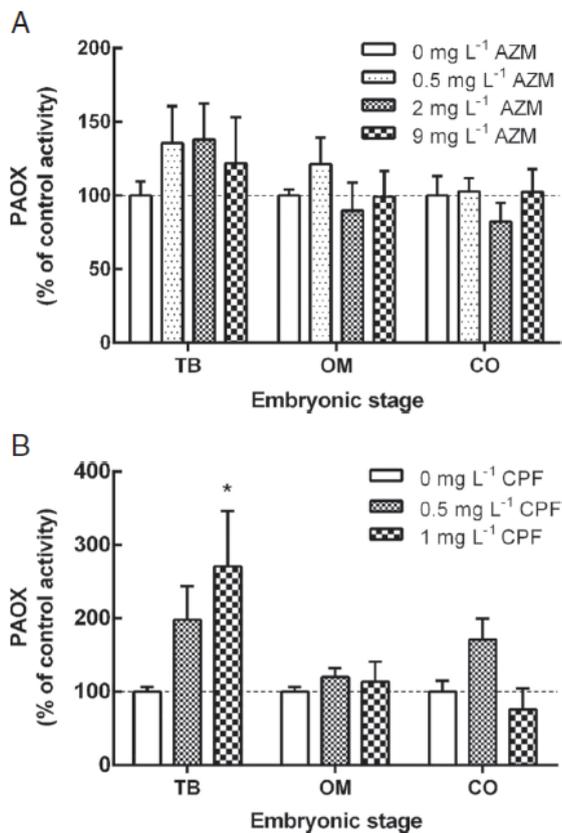


Fig. 2. Effect of AZM (A) and CPF (B) on PAOX activity, expressed as a percentage of control activity, in *Rhinella arenarum* embryos. Data represent mean \pm standard error of 3 independent experiments with duplicate treatments ($n = 6$). Asterisks indicate significant differences between AZM and CPF-exposed embryos and their corresponding control ($* p \leq 0.05$) as determined by ANOVA and Fisher's LSD test. Abbreviations: AZM: azinphos-methyl; CO: complete operculum stage; CPF: chlorpyrifos; OM: open mouth stage; PAOX: N¹-acetylpolymamine oxidase; TB: tail-bud stage.

when compared to control embryos.

The levels of conjugated polyamines were under the limits of detection for the technique applied, in all the samples.

3.3. Relationship between polyamine levels, metabolism and antioxidant parameters

The overall analysis on the responses of polyamine metabolizing enzymes and levels presented in the study, together with the oxidative metabolism (Ferrari et al., 2009; Lascano et al., 2011b; Liendro et al., 2015; Sotomayor et al., 2015), indicated a well-defined separation of *R. arenarum* embryonic stages in the first component, as shown in the projection plane (Fig. 5A). Correspondingly, TB embryos were positioned by their higher levels of Put content and DAO and SMOX activities, while CO embryos were associated with Spm levels and the target/detoxifying enzymes acetylcholinesterase, CAT and GST in the opposite side. In turn, CO embryos showed substantial segregation by the different treatments in the second component. Given the weight of the embryonic stages on the variable responses, we performed separate analysis for TB and CO embryos.

In TB stage, the first component explained 54.6% of the response. The variables that contributed the most were Spm, DAO, CAT, and GST in one direction and PAOX and SMOX in the opposite direction. The

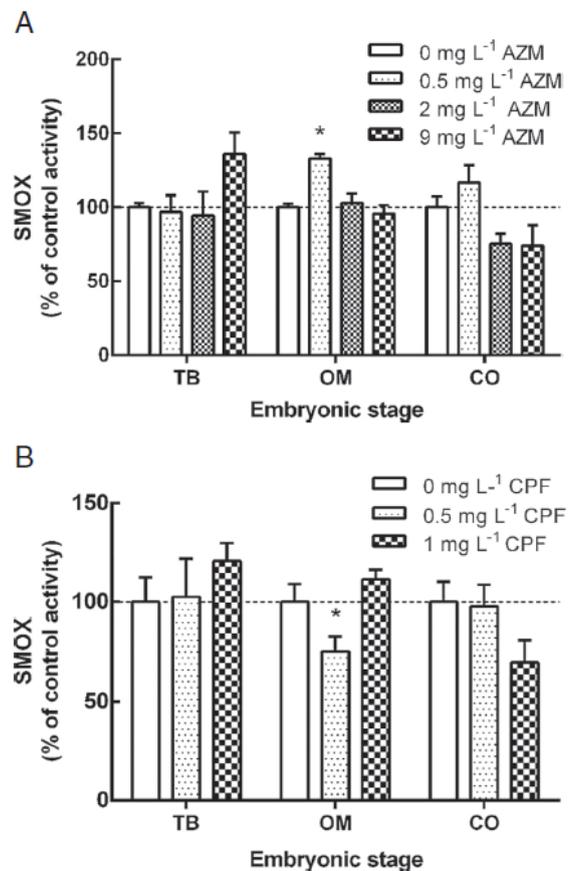


Fig. 3. Effect of AZM (A) and CPF (B) on SMOX activity, expressed as a percentage of control activity, in *Rhinella arenarum* embryos. Data represent mean \pm standard error of 3 independent experiments with duplicate treatments ($n = 6$). Asterisks indicate significant differences between AZM and CPF-exposed embryos and their corresponding control ($* p \leq 0.05$) as determined by ANOVA and Fisher's LSD test. Abbreviations: AZM: azinphos-methyl; CO: complete operculum stage; CPF: chlorpyrifos; OM: open mouth stage; SMOX: spermine oxidase; TB: tail-bud stage.

second component explained 45.4% of the response, associated with the variables Put, Spd, PAOX, acetylcholinesterase and GSH (Fig. 5B). Polyamine levels were positively correlated between them and with DAO activity (Table 3A). PAOX and SMOX were positively correlated to acetylcholinesterase and GSH and negatively correlated to the antioxidant enzymes CAT and GST, displaying in opposite directions on the plane. The treatments with AZM and CPF in TB embryos were opposite on the first component axis. AZM exposure was associated with high polyamine levels and DAO and GST activities, while CPF treatment was related to increased activities of PAOX, SMOX and GST, and with elevated GSH levels. Control TB embryos were detached from both treatments and projected along the second component axis.

In CO embryos, 78.2% of the variability of response was explained by the first component, separating the variables Put, Spd, Spm, DAO and PAOX in one direction and acetylcholinesterase, GST, GSH and CAT in the opposite direction. The remaining 21.8% of the variability of response was explained by the second component, associated with SMOX and DAO activities located in opposite directions (Fig. 5C). Acetylcholinesterase activity and antioxidant parameters were negatively correlated with polyamine levels and polyamine oxidative metabolism (Table 3B). The only exception was SMOX, which showed a low positive correlation with CAT and GSH and a negative correlation

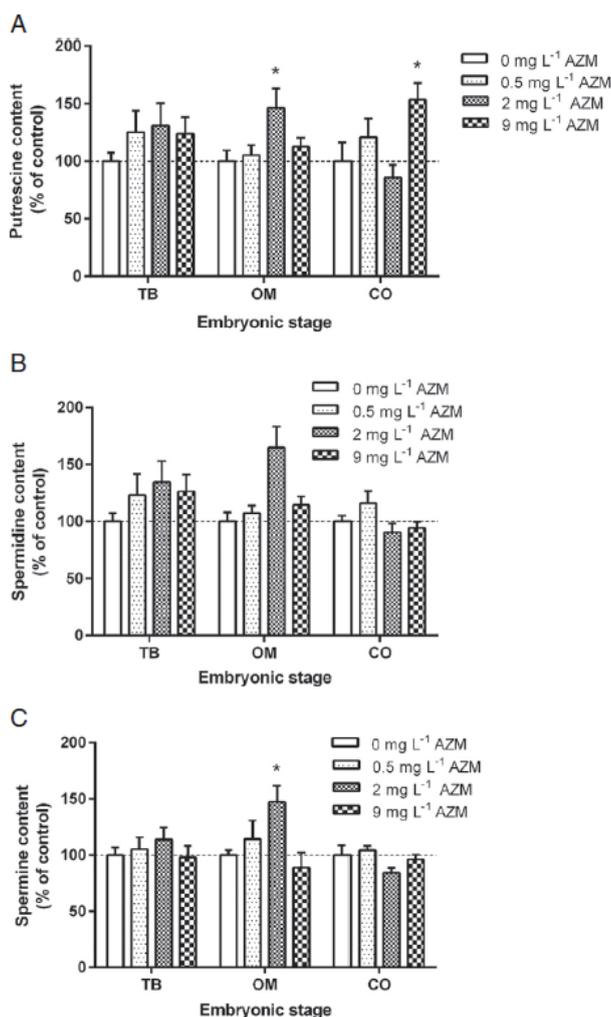


Fig. 4. Effect of AZM on polyamine concentration in *Rhinella arenarum* embryos, expressed as a percentage of control levels A) Put, B) Spd, C) Spm. Data represent mean \pm standard error of 3 independent experiments with duplicate treatments ($n = 6$). Asterisks indicate significant differences between AZM-exposed embryos and their corresponding control (* $p \leq 0.05$) as determined by ANOVA and Fisher's LSD test. Abbreviations: AZM: azinphos-methyl; CO: complete operculum stage; OM: open mouth stage; Put: putrescine; Spd: spermidine; Spm: spermine; TB: tail-bud stage.

to DAO. According to the treatment projection on the plane, CPF exposure in CO embryos was associated to polyamine oxidative metabolism by PAOX and DAO activities and increased polyamine levels, and low activities of antioxidant enzymes, GSH and acetylcholinesterase activity. CO embryos exposed to AZM associated with increased SMOX activity.

4. Discussion

Polyamines exert an essential role during fetal and embryonic development (Fenelon and Murphy, 2017; Hussain et al., 2017; López-García et al., 2008). In the amphibian *Xenopus laevis*, early studies by Osborne et al. (1993) established that an initial limitation in Spd concentration to that of Put is necessary for normal embryonic development. The ratio of Put:Spd:Spm in *R. arenarum* embryos is approximately 88:23:1 at the TB stage and turns to 28:26:1 when embryos reach the CO stage. Despite that the embryos in our study are more

Table 2

Free polyamine content (nmol $\mu\text{g protein}^{-1}$) in *Rhinella arenarum* embryos exposed to CPF. Values are expressed as Mean \pm SEM. No significant differences were observed.

	TB	OM	CO
Putrescine			
0 mg L ⁻¹ CPF	23.77 \pm 2.87	21.66 \pm 3.52	10.42 \pm 1.36
0.5 mg L ⁻¹ CPF	26.73 \pm 0.99	25.85 \pm 3.19	13.20 \pm 0.40
1 mg L ⁻¹ CPF	27.22 \pm 0.83	23.52 \pm 2.79	8.59 \pm 0.35
Spermidine			
0 mg L ⁻¹ CPF	6.71 \pm 0.90	8.13 \pm 0.69	6.96 \pm 1.23
0.5 mg L ⁻¹ CPF	7.42 \pm 0.20	9.08 \pm 0.45	8.78 \pm 0.84
1 mg L ⁻¹ CPF	7.55 \pm 0.24	8.87 \pm 1.12	5.63 \pm 0.16
Spermine			
0 mg L ⁻¹ CPF	0.31 \pm 0.05	0.35 \pm 0.03	0.36 \pm 0.06
0.5 mg L ⁻¹ CPF	0.43 \pm 0.16	0.36 \pm 0.04	0.42 \pm 0.08
1 mg L ⁻¹ CPF	0.31 \pm 0.04	0.41 \pm 0.05	0.32 \pm 0.03

advanced in their development, we can still appreciate a low Spd/Put ratio of 0.26 in *R. arenarum* TB embryos and its increase to 0.93 in CO embryos.

The insecticides AZM and CPF belong to the same chemical family of organophosphorus pesticides and so they share their mechanism of action on the main target, acetylcholinesterase (Matsumura, 1985). However, their impact on polyamine metabolism is different. Exposure to AZM did not affect PAOX activity throughout embryonic development, while PAOX was the earliest biochemical response observed in embryos exposed to CPF. DAO, on the other hand, was early increased in embryos exposed to AZM, while it decreased in OM embryos exposed to CPF. The effect of AZM and CPF on SMOX activity was evident in OM embryos, and the effect was the opposite between the insecticides. The activity profile of control oxidases observed in the present study is similar to that displayed by ornithine decarboxylase, a rate-limiting enzyme of polyamine synthesis (Lascano et al., 2011a). It is interesting to note that SMOX displays the highest overall activity among polyamine degradative enzymes in *R. arenarum*, while its substrate is found in the lowest concentration, maybe reflecting its specificity to maintain Spm at very low levels. Despite that SMOX activity is significantly increased in OM embryos exposed to 0.5 mg L⁻¹ AZM, Spm concentration remained similar to control levels. This result is similar to that obtained by Ceci et al. (2017) in a transgenic mouse model that overexpresses SMOX, reflecting the well buffered cellular content of Spm. A significant increase in Put and Spm concentration was observed in OM embryos exposed to 2 mg L⁻¹ AZM, while Spd showed an increasing trend. This might indicate a general increase of polyamine synthesis in these embryos, backed up by an elevated ornithine decarboxylase specific activity in OM embryos when compared to TB and CO stages (Lascano et al., 2011a).

The concentrations of CPF and AZM employed in our study are sublethal concentrations (except the 9 mg L⁻¹ AZM concentration), meaning that no significant mortality due to insecticide exposure is observed. Early biochemical responses, which occur before any visible indication of toxicity, can be valuable tools in environmental risk assessment of toxic substances. The early increase of DAO and PAOX activity observed in TB embryos in the present study suggest their utility as biomarkers of exposure to AZM and CPF, respectively, as these enzymes respond earlier than the classical organophosphorus biomarker acetylcholinesterase. DAO and PAOX utility as biomarkers would be reinforced by the fact that early *R. arenarum* embryos show no significant inhibition of acetylcholinesterase activity (Lascano et al., 2011b; Sotomayor et al., 2015), which might be attributed to a morphogenic role where acetylcholinesterase structure is the critical property, but not its activity (Brimijoin and Koenigsberger, 1999).

It has been suggested that DAO plays a protective role against the pathological accumulation of diamines in high-proliferation vertebrate

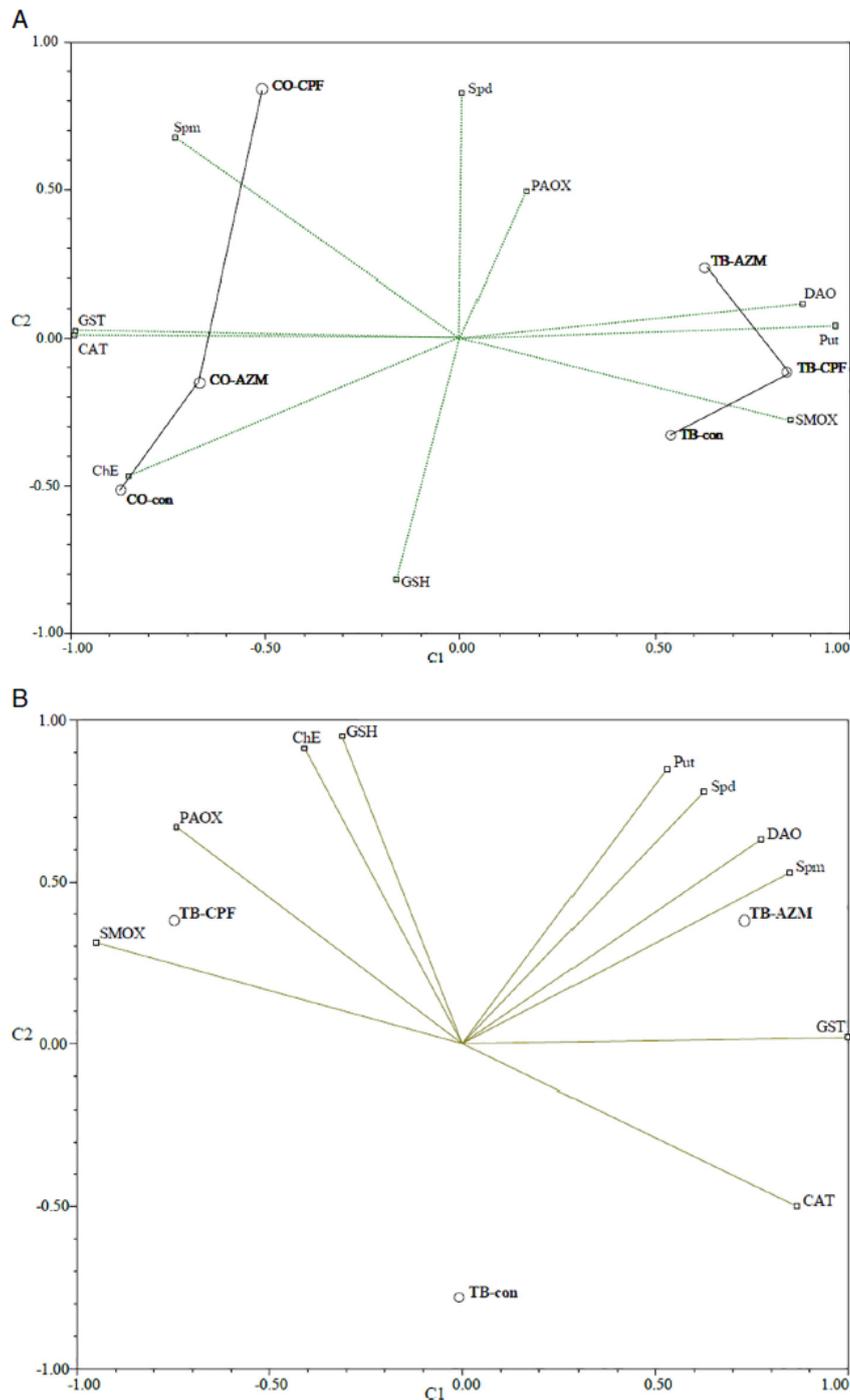


Fig. 5. Principal component analysis performed in TB and CO embryos (A), and performed separately in TB embryos (B) and CO embryos (C). The variables used included polyamine content, activity of polyamine oxidative enzymes, oxidative stress parameters and acetylcholinesterase activity. Abbreviations: AZM: azinphos-methyl; CAT: catalase; ChE: acetylcholinesterase; CO: complete operculum stage; con: control; CPF: chlorpyrifos; DAO: diamine oxidase; GSH: reduced glutathione; GST: glutathione S-transferase; PAOX: N¹-acetylputrescine oxidase; Put: putrescine; Spd: spermidine; SMOX: spermine oxidase; Spm: spermine; TB: tail-bud stage.

tissues (Seiler, 2004) and would also have a leading role in homeostatic control of intracellular biogenic amine levels (Agostinelli et al., 2004). Besides, a protective effect of Put on seizures has been observed in *X. laevis* embryos through its conversion to γ -aminobutyric acid by DAO (Bell et al., 2011). Considering these roles, we may suppose that the

increase of DAO activity observed in early *R. arenarum* embryos exposed to AZM could serve a protective role against the neurotoxic insecticide, rapidly metabolizing the elevated Put levels to maintain the ratio Spd/Put necessary for normal embryonic development. This hypothesis is supported by the principal component analysis as well as our

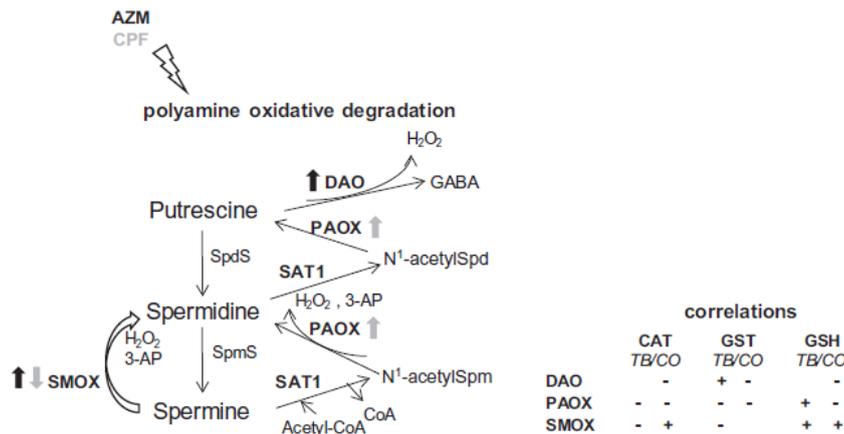


Fig. 6. Graphical summary of the impact of AZM and CPF on polyamine oxidative degradation and its relation to antioxidant parameters in *R. arenarum* embryos. Effects of AZM and CPF are shown with black or grey arrows, respectively. Abbreviations: AZM: azinphos-methyl; CAT: catalase; CO: complete operculum stage; CPF: chlorpyrifos; DAO; diamine oxidase; GABA: γ -aminobutyric acid; GSH: reduced glutathione; GST: glutathione S-transferase; N¹-acetylSpd: N¹-acetylspermidine; N¹-acetylSpm: N¹-acetylspermine; PAOX: N¹-acetylpolyamine oxidase; SAT1: Spermidine-spermine N¹-acetyl transferase; SMOX: spermine oxidase; SpdS: spermidine synthase; SpmS: spermine synthase; TB: tail-bud stage.

detoxifying genes, linking polyamine metabolism and oxidative stress. It has been also reported that oxidative stress triggers the transcription of ornithine decarboxylase and spermidine-spermine N¹-acetyl transferase genes, with accompanying increases in their activities (Smirnova et al., 2012). The increase in ornithine decarboxylase activity would collaborate in the antioxidant response through the increase in polyamine levels, while the increase in spermidine-spermine N¹-acetyl transferase activity would limit the accumulation of tumor-promoting polyamines. In previous studies, we observed that ornithine decarboxylase activity is decreased in early *R. arenarum* embryos exposed to CPF in a dose-dependent manner (Sotomayor et al., 2012), while exposure to AZM results in an increase of ornithine decarboxylase activity throughout embryonic development (Lascano et al., 2011a). Our attempts to measure spermidine-spermine N¹-acetyl transferase activity in *R. arenarum* embryos were unsuccessful and this is probably related to its recognized very low levels of activity (Matsui and Pegg, 1981). We also determined that *R. arenarum* embryonic exposure to AZM and CPF generates an oxidative stress situation (Ferrari et al., 2009; Lascano et al., 2011b; Liendro et al., 2015; Sotomayor et al., 2015). Linking these reports and the present results into one analysis, we may infer that *R. arenarum* embryo exposure to AZM would elicit a proliferative response at TB stage as suggested by the results of the principal component analysis, characterized by high polyamine levels and DAO activity, along with increased GST activity. The increase in GST activity has been suggested as an adaptive and protective response in previous studies (Anguiano et al., 2001; Lascano et al., 2011b). In turn, *R. arenarum* embryos exposed to CPF showed an increase in PAOX activity at TB stage, linked to an oxidative stress situation that was evidenced by the impact on CAT and by a protective antioxidant response suggested by high GSH levels. It is known that the heme group present in the active site of CAT is sensitive to superoxide anion generated during oxidative stress, which reduces the ferric center to a ferro-oxy compound and leads to enzyme inhibition (Kono and Fridovich, 1982). At CO stage, *R. arenarum* embryos exposed to sublethal concentrations of AZM show an increase in SMOX activity associated with a low impact of oxidative stress and normal activity levels of the antioxidant enzymes and acetylcholinesterase. For CPF-exposed embryos at similar sublethal levels, the prognosis is worse as low levels of antioxidant and detoxifying enzymes, GSH and acetylcholinesterase are observed in association with increased PAOX and DAO activities suggesting oxidative stress, and a trend towards higher polyamine levels suggesting an altered proliferative status. All the changes observed in polyamine-degrading enzymes and their relationship to antioxidant parameters are summarized in Fig. 6.

In conclusion, DAO and PAOX activities respond earlier than the classical biomarker acetylcholinesterase to AZM and CPF exposure,

respectively, during *R. arenarum* embryonic development, leading us to suggest their use as biomarkers of exposure to AZM and CPF. The increase of both DAO and PAOX activities might play a protective role against the neurotoxic action of the insecticides, allowing for the normal progression of embryonic development by the maintenance of a low Spd/Put ratio. As a consequence of insecticide exposure and increased polyamine oxidative degradation, the production of reactive species would increase, altering the oxidative status of the cell and hence the antioxidant defense system.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Universidad Nacional del Comahue (grant number 04 A134) and Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT; grant number PICT 2017-1529). Natalia Pires has a Ph.D. scholarship from Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) (2018-2020).

References

Agostinelli, E., Arancia, G., Dalla Vedova, L., Belli, F., Marra, M., Salvi, M., Toninello, A., 2004. The biological functions of polyamine oxidation products by amine oxidases: perspectives of clinical applications. *Amino Acids* 27, 347–358. <https://doi.org/10.1007/s00726-004-0114-4>.

Anguiano, O.L., Caballero de Castro, A., Pechen de D'Angelo, A.M., 2001. The role of glutathion conjugation in the regulation of early toad embryos' tolerance to pesticides. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 128, 35–43.

Arias-Estévez, M., López-Periágo, E., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J., Mejuto, J.-C., García-Río, L., 2008. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agric. Ecosyst. Environ.* 123, 247–260. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2007.07.011>.

Bachrach, U., 2005. Naturally occurring polyamines: interaction with macromolecules. *Curr. Protein Pept. Sci.* 6, 559–566. <https://doi.org/10.2174/138920305774933240>.

Bell, M.R., Belarde, J.A., Johnson, H.F., Aizenman, C.D., 2011. A neuroprotective role for polyamines in a *Xenopus* tadpole model of epilepsy. *Nat. Neurosci.* 14, 505–512. <https://doi.org/10.1038/nn.2777>.

Brimijoin, S., Koenigsberger, C., 1999. Cholinesterases in neural development: new findings and toxicologic implications. *Environ. Health Perspect.* 107, 59–64. <https://doi.org/10.1289/ehp.99107s159>.

Ceci, R., Duranti, G., Leonetti, A., Pietropaoli, S., Spinozzi, F., Marcocci, L., Amendola, R., Ceconi, F., Sabatini, S., Mariottini, P., Cervelli, M., 2017. Adaptive responses of heart and skeletal muscle to spermine oxidase overexpression: evaluation of a new transgenic mouse model. *Free Radic. Biol. Med.* 103, 216–225. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.040>.

Del Conte, E., Sirlin, J.L., 1952. Pattern series of the first embryonic stages in *Bufo arenarum*. *Anat. Rec.* 112, 125–135. <https://doi.org/10.1002/ar.1091120109>.

Fenelon, J.C., Murphy, B.D., 2017. Inhibition of polyamine synthesis causes entry of the mouse blastocyst into embryonic diapause. *Biol. Reprod.* 97, 119–132. <https://doi.org/10.1093/biolre/iwz001>.

- org/10.1093/biolre/iox060.
- Ferrari, A., Lascano, C.L., Anguiano, O.L., de D'Angelo, A.M.P., Venturino, A., 2009. Antioxidant responses to azinphos methyl and carbaryl during the embryonic development of the toad *Rhinella* (*Bufo*) arenarum Hensel. *Aquat. Toxicol.* 93, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.03.003>.
- Goodwin, A.C., Murray-Stewart, T.R., Casero, R.A., 2011. A simple assay for mammalian spermine oxidase: a polyamine catabolic enzyme implicated in drug response and disease. *Methods Mol. Biol. Methods. Mol. Biol.* 720, 173–181. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-034-8_10.
- Hussain, T., Tan, B., Ren, W., Rahu, N., Kalhor, D.H., Yin, Y., 2017. Exploring polyamines: functions in embryo/fetal development. *Anim. Nutr.* 3, 7–10. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.12.002>.
- IUCN, 2018. The IUCN Red List of Threatened Species 2018 [WWW Document]. URL: <https://www.iucnredlist.org/>.
- Kono, Y., Fridovich, I., 1982. Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.* 257, 5751–5754.
- Kwak, M.-K., Kensler, T.W., Casero Jr., R.A., 2003. Induction of phase 2 enzymes by serum oxidized polyamines through activation of Nrf2: effect of the polyamine metabolite acrolein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 662–670. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00834-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00834-9).
- Kwet, A., Reichle, S., Silvano, D., Úbeda, C., Baldo, D., Di Tada, I., 2004. *Rhinella arenarum*. In: The IUCN Red List of Threatened Species 2018. International Union for Conservation of Nature - IUCN. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T54576A11169255.en>.
- Lascano, C., Ferrari, A., Gauna, L., Cocca, C., Cochón, C., Verrengia, N., Venturino, A., 2011a. Organophosphorus insecticides affect normal polyamine metabolism in amphibian embryogenesis. *Pestic. Biochem. Physiol.* 101, 240–247. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.10.001>.
- Lascano, C., Ferrari, A., Venturino, A., 2011b. Sublethal concentrations of azinphos-methyl induce biochemical and morphological alterations in *Rhinella arenarum* embryos. *Chem. Ecol.* 27, 557–568. <https://doi.org/10.1080/02757540.2011.602971>.
- Liendro, N., Ferrari, A., Mardirosian, M., Lascano, C.I., Venturino, A., 2015. Toxicity of the insecticide chlorpyrifos to the south American toad *Rhinella arenarum* at larval developmental stage. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 39, 525–535. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.12.022>.
- López-García, C., López-Contreras, A.J., Cremades, A., Castells, M.T., Marín, F., Schreiber, F., Peñafiel, R., 2008. Molecular and morphological changes in placenta and embryo development associated with the inhibition of polyamine synthesis during mid-pregnancy in mice. *Endocrinology* 149, 5012–5023. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0084>.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Mandal, S., Mandal, A., Johansson, H.E., Orjalo, A.V., Park, M.H., 2013. Depletion of cellular polyamines, spermidine and spermine, causes a total arrest in translation and growth in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 2169–2174. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219002110>.
- Marcé, M., Brown, D.S., Capell, T., Figueras, X., Tiburcio, A.F., 1995. Rapid high-performance liquid chromatographic method for the quantitation of polyamines as their dansyl derivatives: application to plant and animal tissues. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 666, 329–335.
- Matsui, I., Pegg, A.E., 1981. Effect of inhibitors of protein synthesis on rat liver spermidine N1-acetyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 675, 373–378. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(81\)90028-3](https://doi.org/10.1016/0304-4165(81)90028-3).
- Matsumura, F., 1985. *Toxicology of Insecticides*, 2nd ed. Plenum Press, New York-London.
- Moinard, C., Cynober, L., de Bandt, J.-P., 2005. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin. Nutr.* 24, 184–197. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2004.11.001>.
- National Research Council, 2009. *Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals*. National Academies Press, Washington, D.C. <https://doi.org/10.17226/12526>.
- National Research Council, 2011. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. National Academies Press, Washington, D.C. <https://doi.org/10.17226/12910>.
- Ortiz-Santaliestra, M.E., Maia, J.P., Egea-Serrano, A., Brühl, C.A., Lopes, I., 2017. Biological relevance of the magnitude of effects (considering mortality, sub-lethal and reproductive effects) observed in studies with amphibians and reptiles in view of population level impacts on amphibians and reptiles. *EFSA Support Publ.* 14, 10.2903/sp.efsa.2017.EN-1251.
- Osborne, H.B., Cormier, P., Lorillon, O., Maney, D., Bellé, R., 1993. An appraisal of the developmental importance of polyamine changes in early *Xenopus* embryos. *Int. J. Dev. Biol.* 37, 615–618.
- Pegg, A.E., 2009. Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life* 61, 880–894. <https://doi.org/10.1002/iub.230>.
- Pegg, A.E., 2013. Toxicity of polyamines and their metabolic products. *Chem. Res. Toxicol.* 26, 1782–1800. <https://doi.org/10.1021/tx400316s>.
- Seiler, N., 2004. Catabolism of polyamines. *Amino Acids* 26, 217–233. <https://doi.org/10.1007/s00726-004-0070-z>.
- Smirnova, O.A., Isagulians, M.G., Hyvonen, M.T., Keinänen, T.A., Tunitskaya, V.I., Vepsäläinen, J., Alhonen, L., Kochetkov, S.N., Ivanov, A.V., 2012. Chemically induced oxidative stress increases polyamine levels by activating the transcription of ornithine decarboxylase and spermidine/spermine-N1-acetyltransferase in human hepatoma HUH7 cells. *Biochimie* 94, 1876–1883. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.04.023>.
- Sotomayor, V., Lascano, C., de D'Angelo, A.M.P., Venturino, A., 2012. Developmental and polyamine metabolism alterations in *Rhinella arenarum* embryos exposed to the organophosphate chlorpyrifos. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 2052–2058. <https://doi.org/10.1002/etc.1921>.
- Sotomayor, V., Chiriotto, T.S., Pechen, A.M., Venturino, A., 2015. Biochemical biomarkers of sublethal effects in *Rhinella arenarum* late gastrula exposed to the organophosphate chlorpyrifos. *Pestic. Biochem. Physiol.* 119, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.02.006>.
- Tonelli, C., Chio, I.I.C., Tuveson, D.A., 2018. Transcriptional regulation by Nrf2. *Antioxid. Redox Signal.* 29, 1727–1745. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7342>.
- Wang, X., Ikeguchi, Y., McCloskey, D.E., Nelson, P., Pegg, A.E., 2004. Spermine synthesis is required for Normal viability, growth, and fertility in the mouse. *J. Biol. Chem.* 279, 51370–51375. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410471200>.
- Zahedi, K., Bissler, J.J., Wang, Z., Josyula, A., Lu, L., Diegelman, P., Kisiel, N., Porter, C.W., Soleimani, M., 2007. Spermidine/spermine N 1 -acetyltransferase over-expression in kidney epithelial cells disrupts polyamine homeostasis, leads to DNA damage, and causes G 2 arrest. *Am. J. Physiol. Physiol.* 292, C1204–C1215. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00451.2006>.